



HAL
open science

Implication des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires dans la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire : rôle des canaux TRPV4

Laure-Anne Cussac

► **To cite this version:**

Laure-Anne Cussac. Implication des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires dans la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire : rôle des canaux TRPV4. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0115 . tel-02917534

HAL Id: tel-02917534

<https://theses.hal.science/tel-02917534>

Submitted on 19 Aug 2020

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

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

Par Laure-Anne CUSSAC

**IMPLICATION DES FIBROBLASTES ADVENTITIELS D'ARTÈRES
INTRAPULMONAIRES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE
L'HYPERTENSION PULMONAIRE : RÔLE DES CANAUX TRPV4**

Sous la direction du Professeur Thomas DUCRET

Soutenue le 16 juillet 2018

Membres du jury :

M. Bernard MULLER	Professeur des Universités, Bordeaux	Président
Mme Muriel LAFFARGUE	Directeur de recherche, INSERM, Toulouse	Rapporteur
Mme Véronique LEBLAIS	Professeur des Universités, Paris Sud	Rapporteur
M. Thomas DUCRET	Professeur des Universités, Bordeaux	Directeur

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

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

Par Laure-Anne CUSSAC

**IMPLICATION DES FIBROBLASTES ADVENTITIELS D'ARTÈRES
INTRAPULMONAIRES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE
L'HYPERTENSION PULMONAIRE : RÔLE DES CANAUX TRPV4**

Sous la direction du Professeur Thomas DUCRET

Soutenue le 16 juillet 2018

Membres du jury :

M. Bernard MULLER	Professeur des Universités, Bordeaux	Président
Mme Muriel LAFFARGUE	Directeur de recherche, INSERM, Toulouse	Rapporteur
Mme Véronique LEBLAIS	Professeur des Universités, Paris Sud	Rapporteur
M. Thomas DUCRET	Professeur des Universités, Bordeaux	Directeur

IMPLICATION DES FIBROBLASTES ADVENTITIELS D'ARTÈRES INTRAPULMONAIRES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE : RÔLE DES CANAUX TRPV4

La circulation pulmonaire est un système à faible pression (entre 10 et 15 mmHg au repos). Son principal rôle est la ré-oxygénation du sang qui permet l'apport aux organes du dioxygène nécessaire à leur fonctionnement. L'hyperTension Pulmonaire (HTP) est l'une de ses principales pathologies. Il s'agit d'une maladie rare engageant le pronostic vital du patient, définie par une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure ou égale à 25 mmHg au repos. Elle s'explique par une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires liée, entre autres, au remodelage artériel présent dans cette pathologie participant à la diminution de la lumière artérielle. En effet, chez les patients atteints d'HTP, les trois tuniques formant l'artère (*intima-media-adventice*) voient leur structure se modifier. La plupart des travaux portent sur le remodelage de la *media*, mais de plus en plus d'études montrent que les premières altérations observées se situent au niveau de l'*adventice*. Plus précisément, les fibroblastes, les cellules majoritaires de cette tunique, agiraient comme régulateur clé de la fonction vasculaire pulmonaire. En réponse à un stress extérieur tel que l'hypoxie (à l'origine de certaines formes d'HTP), elles seraient les premières cellules à s'activer d'où leur dénomination par certains de « cellules sentinelles ». Cette activation se manifeste entre autres par des changements phénotypiques (différenciation en myofibroblastes), leur prolifération, leur migration, et la surproduction de protéines de la matrice extracellulaire. Ainsi les fibroblastes participent directement au remodelage artériel global observé dans l'HTP.

Le calcium est connu pour réguler un grand nombre de voies de signalisation cellulaire impliquées dans les phénomènes précédemment cités. Au laboratoire, l'implication du canal TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4), un canal non sélectif perméable aux ions Ca^{2+} , a déjà été montré concernant le remodelage de la *media*. L'activation du canal, amplifiée en situations pathologiques, participe à la migration et à la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires. Aussi, des données de la littérature montrent que TRPV4 joue un rôle important dans l'activité délétère des fibroblastes dans les sclérodermies, les fibroses pulmonaire et cardiaque. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'implication des fibroblastes et du canal TRPV4 dans le remodelage adventiciel artériel lors de l'hypertension pulmonaire.

Pour ce faire, nous nous sommes intéressés, dans une première partie, à l'implication du canal TRPV4 dans ce remodelage au niveau tissulaire. Nous avons ainsi montré, à l'aide de deux modèles animaux hypertendus, un induit par l'injection de monocrotaline et l'autre induit par une exposition hypoxique chronique, que la protéine TRPV4 est surexprimée dans l'*adventice* alors que son remodelage est significativement atténué chez des souris invalidées pour le gène *trpv4*.

Dans un second temps, nous avons alors étudié le rôle de ce canal dans les réponses cellulaires impliquées dans le remodelage adventiciel. Pour cela nous avons mis au point la culture de fibroblastes d'*adventice* d'artères intrapulmonaires de rats. Puis par une approche pharmacologique (activateurs et bloqueurs du canal) et à l'aide de siRNA, nous avons montré que l'activation du canal TRPV4 favorise la prolifération (par incorporation de BrdU) et la migration (par test de brèche) des fibroblastes, ainsi que leur activité profibrotique avec la surproduction de matrice extracellulaire (MEC) (par quantification de l'expression protéique par Western blot).

Il serait désormais intéressant de cultiver les fibroblastes en mimant *in vitro* les conditions pathologiques, en les plaçant dans un environnement hypoxique et/ou en les soumettant à un étirement chronique, et d'évaluer l'impact de l'HTP sur le canal et ses actions cellulaires.

Mots clés

Artère intra-pulmonaire, fibroblaste, hypertension pulmonaire, remodelage adventiciel, TRPV4

IMPLICATION OF ADVENTITIAL INTRAPULMONARY ARTERY FIBROBLASTS IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF PULMONARY HYPERTENSION: ROLE OF THE TRPV4 CHANNEL

Pulmonary circulation is a low pressure system (between 10 and 15 mmHg at rest). Its first role is blood oxygenation which allows to carry dioxygen to the organs functionality. Pulmonary Hypertension (PH) is one of the main pulmonary diseases. It is a rare and potentially fatal disorder, defined by a high arterial pulmonary mean pressure (greater than or equal to 25 mmHg at rest). This high pressure can be explained by the elevation of pulmonary arterial resistance and related to narrowing of the lumen of the artery, induced, among other, by the arterial remodeling in this pathology.

Indeed, during the pathology implementation, the structure of the all three layers constituting the artery wall (*intima-media-adventitia*) is altered. The media and intima have received much attention from vascular biologists, however an increasing volume of experimental data indicates that this third compartment undergoes earlier and dramatic remodeling during PH. More specifically, the fibroblasts, the most abundant cells in adventitia, may act as key regulator of pulmonary vascular wall structure and function from the "outside-in". The fibroblasts may play the role of "sentinel cell" in the vessel wall. In responding to various stimuli, these cells are the first artery wall cells to show evidence of "activation" as proliferation, myofibroblast differentiation, migration and invasion in the other wall layer, and extracellular matrix production. That way, fibroblasts participate directly to the overall artery remodeling observed in PH.

Calcium is involved in numerous cellular signalling pathways such as those previously described. In the laboratory, we already proved that TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid) channel, a non-selective cationic channel calcium permeable, is involved in media remodeling. Moreover, several datas show that this channel play an important role in diseases in which we observe a negative role of fibroblast such as scleroderma, cardiac and pulmonary fibrosis.

Considering these results, we were interested in the role of TRPV4 in fibroblast during PH more precisely in the adventitial remodeling process observed in this pathology.

We first demonstrated the involment of TRPV4 in the adventitia remodeling regarding the tissue. Using two different animal models of PH, chronic hypoxia and monocrotalin models, we identified that this protein was up-regulated in sick rats and the mouse knock-down for this gene developed attenuated PH and adventitia remodeling compare to the control.

Then we studied the role of TRPV4 in the mechanism leading to the adventitia remodeling. Thanks to pharmacological molecule and siRNA we proved that activation of TRPV4 increased proliferation (BrdU assay), migration (wound assay) and fibrotic activity such as excessed production of extracellular matrix (using western blot analyse) of the fibroblasts.

With all these results, it would be interested to culture fibroblasts in hypoxic conditions and/or subjecting themselves to chronicle stretch to imitate HTP pathology and evaluate TRPV4 role in these conditions

Key words

Adventitial remodeling, fibroblast, intrapulmonary artery, pulmonary hypertension, TRPV4.

Cette thèse a été réalisée au sein de :

Unité de recherche INSERM U1045

Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux,

Unité 1045, Equipe 1 - Physiopathologie de la circulation pulmonaire et systémique,

146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidée pendant l'élaboration de ma thèse et notamment mon directeur, le Professeur Thomas Ducret, pour m'avoir confié ce projet, et ainsi donné la chance de poursuivre ma thèse. Merci pour ton intérêt, ta rigueur et ton soutien, ainsi que tes nombreux conseils durant la rédaction de ma thèse

Je souhaite aussi exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des membres du jury pour tout le temps consacré à l'évaluation de ce travail. Madame le Professeur Véronique Leblais, Madame le Docteur Muriel Laffargue, Monsieur le Professeur Bernard Muller, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de participer à ce jury.

Monsieur le Professeur Bernard Muller, je vous remercie aussi de m'avoir accueillie à l'UFR de Pharmacie et de m'avoir donné la chance d'enseigner aux étudiants de pharmacie par ce poste d'ATER qui clôture ma thèse. Cette expérience de l'enseignement a été très appréciable, je me suis beaucoup épanouie dans ce travail.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Roger Marthan, pour m'avoir accueillie au sein de l'unité et m'avoir encouragée à poursuivre dans cette voie. Je vous remercie pour votre bienveillance, votre disponibilité et votre écoute.

Je tiens aussi à faire mention des Professeurs, Docteurs et formateurs rencontrés tout au long de mon cursus : le Professeur Michel Vidal, le Docteur Sylvain Broussy, le Docteur Gilles Ferry, le Professeur Giorgi-Renault et Madame Aude Legall. Merci de votre soutien tout au long de ce travail, les encouragements et vos précieux conseils sur ma future orientation. Sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui. De la même façon, je voudrais remercier Monsieur Mario Squelard. Mario, vous avez pris le temps de me connaître, de me parler, de m'aider, vous m'avez fourni de précieux conseils pour mon avenir, je tiens à vous témoigner toute ma gratitude.

Au laboratoire plus particulièrement :

J'adresse un très grand MERCI à toute l'unité INSERM U1045. Merci de votre présence, votre aide et votre soutien au quotidien, ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre SAVINEAU et le Docteur Christelle GUIBERT je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe. Docteur Christelle Guibert, merci de m'avoir fait part de votre expérience, et de m'avoir encouragée à poursuivre. Monsieur le Professeur Jean-Pierre Savineau, merci pour votre accompagnement et votre soutien lors du congrès du GRRC.

J'adresse aussi un très grand merci à tous les membres du laboratoire,

Jean-Francois, merci pour tous les échanges scientifiques, ta gentillesse et ta bonne humeur quotidienne.

Merci à vous aussi, Véronique, Mathilde, Fabrice et Marianne de m'avoir si bien accueillie et formée pour cet ATER en Pharmacie ! J'ai vraiment passé de très bons moments à vos coté !

Merci à Marilyne, Elise, Paul, Isabelle D, Isabelle B, Benoit, Guillaume, Fabienne, Marielle, Franck, Olga (team kiné U1045 !) et Jennifer d'avoir été là au quotidien. Je n'oublierais pas votre aide, vos conseils, votre soutien moral et ces nombreux fous rire qui ont ponctué ma thèse et grandement participé au bon déroulement de celle ci.

Evidemment un immense merci à l'ensemble des « lofteurs » présents comme passés, Thibaud, Florence, Juliette, Amandine, Hannah, Audrey, Mathieu, Pauline, Raphaël, Noémie et Valérie (même si son bureau est délocalisé) !

Au top des masters 2, Valentin, Nichi, Olivier et Manel, ainsi qu'à Romain, Nicolas, Lucille et Laura, la crème des SIR !

Pas seulement des collègues, parmi vous j'ai rencontré de vrais amis.

Aux nouveau Master 1 et stagiaire de cette années Hugo, Lucas, Lucie et Solène, la couleur de ma thèse vous remercie du temps que vous lui avez accordé ! (« Christina a dit... ! ») ! Bon courage à vous pour la suite !

Merci aussi aux meilleures des secrétaires, Lebna, Armelle, Celia, et Céline, toujours à l'écoute et très très arrangeantes malgré toute la paperasse administrative ! Merci pour tout et encore désolée pour ces commandes de dernière minutes !

Et pour finir avec l'unité, au top des agents d'entretiens, Djamila, Rose, et Etiennette, merci pour votre bonne humeur au quotidien !

A mes amis, les bordelais d'adoptions,

Sebastien, Antoine (Le vrai Bordelais), mes mousquetaires de toujours, Frank, Pedro, merci pour ces nombreuses soirées et tous ces moments qui ont permis d'apporter l'équilibre nécessaire à ma vie de thésarde. Merci d'avoir été et d'être là.

A l'IECB,

Elisabeth Genot, Florian (sans toi aux GRRC, ça n'aurait pas été la même), Isabelle F, William, Thierry, Myriam, Eric, Albano, Joan, Daniel, Richard, Camille, Eduard, Arthur, Antoine S, Antoine A, Antoine M (beaucoup trop d'Antoine), Ben, Caro, Marti, sans oublier Diane et Léonie, les organisatrices des superbes PhD dinner, et j'oublie certainement beaucoup de gens, je m'en excuse, merci de votre présence et votre soutien !

A mes amis de Paris, qui malgré la distance ont toujours été présents,

à mes Docteurs Anne, Daphné, Lorry, Julien, Baptiste, Julia, Sophie, Bastien....

et à Nicolas, mon co-thésard de Paris 😊 (ouais t'es pas encore dans la liste des doc :p !)

sans oublié Adrien, Johann, Loic...

et évidemment Eléna, Marion, Martin, Luc, Nicolas, Paul, ces amitiés du lycée qui durent et dureront toujours...

à Malo, mon filleul, puisse cette thèse t'aider à t'endormir ;),

je vous adore et vous remercie sincèrement d'être à mes cotés depuis toutes ces années !!

A ma famille,

à mes parents, pour leur soutien et encouragement, d'être à mes cotés au quotidien et d'avoir fait de moi ce que je suis,

à mes frères, Damien, Vivien et Franck (ca y est je finis ! (enfin presque...plus que la thèse de pharma... haha !). A mes belles sœurs ; et à mes neveux et nièces, dont ma filleule Jeanne-Gabrielle, mes rayons de soleil.

à mes oncles et tantes arcachonnais, toujours disponibles pour un moment de détente, le rugby, the voice, les pizzas, le guacamole, les bons repas et les journées en mer ; Et spécialement aussi à mon oncle Didier, le puits de sciences,

à ma petite cousine Carla, ma petite sœur qui grandit trop vite,

à l'ensemble de ma famille proche comme éloignée, présent ce jour ou dans mon cœur,

je vous remercie tous autant que vous êtes, j'ai beaucoup de chance de vous avoir à mes cotés.

Et je rajouterais, Maman, encore merci d'avoir consacré autant de temps à ma thèse, de par, entre autre, tes NOMBREUSES relectures !!!

A tous, et à tous ce que j'ai malheureusement oublié de citer,

MERCI

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
TABLE DES MATIERES	vii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xix
LISTE DES TABLEAUX	xxv
INTRODUCTION.....	1
I. La circulation pulmonaire.....	3
1. Généralités : rôle et organisation.....	3
2. Organisation de l'artère intrapulmonaire	6
a. L' <i>intima</i> et les cellules endothéliales.....	7
b. La <i>media</i> et les cellules musculaires lisses des artères intrapulmonaires	9
c. L'adventice et les fibroblastes	9
II. L'Hypertension pulmonaire	13
1. Définition et généralités.....	13
2. Classification.....	15
3. Aspects tissulaire et cellulaire	19
a. L'inflammation	19
b. La vasoréactivité.....	22
c. Le remodelage artériel	24
i. L' <i>intima</i> et les cellules endothéliales.....	26
ii. La <i>media</i> et les CMLAP	29
iii. L'adventice et les fibroblastes	30
4. Les différents modèles animaux d'hypertension pulmonaire.....	32
a. Modèle groupe 1 : l'hypertension pulmonaire induite par l'injection de monocrotaline	32
b. Modèle groupe 3 : l'hypertension pulmonaire induite par exposition à une hypoxie chronique	33
c. Autres modèles d'hypertension pulmonaire (liste non exhaustive)	36
i. Modèles sévères mimant l'hypertension pulmonaire de groupe 1	36
ii. Modèles animaux génétiquement modifiés	37
iii. Modèle hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né	38
5. Les traitements.....	38
a. Les traitements médicamenteux spécifiques.....	38
i. Les inhibiteurs de l'influx calcique.....	39
ii. La voie de la prostacycline.....	39

iii. La voie de l'endothéline	40
iv. La voie du NO	40
b. Les traitements non spécifiques.....	41
c. Les traitements non médicamenteux.....	41
d. Vers de nouvelles pistes de traitements	42
III. Les canaux TRP et l'hypertension pulmonaire	45
1. L'importance de l'homéostasie calcique	45
2. Les canaux mécanosensibles	49
3. Les canaux TRP et l'hypertension pulmonaire	51
a. La classification des canaux et leurs structures	51
b. L'activation des TRP	54
4. L'isoforme TRPV4	55
a. La structure du canal TRPV4.....	55
b. Les différents modes d'activation de TRPV4.....	56
c. L'implication de TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire	60
i. Etat de l'art.....	60
ii. TRPV4, fibroblaste et HTP ?.....	61
OBJECTIFS	65
MATERIEL ET METHODES.....	69
I. Animaux	71
1. Rats	71
2. Souris « sauvages » et mutées pour le gène codant pour le canal TRPV4.....	71
a. Souris « sauvages ».....	71
b. Souris « knock-out » pour le gène <i>trpv4</i>	72
3. Modèles animaux d'hypertension pulmonaire	73
a. Le modèle animal d'hypertension pulmonaire de groupe 1 induit par la monocrotaline	73
i. Modèle d'hypertension pulmonaire de groupe 1 chez le rat.....	73
ii. Modèle d'hypertension pulmonaire de groupe 1 chez la souris.....	73
b. Le modèle animal d'hypertension pulmonaire de groupe 3 induit par une exposition hypoxique chronique.....	74
4. Euthanasie des animaux.....	74
II. Remodelage cardiaque et vasculaire.....	75
1. Etude du remodelage cardiaque : le rapport de Fulton	75
2. Mesure de la pression ventriculaire droite systolique par cathétérisme invasif	75

3.	Mesure du remodelage artériel pulmonaire par morphométrie.....	76
a.	Réalisation des coupes histologiques des poumons de souris.....	76
i.	Déshydratation des tissus et inclusion en paraffine.....	76
ii.	Réalisation des coupes de poumon.....	76
iii.	Déparaffinage et la coloration "Elastica van Gieson".....	76
iv.	Quantification du remodelage adventiciel.....	77
v.	Quantification du remodelage de la media.....	78
III.	Culture des fibroblastes adventiciels d'artères intrapulmonaires.....	79
1.	Microdissection des poumons de rats.....	79
2.	Caractérisation du tissu adventiciel.....	80
3.	Obtention des fibroblastes adventiciels d'artères intrapulmonaires.....	80
4.	Culture des fibroblastes adventiciels d'artères intrapulmonaires.....	81
5.	Temps de dédoublement des cellules.....	82
IV.	Etude du canal TRPV4.....	83
1.	Mise au point des siRNA.....	83
a.	Principe et produits utilisés.....	83
b.	Protocole.....	83
2.	Caractérisation de la présence de l'ARNm de <i>trpv4</i> par retrotranscriptase et PCR quantitative.....	84
a.	Obtention des ADN complémentaires.....	84
b.	PCR quantitative.....	85
3.	Immunomarquages.....	87
a.	Immunomarquage sur tissus : immunohistochimie.....	87
b.	Immunomarquage sur cellules : immunocytochimie.....	88
i.	Phénotypage.....	88
ii.	Expression du canal TRPV4 sur cellules vivantes.....	89
c.	Acquisition des images.....	89
4.	Etude de la fonctionnalité du canal TRPV4 : mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ par utilisation de la sonde calcique Fluo-4 AM.....	90
a.	Principe.....	90
b.	Protocole.....	92
5.	Etude de la viabilité cellulaire.....	93
a.	Principe.....	93
b.	Protocole.....	93
6.	Quantification de l'expression protéique par la technique du Western Blot.....	94

a.	Préparation des échantillons.....	94
b.	Migration et transfert.....	95
c.	Marquage immunologique : révélation et analyse	95
7.	Etude de la prolifération cellulaire.....	96
c.	Principe.....	96
d.	Protocole	96
8.	Etude de la dégradation de la MEC.....	97
a.	Principe.....	97
b.	Protocole	97
c.	Analyse	98
9.	Etude de la migration cellulaire.....	99
a.	Principe.....	99
b.	Protocole	99
10.	Listes des anticorps, des agents pharmacologiques et des solutions utilisés pour l'étude	100
11.	Analyse statistique des résultats.....	102
RESULTATS ET DISCUSSION		103
I. Implication du canal TRPV4 dans le remodelage adventitial pulmonaire lors de l'hypertension pulmonaire		109
1.	Quantification de l'expression de TRPV4 dans l'adventice de rat souffrant d'hypertension pulmonaire	109
a.	Récupération du tissu adventitial.....	109
i.	Nature du tissu	109
ii.	Expression de TRPV4 au niveau du tissu adventitial	111
b.	Variation de l'expression du canal TRPV4 au cours de l'hypertension pulmonaire.....	113
i.	Mise en place de l'hypertension pulmonaire.....	113
ii.	Quantification de l'expression du canal TRPV4.....	115
2.	Implication du canal TRPV4 dans le développement de l'hypertension pulmonaire	117
a.	TRPV4 & augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne	118
b.	TRPV4 & remodelage cardiaque.....	120
c.	TRPV4 & remodelage des artères intrapulmonaires.....	122
3.	Discussion générale	125
II. Rôle des canaux TRPV4 dans la physiologie cellulaire des fibroblastes		129
1.	Mise au point de l'obtention des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires	129
a.	Obtention des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	129
b.	Temps de dédoublement des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	133

2.	Caractérisation du canal TRPV4 dans les FAP	134
a.	Expression de la protéine	134
b.	Fonctionnalité du canal	136
c.	Mise au point du siRNA	140
i.	Conditions expérimentales.....	140
ii.	Fonctionnalité du canal pour les cellules transfectées	145
3.	Implication du canal TRPV4 dans les phénomènes cellulaires associés au remodelage adventiciel.....	147
a.	TRPV4 & prolifération.....	147
b.	TRPV4 & migration et invasion cellulaires.....	152
i.	La migration cellulaire	152
ii.	L'invasion cellulaire	156
c.	TRPV4 & production de matrice extracellulaire	161
4.	Discussion générale	166
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	169
	BIBLIOGRAPHIE	177
	ANNEXES.....	195
	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	197
	FORMATIONS.....	199
	EXPERIENCES D'ENSEIGNEMENT.....	199

LISTE DES ABREVIATIONS

[Ca ²⁺] _i	Concentration calcique intracellulaire
α -SMA	α -actine du muscle lisse
AIP	Artère IntraPulmonaire
Akt	Protéine kinase B
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
Cav	Cavéoline
CCDV	Canaux Calciques Dépendants du Voltage
CE	Cellules Endothéliales
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CMLAP	Cellules Musculaires Lisses d'Artères intraPulmonaires
CO ₂	diOxyde de Carbone
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
eNOS	NO Synthase endothéliale
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FAP	Fibroblastes Adventitiels d'Artères intraPulmonaires
GMP	Guanine MonoPhosphate
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HC	Hypoxie Chronique
HTAP	HyperTension Artérielle Pulmonaire
HTP	HyperTension Pulmonaire
IL	InterLeukine
IP ₃	Inositol trisPhosphate
K ⁺	Potassium
KO	Knock – Out
MCT	MonoCroTaline
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMP	MétalloProtéinase Matricielles
NO	Monoxyde d'azote
O ₂	diOxygène
PAPm	Pression Artérielle Pulmonaire moyenne
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymérase Chain Reaction

PDE - 5	PhosphoDiEstérase - 5
PDGF	Platelet -derived growth factor
PFA	ParaFormAldéhyde
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PLC	PhosphoLipase C
PMCA	Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPase
PO ₂	Pression partielle en diOxygène
RE	Réticulum Endoplasmique
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RIP3	Récepteur à l'IP3
ROCK1	RhO-associated, Coiled-coil-containing protein Kinase 1
RS	Réticulum Sarcoplasmique
RVP	Résistance Vasculaire Périphérique
RyR	Récepteur à la Ryanodine
SAC	Stretch-Activated Channel
SERCA	Sarco/Endoplasmic Réticulum Ca ²⁺ ATPase
siRNA	small interfering RNA
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TNF-α	Tumor Necrosis-Factor α
TRP	Transient Receptor Potential
TRPV4	Transient Receptor Potential Vanilloid 4
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
vWF	Facteur de von Willebrand

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La circulation sanguine	4
Figure 2 : La circulation pulmonaire	5
Figure 3 : Schéma d'une artère intrapulmonaire	6
Figure 4 : Représentation des forces mécaniques agissant sur une artère	8
Figure 5 : Composition cellulaire de l'adventice d'artère intrapulmonaire.	10
Figure 6 : Rôle des fibroblastes	12
Figure 7 : Cathétérisme cardiaque droit	14
Figure 8 : Photographies représentatives de lésions anatomo-pathologiques d'artères intrapulmonaires humaines de patients souffrant d'HTAP	25
Figure 9 : Représentation schématique des différentes hypothèses quant à l'origine des cellules responsables de l'épaississement de la <i>media</i> et de l' <i>intima</i>	26
Figure 10 : Physiopathologie de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP).....	28
Figure 11 : Coupes histologiques d'artères intrapulmonaires de modèles de rats monocrotaline, hypoxie chronique ou de modèle combiné.....	35
Figure 12 : Schéma de la signalisation calcique	47
Figure 13 : Mécanismes d'activation des SAC.....	50
Figure 14 : Arbre phylogénique de la superfamille des canaux TRP « Transient Receptor Potential »	52
Figure 15 : Représentation de l'organisation des différents domaines des canaux TRP	53
Figure 16 : Structure du canal TRPV4	56
Figure 17 : Activité du canal TRPV4 en réponse à divers stimuli	58
Figure 18 : Méthodologie de la quantification de la surface de l'adventice.....	78
Figure 19 : Dissection du lobe gauche du poumon de rat	79
Figure 20 : Protocole de qPCR du gène <i>trpv4</i>	86
Figure 21 : Sonde Fluo-4 AM	91
Figure 22 : Isolement de l'adventice de l'artère intrapulmonaire	110

Figure 23 : Expression du canal TRPV4 dans l'artère intrapulmonaire et l'adventice	111
Figure 24 : Etude de l'hypertrophie cardiaque droite des rats issus de différents modèles d'HTP	114
Figure 25 : Quantification de l'expression du canal TRPV4 dans l'adventice des artères intrapulmonaires des rats issus de différents modèles d'HTP.....	115
Figure 26 : Mesure de la pression ventriculaire systolique droite de souris <i>trpv4^{+/+}</i> et <i>trpv4^{-/-}</i> issues de deux modèles d'HTP	118
Figure 27 : Etude de l'hypertrophie cardiaque droite de souris <i>trpv4^{+/+}</i> et <i>trpv4^{-/-}</i> issues de deux modèles d'HTP.....	120
Figure 28 : Comparaison du remodelage cardiaque de deux modèles d'HTP différents chez les souris <i>trpv4^{+/+}</i>	121
Figure 29 : Quantification du remodelage pulmonaire de souris chez les souris <i>trpv4^{+/+}</i> et <i>trpv4^{-/-}</i> issues de deux modèles d'HTP	124
Figure 30 : Culture des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires à partir des explants d'adventice	130
Figure 31 : Phénotypage de culture de fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires	131
Figure 32 : Mise en évidence de la différenciation des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	132
Figure 33 : Etude du temps de dédoublement des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	133
Figure 34 : Caractérisation de l'expression de TRPV4 dans les cultures de fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	135
Figure 35 : Comparaison des réponses calciques produites par deux activateurs sélectifs du canal TRPV4 dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	137
Figure 36 : Effet de l'inhibiteur HC067147 sur l'amplitude des réponses calciques induites par le GSK1016790A dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	138
Figure 37 : Réponse calcique induite par les canaux Piezo1 en présence de l'inhibiteur de TRPV4 (HC067047) dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires	139
Figure 38 : Détermination des conditions optimales d'extinction de l'ARNm de <i>trpv4</i> dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires	141

Figure 39 : Diminution de l'expression de l'ARNm de <i>trpv4</i> en présence des siRNA	142
Figure 40 : Effet de la transfection avec les siRNA sur la viabilité des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires	142
Figure 41 : Diminution de l'expression de la protéine TRPV4 dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires transfectées avec les siRNA	144
Figure 42 : Effet des siRNA sur l'amplitude des réponses calciques induites par le GSK1016790A dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	146
Figure 43 : Prolifération des fibroblastes adventitiels en réponse à la stimulation du canal TRPV4	148
Figure 44 : Viabilité des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires en présence de l'inhibiteur HC067047	149
Figure 45 : Effet des conditions de transfection sur la prolifération basale des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	149
Figure 46 : Effet de la diminution de l'expression du canal TRPV4 sur la prolifération basale des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires	150
Figure 47 : Effet de la diminution de l'expression du canal TRPV4 sur la prolifération des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires induite par l'activateur GSK1016790A	151
Figure 48 : Migration des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires en en réponse à la stimulation du canal TRPV4	153
Figure 49 : Effet des conditions de transfection sur la migration basale des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.....	154
Figure 50 : Effet de la diminution de l'expression du canal TRPV4 sur la migration des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires induite par l'activateur GSK1016790A	155
Figure 51 : Dégradation de la gélatine par les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires en réponse à la stimulation du canal TRPV4	157
Figure 52 : Effet des conditions de transfection sur la dégradation basale de la gélatine par les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires	158

Figure 53 : Effet de la diminution de l'expression du canal TRPV4 et du blocage de l'activité du canal TRPV4 sur dégradation basale de la gélatine par les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires 159

Figure 54 : Production de collagène I et de fibronectine par les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires en réponse à la stimulation du canal TRPV4 162

Figure 55 : Effet des conditions de transfection sur la production basale de collagène I et de fibronectine par les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires 163

Figure 56 : Effet de la diminution de l'expression du canal TRPV4 sur la production de collagène I et de fibronectine par les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires induite par l'activateur GSK1016790A 164

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de l’hypertension pulmonaire.....	18
Tableau 2 : Liste des produits utilisés pour la transfection	84
Tableau 3 : Liste des paires d’amorces utilisées pour la PCR quantitative en temps réel	85
Tableau 4 : Liste des anticorps primaires.....	100
Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires et autres produits de marquage cellulaire.....	101
Tableau 6 : Liste des agents pharmacologiques utilisés	101
Tableau 7 : Liste des solutions / tampons utilisé(e)s	102

INTRODUCTION

I. La circulation pulmonaire

1. Généralités : rôle et organisation

La circulation sanguine (**Figure 1**), décrite pour la première fois par le médecin anglais William Harvey en 1628 [1], se compose de deux circulations : la circulation systémique, aussi appelée grande circulation, et la circulation pulmonaire, la petite circulation.

La grande circulation est un système à haute pression, la pression maximale atteignant chez le sujet normal de 100 à 140 mmHg dans l'aorte et dans ses branches. Elle a pour rôle de fournir aux différents organes les nutriments, tels que le dioxygène (O_2), nécessaires à leur bon fonctionnement. Elle débute au niveau du cœur gauche où le sang est éjecté par contraction du ventricule gauche vers l'aorte et ses nombreuses ramifications afin d'alimenter en nutriments les différents organes du corps humain. Puis, le sang dépourvu d'oxygène et chargé de gaz carbonique, appelé sang veineux, retourne au cœur droit par les veines caves au niveau de l'oreillette droite où il rejoindra la circulation pulmonaire par contraction du ventricule droit.

La circulation pulmonaire permet la réoxygénation et l'élimination du gaz carbonique dont le dioxyde de carbone (CO_2) du sang veineux. C'est un système à haut débit (elle reçoit 100 % du débit cardiaque) mais à basse pression : la Pression Artérielle Pulmonaire moyenne (PAPm) est de 15 mmHg au repos chez les sujets sains.

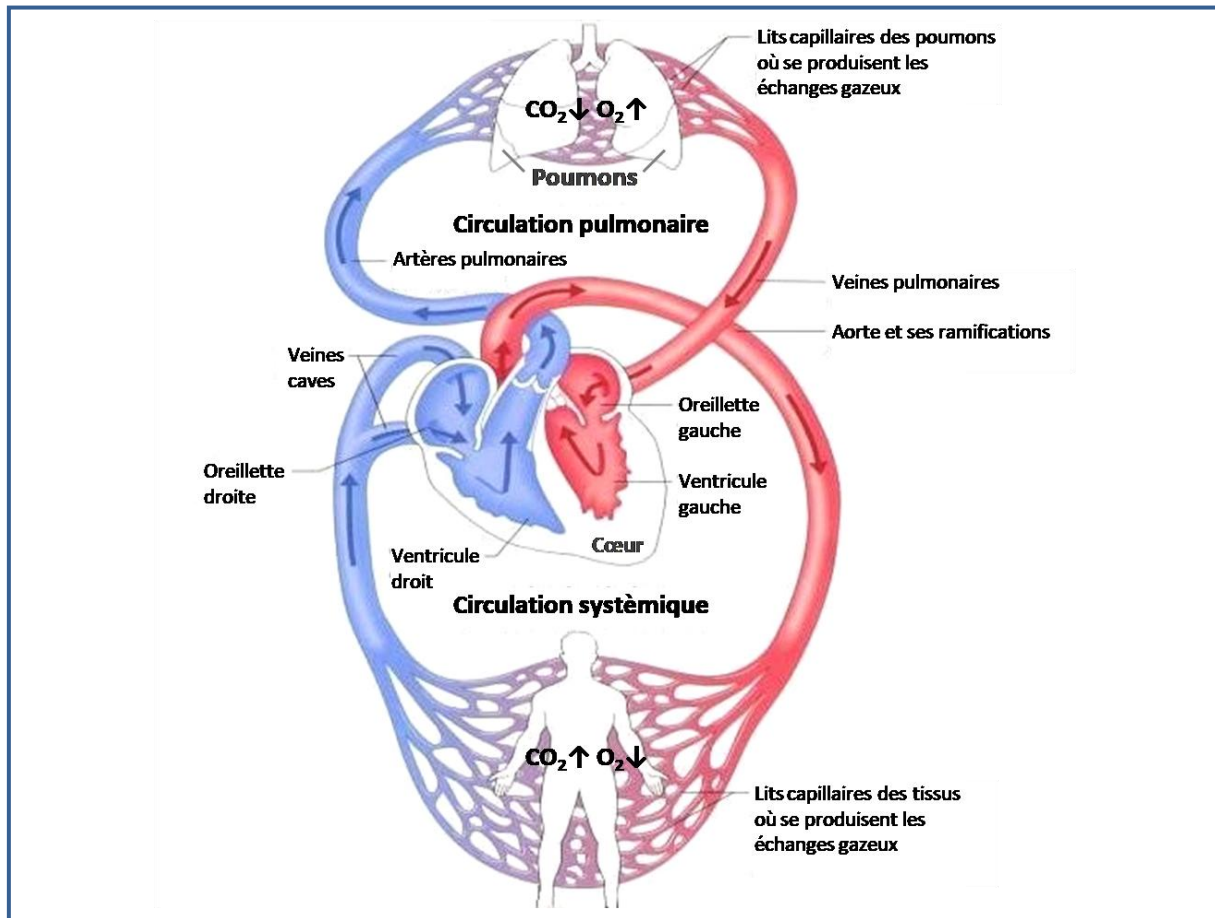


Figure 1 : La circulation sanguine

D'après <https://lecorpshumain.fr>, la circulation pulmonaire

Le sang pauvre en O₂ et riche en CO₂ (en bleu) arrive par les veines caves à l'oreillette droite du cœur puis est éjecté par contraction du ventricule droit dans la circulation pulmonaire rechargeant ainsi le sang en O₂. Le sang réoxygéné (en rouge) rejoint via les veines pulmonaires le cœur gauche (au niveau de l'oreillette gauche) et est renvoyé dans la circulation systémique via l'aorte et ses nombreuses ramifications par contraction du ventricule gauche permettant ainsi la réalimentation en O₂ de l'ensemble des organes du corps humain.

D'un point de vue anatomique (**Figure 2**), le sang veineux est éjecté par le ventricule droit dans l'Artère ExtraPulmonaire (AEP), qui se subdivise en deux afin d'alimenter les deux poumons. Ces artères deviennent les Artères IntraPulmonaires (AIP) à leur entrée dans les différents lobes composant les poumons. Chez l'Homme, on retrouve trois lobes droits et deux gauches alors que chez le rat et la souris, il y a quatre lobes droits et un gauche. Les AIP se ramifient alors (17 embranchements chez l'Homme contre 11 chez le rat), suivant le

système respiratoire, en artères de plus en plus fines (les artérioles) jusqu'aux alvéoles où elles ne sont plus que de simples capillaires. C'est à ce niveau que l'on retrouve la barrière alvéolo-capillaire où ont lieu les échanges gazeux.

Après réoxygénation, le sang regagne le cœur par les veinules, les veines puis de plus grosses veines appelées les veines pulmonaires qui débouchent dans l'oreillette gauche.

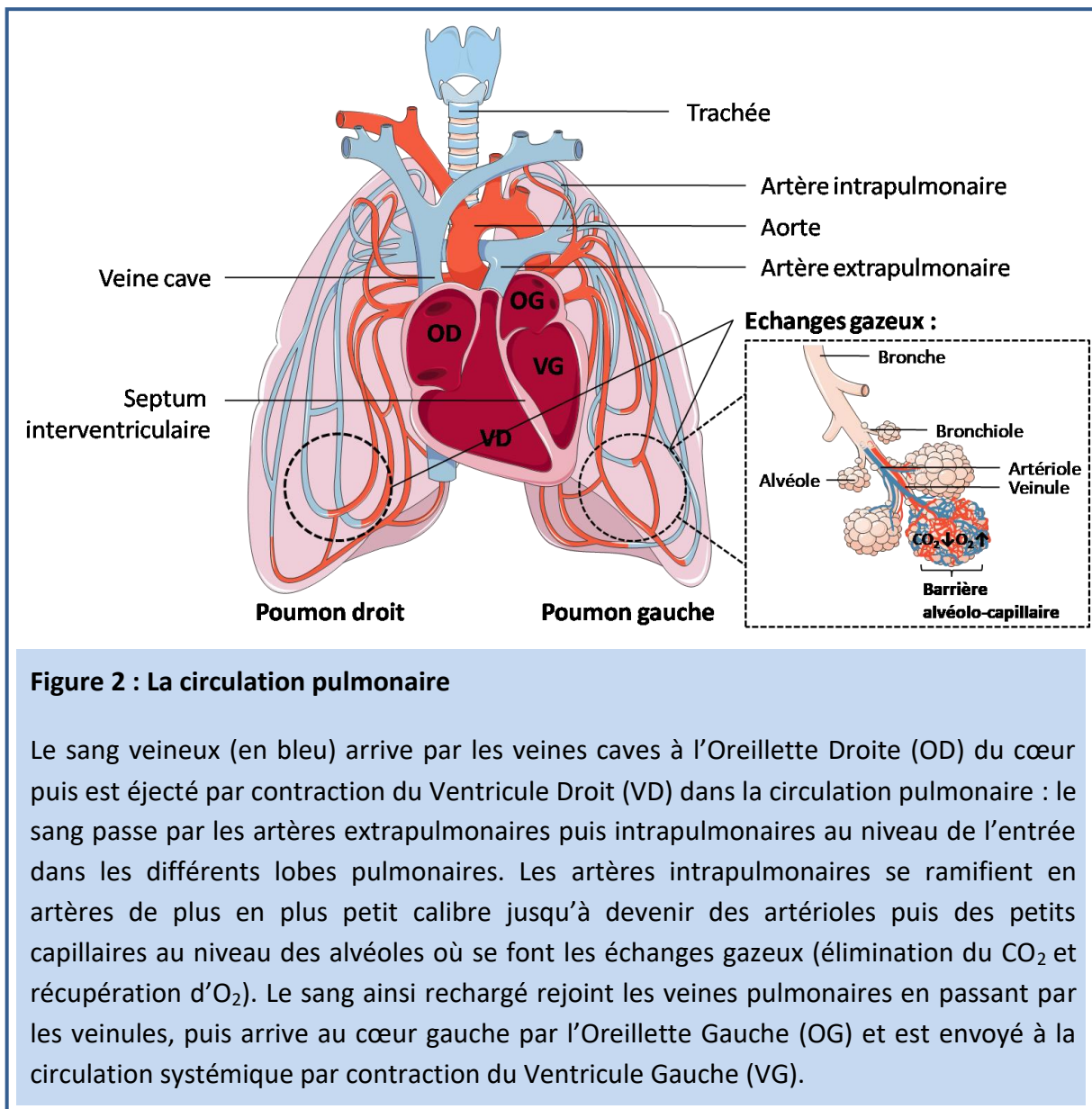


Figure 2 : La circulation pulmonaire

Le sang veineux (en bleu) arrive par les veines caves à l'Oreillette Droite (OD) du cœur puis est éjecté par contraction du Ventricule Droit (VD) dans la circulation pulmonaire : le sang passe par les artères extrapulmonaires puis intrapulmonaires au niveau de l'entrée dans les différents lobes pulmonaires. Les artères intrapulmonaires se ramifient en artères de plus en plus petit calibre jusqu'à devenir des artérioles puis des petits capillaires au niveau des alvéoles où se font les échanges gazeux (élimination du CO₂ et récupération d'O₂). Le sang ainsi rechargé rejoint les veines pulmonaires en passant par les veinules, puis arrive au cœur gauche par l'Oreillette Gauche (OG) et est envoyé à la circulation systémique par contraction du Ventricule Gauche (VG).

2. Organisation de l'artère intrapulmonaire

Les AIP ont une structure similaire aux autres artères de l'organisme. Elles se structurent en trois tuniques concentriques individualisées par la présence d'une limitante élastique (composée de collagène et d'élastine). Ainsi, de la lumière du vaisseau à l'extérieur, nous distinguons l'*intima*, la *media* et l'*adventice* (**Figure 3**). Chaque couche possède des caractéristiques histologiques et fonctionnelles spécifiques contribuant ensemble au maintien et à la régulation de l'homéostasie du système cardio-vasculaire.

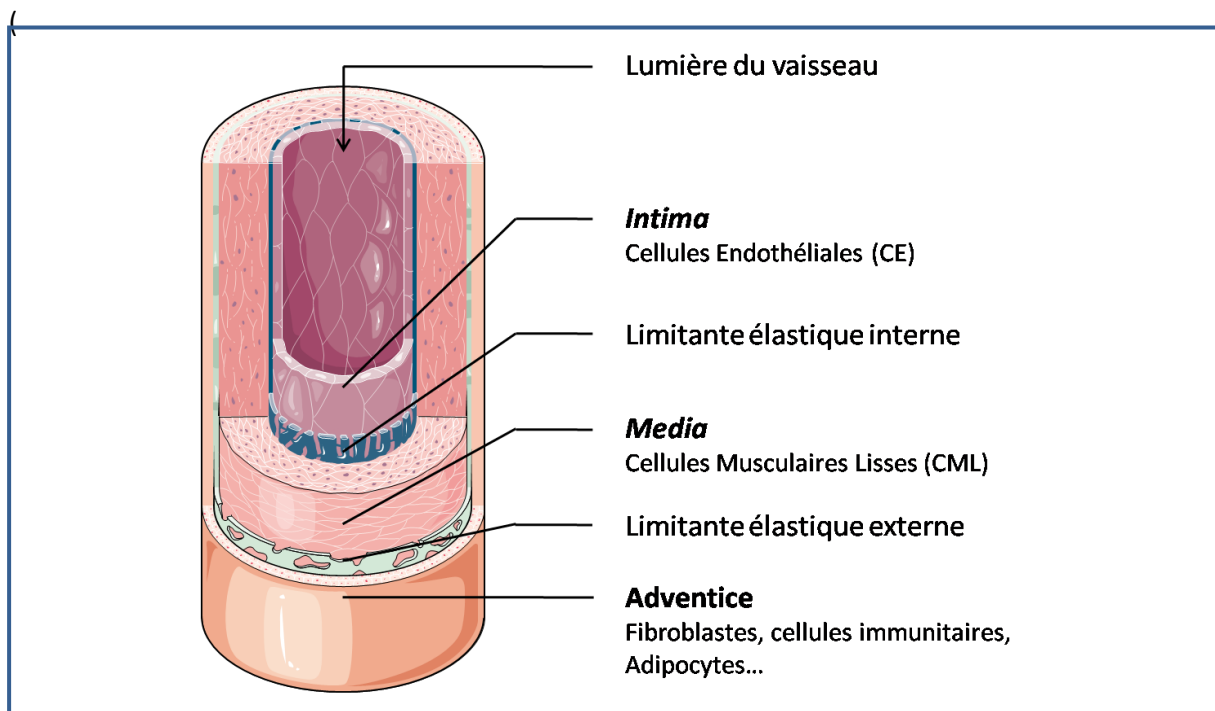


Figure 3 : Schéma d'une artère intrapulmonaire

Les Artères IntraPulmonaire (AIP) se composent de trois couches concentriques appelées tuniques. De la lumière à l'extérieur de l'artère, on distingue l'*intima* (monocouche de CE) séparée de la *media* (superposition de couches de CML) par la limitante élastique interne. La *media* est à son tour séparée de l'*adventice* (tunique complexe majoritairement composée de fibroblastes) par la limitante élastique externe.

a. L'*intima* et les cellules endothéliales

L'*intima* est la tunique au contact du flux sanguin. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) jointives, l'endothélium, reposant sur une fine couche principalement composée de collagène, la lame basale. L'endothélium forme ainsi une couche imperméable, canalisant la diffusion du sang dans le corps. D'un point de vue phénotypique, les CE ont la caractéristique d'exprimer le facteur de von Willbrand (un des éléments nécessaires à l'hémostase primaire), permettant ainsi de les distinguer de manière certaine des autres cellules de l'artère.

L'endothélium vasculaire est un organe très actif. Son positionnement stratégique, entre le sang et les tissus, permet aux CE de recevoir directement les signaux provenant de la circulation sanguine ou des autres tuniques, et de communiquer avec leur environnement cellulaire (en particulier les cellules musculaires lisses de la *media*). Ces signaux peuvent provenir de la présence de molécules dans la circulation sanguine, de variations de pressions osmotiques ou de pressions partielles artérielles en dioxygène. Ils peuvent aussi être dûs à des contraintes physiques comme les contraintes de cisaillements occasionnées par le flux sanguin et les augmentations de pression intraluminale qui génèrent des tensions pariétales (**Figure 4**).

En réponse à ces signaux, les cellules endothéliales vont être capables de sécréter des facteurs vasodilatateurs tels que l'oxyde nitrique (NO), la prostacycline, le facteur hyperpolarisant, des facteurs vasoconstricteurs, tels que l'endothéline, l'angiotensine, le tromboxane A₂, et des agents de la réponse inflammatoire comme des cytokines et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) [2]–[4].

L'endothélium a donc des effets tissulaires et cellulaires importants de par ses rôles centraux dans l'hémostase, la perméabilité vasculaire, la prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle et dans le tonus vasculaire [5].

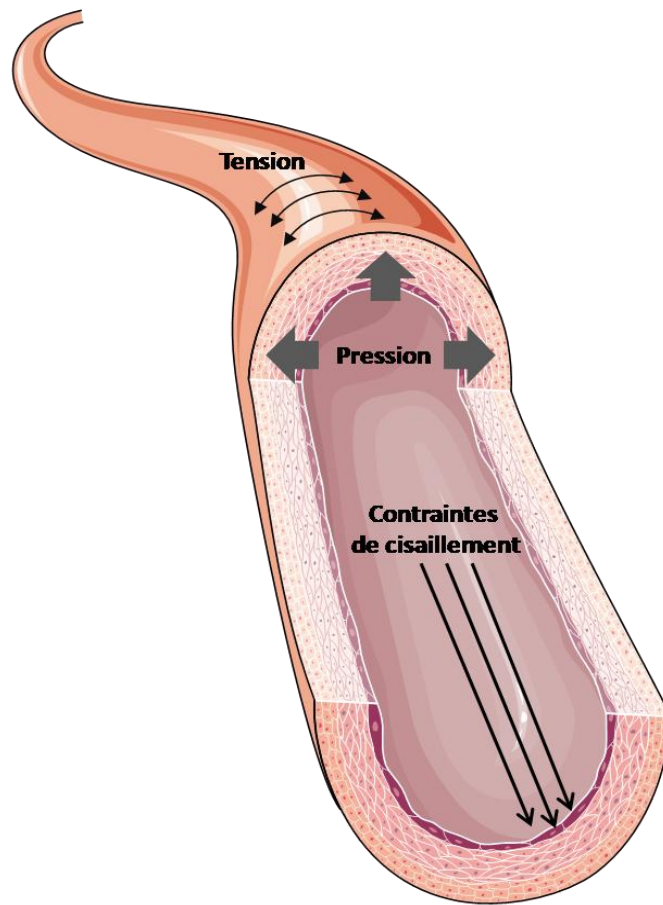


Figure 4 : Représentation des forces mécaniques agissant sur une artère

Le flux sanguin qui exerce des forces de frottement appelées contraintes de cisaillement ou « shear stress » et la pression sanguine qui exerce des forces perpendiculaires à l'endothélium, génèrent des tensions pariétales sur l'artère régulant l'activité des différentes tuniques.

b. La *media* et les cellules musculaires lisses des artères intrapulmonaires

La *media* est formée de couches de Cellules Musculaires Lisses (CML) appelées Cellules Musculaires Lisses d'Artère intraPulmonaire (CMLAP) disposées de façon concentrique et bordées de lames élastiques. Les CMLAP sont des cellules fusiformes qui se distinguent des autres cellules par l'expression de protéines contractiles comme l'actine alpha du muscle lisse (α -SMA), leur conférant ainsi leur propriété contractile. Ainsi, dans une artère saine, les CML ont pour rôle essentiel la vasomotricité du vaisseau. Par des phénomènes de contraction et de relaxation, ces cellules vont permettre de contrôler le flux sanguin et de distribuer au mieux le sang dans les différentes ramifications.

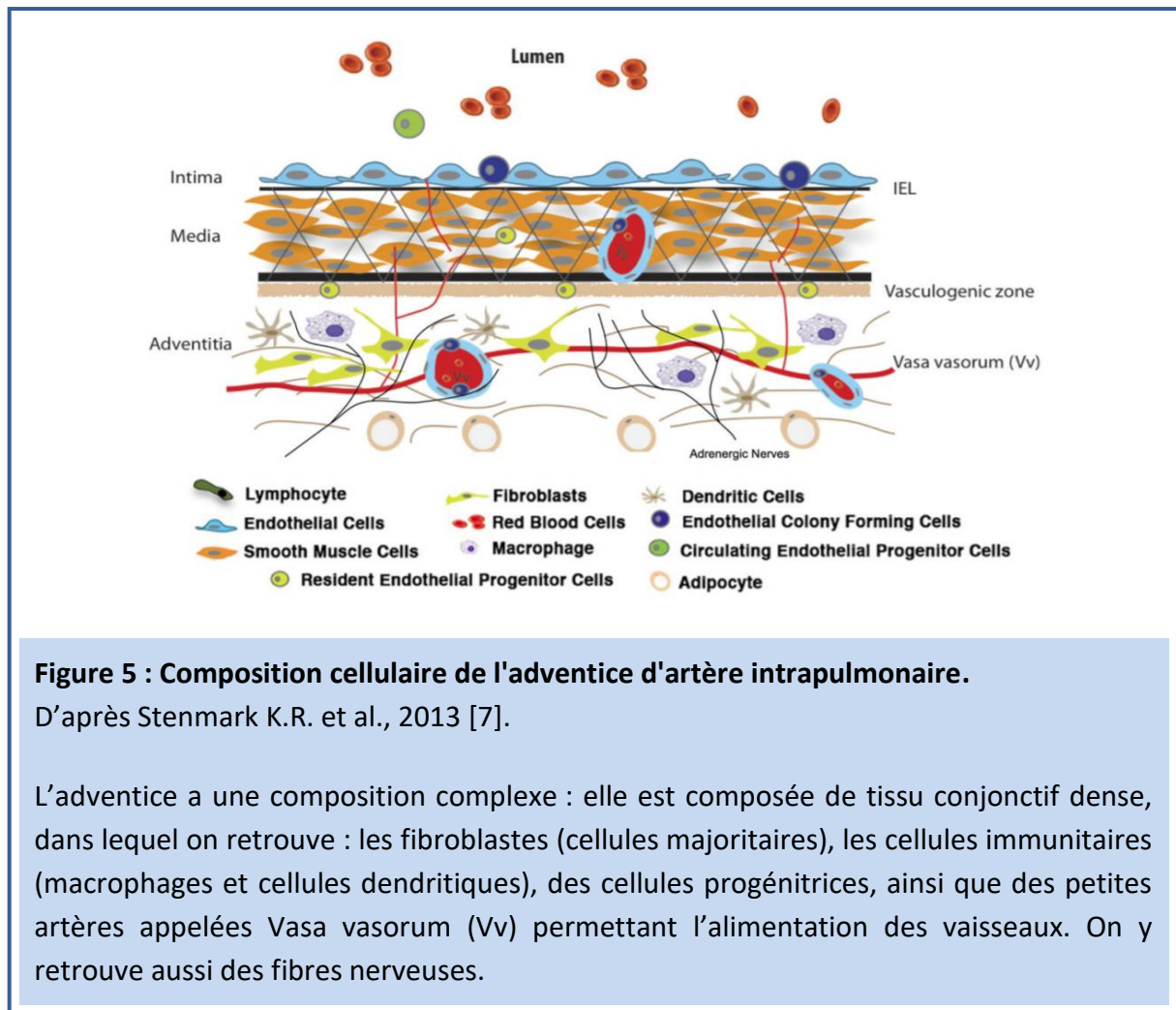
A l'entrée des poumons, la *media* des AIP est épaisse et possède plus de lames élastiques. En progressant dans les ramifications, cette tunique s'affine pour finir par ne représenter qu'une simple couche de cellules musculaires lisses dans les artérioles.

c. L'adventice et les fibroblastes

L'adventice est la partie la moins bien décrite de l'artère. Elle a été tout d'abord connue pour son rôle de protection et de soutien de la structure du vaisseau. Contrairement aux deux autres tuniques, l'adventice a une structure hétérogène (**Figure 5**) : elle est composée de tissu conjonctif dense (principalement des fibres de collagène et des fibres élastiques) dans lequel « baignent » différents types de cellules, des fibroblastes qui sont les cellules majoritaires, des cellules immunitaires (macrophages et des cellules dendritiques), des cellules progénitrices, ainsi que des petites artères appelées *Vasa vasorum* (Vv) qui permettent l'apport en nutriments aux vaisseaux. On y retrouve aussi des fibres nerveuses appartenant au système végétatif, motrices pour l'innervation des fibres musculaires lisses et sensibles.

Tout comme la *media*, l'épaisseur et la complexité de l'adventice s'amointrit avec la diminution du calibre de l'artère intrapulmonaire. Ainsi dans les artérioles, l'adventice ne

représente plus qu'une fine couche et ne contient plus de Vv.



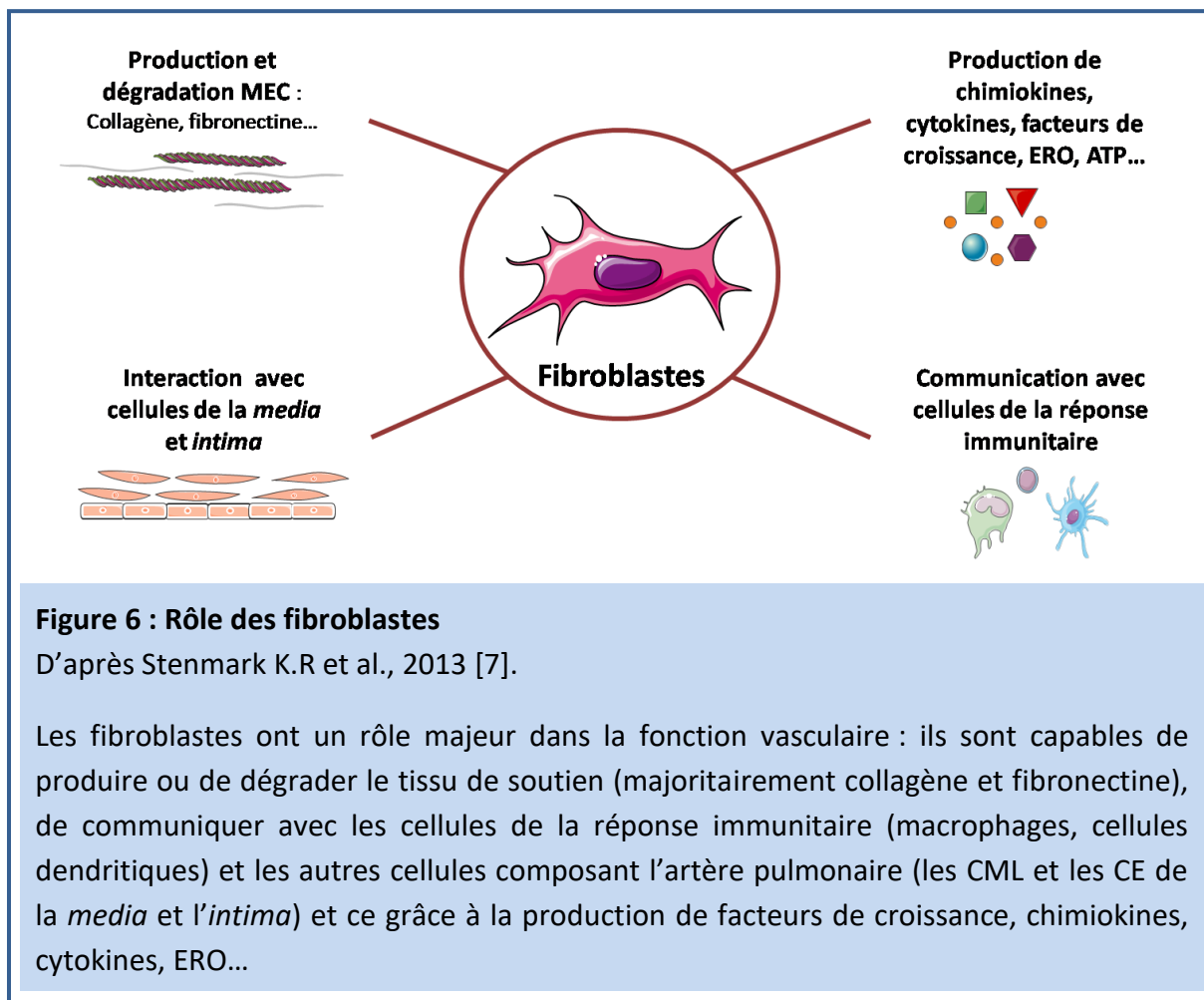
L'adventice, de par sa composition, joue un rôle important dans la régulation de la fonction vasculaire : les cellules immunitaires et les fibroblastes interviennent dans la communication cellulaire et les phénomènes immunitaires et inflammatoires via, entre autres, leur capacité à produire des cytokines et des facteurs angiogéniques [6], [7]. Les Vv, en plus d'apporter les nutriments nécessaires aux artères, transportent des molécules pouvant entraîner des réponses cellulaires adaptées [8]. Et enfin, les fibres sensibles sont sensibles à la déformation de la paroi du vaisseau.

Contrairement à l'idée initiale, l'adventice participe donc activement au contrôle du tonus vasculaire ainsi qu'aux réponses immunitaires et inflammatoires de l'organisme et ainsi à l'homéostasie du système cardio-vasculaire.

Les fibroblastes sont les cellules majoritaires présentes dans l'adventice. Ils forment une population hétérogène [9] de par leur morphologie (fusiforme ou étoilée, mais toujours avec de longs et fins prolongements), leur fonction et l'expression de sites spécifiques à leur membrane [10].

Il n'existe pas de marqueur spécifique de ces cellules. Généralement, les fibroblastes sont définis par le fait de ne pas être des cellules épithéliales, musculaires, endothéliales et lymphoïdes. Ainsi, lors de mise en culture des différentes cellules de l'artère, les cellules sont considérées comme étant des fibroblastes lorsqu'elles ne sont pas positives au marquage du facteur de von Willebrand (spécifique des CE), ni à celui de l' α -SMA (présente chez les CML).

De manière générale, les fibroblastes peuvent produire et dégrader les protéines de la Matrice Extra Cellulaire (MEC) tels que le collagène et la fibronectine et interagir par l'expression de diverses molécules (facteurs de croissance, chimiokines, cytokines...) avec les autres cellules qui composent l'artère ainsi qu'avec les cellules de la réponse immunitaire [11] (**Figure 6**). Les différences que l'on retrouve au sein de cette population résident dans leurs différentes capacités à produire de la MEC, dans la sécrétion de molécules (certains seront plus capables de produire par exemple le facteur de croissance TGF β (Transforming Growth Factor)) et enfin, dans leur sensibilité accrue ou non à certains stimuli moléculaires (les facteurs : PDGF-AA (Platelet-Derived Growth Factor AA) et CTGF (Connective Tissue Growth Factor)) [10]. Ainsi des fibroblastes auront plus un rôle dans la cicatrisation du tissu et d'autres dans l'invasion ou la prolifération.



Les fibroblastes ont des origines différentes. La majorité provient de cellules primaires mésenchymateuses, mais deux autres origines ont été mises en évidence : la Transition Epithéliale-Mésenchymateuse (EMT) (aussi endothéliale-mésenchymateuse) [12], [13] et de cellules de la moelle osseuse [14]. Des études ont même montré une possible origine de cellules souches hématopoïétiques [15], [16].

Ces diverses origines peuvent expliquer l'hétérogénéité de cette population cellulaire et leurs fonctions différentes.

L'ensemble de ces caractéristiques fait des fibroblastes des cellules d'un intérêt certain dans la régulation du système vasculaire.

II. L'Hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire (HTP) est l'une des principales pathologies touchant la circulation pulmonaire.

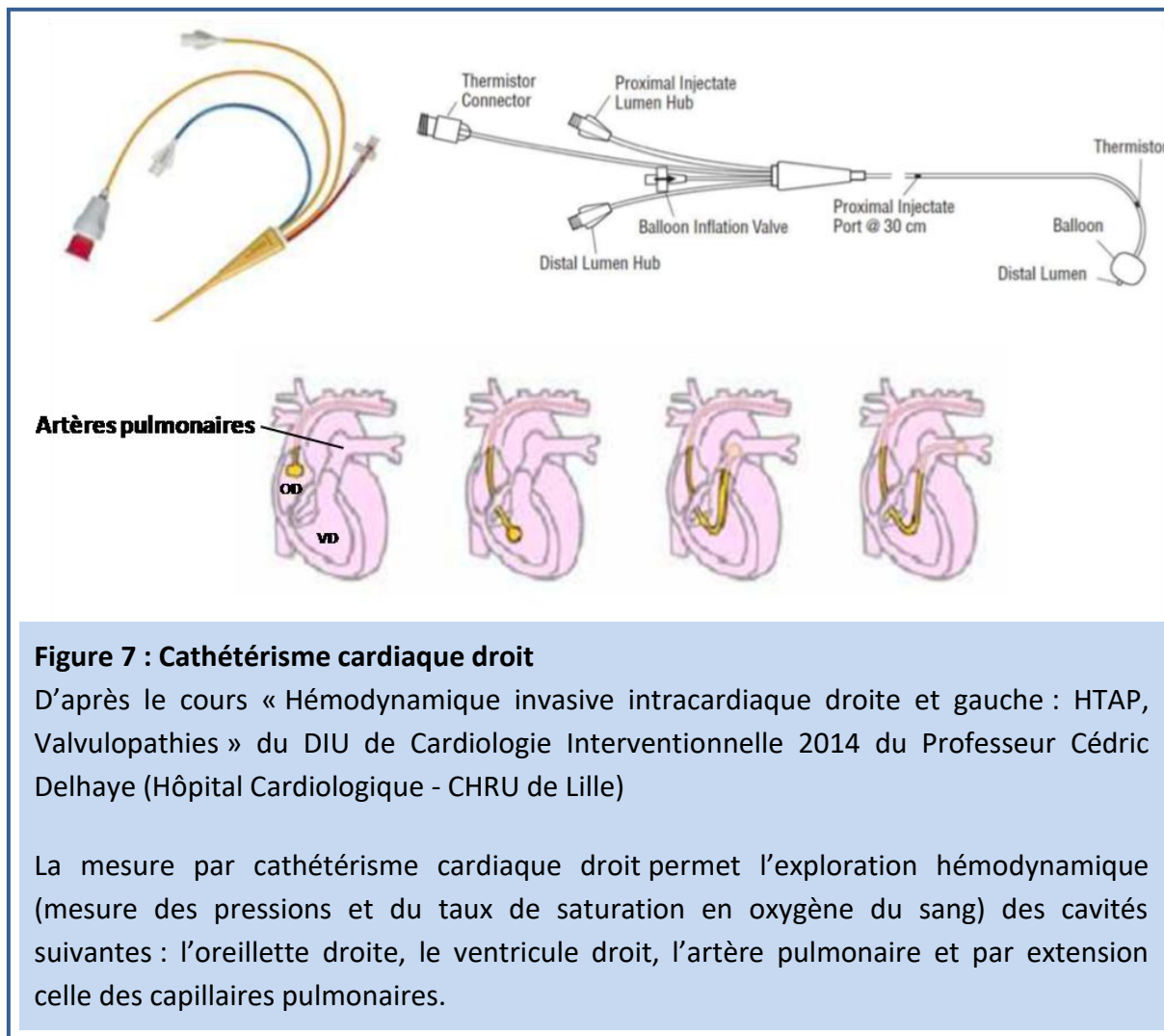
1. Définition et généralités

L'HTP est une maladie vasculaire pulmonaire d'évolution chronique, caractérisée par l'augmentation des Résistances Vasculaires Pulmonaires (RVP) et aboutissant à une insuffisance cardiaque droite. Elle se définit par une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos, la PAPm au repos chez un sujet sain étant de 15 mmHg. L'augmentation des RVP s'explique par un rétrécissement de la lumière des vaisseaux, rétrécissement pouvant avoir diverses origines que nous verrons par la suite (cf. page 19).

Bien qu'il s'agisse d'une pathologie rare, elle n'en est pas moins considérée comme grave du fait de son mauvais pronostic : l'augmentation des RVP et de la PAPm s'oppose à l'éjection du sang par le ventricule droit obligeant celui-ci à pomper de façon plus importante pour faire parvenir le sang dans la circulation pulmonaire entraînant sa muscularisation. Ce phénomène est appelé hypertrophie compensatoire. Lorsque cette hypertrophie devient inadaptée (lors d'atteintes chroniques), l'hypertrophie aboutit à une insuffisance cardiaque droite puis au décès du patient [17].

La symptomatologie clinique non spécifique (dyspnée et essoufflement) de cette pathologie rend le diagnostic généralement tardif contribuant au mauvais pronostic.

Le diagnostic formel s'effectue par cathétérisme cardiaque droit, méthode invasive permettant l'exploration hémodynamique (mesure des pressions et du taux de saturation en oxygène du sang) des différentes cavités cardiaques droites (l'oreillette droite et le ventricule droit) ainsi que de l'artère pulmonaire et des capillaires pulmonaires (**Figure 7**).



Au vu de son caractère invasif, cette exploration est réalisée après une démarche clinique rigoureuse comportant trois étapes : l'interrogatoire du patient (détermine les facteurs de risques : antécédents familiaux, prise d'anorexigènes, infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)...), l'examen clinique : recherche de possibles pathologies associées à l'HTP, et les résultats d'explorations complémentaires. Parmi ces examens complémentaires, il y a l'échographie cardiaque, qui est l'examen non invasif de référence devant toute suspicion d'HTP ou dans le cadre de dépistage.

Si la suspicion d'HTP est maintenue, la mesure de la PAPm par cathétérisme cardiaque droit, seul examen de référence permettant d'affirmer le diagnostic d'HTP de façon formelle, est effectuée [18].

Il existe aussi un test physique appelé « test de marche six minutes » qui correspond à la distance maximale pouvant être effectuée par le patient en six minutes. Cette distance est

corrélée avec la sévérité de la pathologie et est un critère important pour le suivi et dans la détermination de la gravité après diagnostic de la pathologie [19].

2. Classification

L'HTP est une pathologie dont les étiologies peuvent être très diverses ce qui implique une approche multidisciplinaire pour la prise en charge des patients. Une classification clinique internationale des HTP a été élaborée définissant cinq groupes, au sein desquels les HTP sont regroupées en fonction de leurs similitudes quant à leurs présentations clinique, histologique, physiopathologie, et leur prise en charge thérapeutique.

Cette classification à cinq groupes, a été mise en place par les Sociétés Européennes de Cardiologie et de Pneumologie lors du quatrième symposium mondial de l'hypertension pulmonaire en 2008 à Dana Point [20]. En 2013, lors du cinquième symposium à Nice, cette classification fut légèrement modifiée [21], puis mise encore à jour en août 2015 [18] pour aboutir à celle présentée ci-dessous (**Tableau 1**, page 18) :

Groupe 1 : Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP)

Le groupe 1 regroupe les HTP touchant les artères pulmonaires distales. Dans ces pathologies, la PAPm est relativement élevée avec des pressions autour de 55 mmHg [22].

Il contient quatre différents sous-groupes : les formes idiopathiques, dont l'origine n'est pas encore identifiée, les formes héritables (pouvant être héritées ou transmises) dues à une mutation au niveau d'un des gènes identifiés comme étant à prédisposition, les HTAP induites par la prise de toxines et de médicaments comme la prise de psychostimulants tels l'amphétamine, la cocaïne ou les anorexigènes (le fenfluramine, le dexfenfluramine...) et enfin, les HTAP associées à d'autres pathologies comme une infection par le VIH, une cardiopathie congénitale, une hypertension portale...

L'HTAP est une maladie rare. En France, sa prévalence est de 15 cas par million d'habitants et son incidence de 2,5 cas par million d'habitants par an selon une étude

prospective de 2002 à 2003 [22], [23]. Cette même étude montre que la forme idiopathique quant à elle, a pour prévalence 5,9 cas par million d'habitants et pour incidence 1 cas par million d'habitants par an.

Deux autres groupes 1 nommés respectivement « 1' » et « 1'' » sont à distinguer de ce groupe 1. Il s'agit d'HTAP dues à une maladie veino-occlusive ou à une hémangiomatose capillaire pulmonaire (1') ainsi que l'Hypertension Pulmonaire Persistante du Nourrisson (HPPN) (1''), cause fréquente d'admission en réanimation néonatale. Ces groupes se différencient du groupe 1 par leur pronostic et leur prise en charge thérapeutique.

Groupe 2 : Hypertension pulmonaire associée à une maladie du cœur gauche

Une maladie du cœur gauche est la cause la plus fréquente d'HTP. Les cardiopathies gauches rendent difficile le pompage du sang hors de la circulation pulmonaire. La circulation pulmonaire voit alors la pression augmenter au sein de ses artères provoquant, si la situation devient chronique, l'HTP.

Les atteintes du cœur gauche peuvent être liées à des dysfonctions ventriculaires ou auriculaires gauches mais également des maladies valvulaires du cœur gauche.

La prise en charge du patient cible d'abord et avant tout la maladie du cœur gauche en cause.

Groupe 3 : Hypertension pulmonaire due à une maladie pulmonaire ou à une hypoxie chronique

Les maladies respiratoires chroniques telles que la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), l'apnée du sommeil, l'hypoventilation alvéolaire ou des séjours en altitude (où la PO₂ y est diminuée) sont responsables des HTP de ce groupe. L'atteinte des vaisseaux se situe au niveau pré-capillaire.

Il s'agit généralement d'HTP dites modérées : les patients présentent une PAPm n'excédant pas 35 mmHg. Ces HTP sont donc moins sévères que les HTAP (HTP du groupe 1) qui provoquent des PAPm supérieures à 40 mmHg [32].

La prise en charge de ces pathologies se fait par le traitement de l'étiologie et par oxygénothérapie.

Groupe 4 : Hypertension pulmonaire post-thromboembolique chronique et obstruction artérielle pulmonaire autre

L'HyperTension Pulmonaire Post-Embolique chronique (HTP PE) est rare. Elle est secondaire à une obstruction des artères pulmonaires. Cette obstruction est liée à la persistance et à l'organisation fibreuse de caillot (tissu cicatriciel) à la suite d'embolies pulmonaires pouvant passer inaperçues. Dans ce groupe sont placées aussi les HTP liées à d'autres obstructions artérielles pulmonaires.

Groupe 5 : Hypertension pulmonaire ayant des mécanismes multifactoriels incertains

Le groupe 5 concerne les hypertensions pulmonaires ayant des mécanismes multifactoriels incertains ou pas encore élucidés incluant les désordres hématologiques (comme les anémies hémolytiques chroniques, les syndromes myéloprolifératifs, les splénectomies), systémiques (comme la sarcoïdose, le lymphangioliomyomatose...) et métaboliques (les glycogénoses, les dysthyroïdies...).

L'hétérogénéité de ce groupe empêche la réalisation d'une description génétique, épidémiologique et des différents facteurs de risque.

1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)	
1.1.	HTAP idiopathique
1.2.	HTAP héréditaire, familiale ou génétique
1.2.1.	Gène BMPR2 (Bone Morphogenetic Protein Receptor type II)
1.2.2.	Gène autre
1.3.	Induite par la prise de toxines ou de médicaments
1.4.	Associée à :
1.4.1.	Une connectivite
1.4.2.	Une infection par le VIH
1.4.3.	Une hypertension portale
1.4.4.	Une cardiopathie congénitale
1.4.5.	Une schistosomiase
1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et hémangiomatose capillaire pulmonaire	
1.1.	Idiopathique
1.2.	Héréditaire
1.2.1.	Gène EIF2AK4 (Eukaryotic translation Initiation Factor 2-Alpha Kinase 4)
1.2.2.	Gène inconnu
1.3.	Induite par la prise de toxines ou de médicaments ou à une irradiation
1.4.	Associée à :
1.4.1.	Une connectivite
1.4.2.	Une infection par le VIH
1''. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né	
2. Hypertension pulmonaire associée à une maladie du cœur gauche	
2.1.	Dysfonction systolique du ventricule gauche
2.2.	Dysfonction diastolique du cœur gauche
2.3.	Maladies valvulaires
2.4.	Obstructions congénitales ou acquises au niveau du tract d'éjection ou de remplissage du ventricule gauche et cardiomyopathies congénitales
3. Hypertension pulmonaire (HTP) due à une maladie pulmonaire ou à une hypoxie chronique	
3.1.	Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)
3.2.	Maladie pulmonaire interstitielle
3.3.	Autres maladies respiratoires avec un profil restrictif et obstructif mixte
3.4.	Troubles d'apnée du sommeil
3.5.	Hypoventilation alvéolaire
3.6.	Exposition chronique aux hautes altitudes
3.7.	Anomalies du développement pulmonaire
4. Hypertension pulmonaire post-embolique chronique et obstruction artérielle pulmonaire autre	
1.1.	HyperTension Pulmonaire Post-Embolique chronique (HTP PE)
1.2.	Autre obstruction artérielle pulmonaire
5. Hypertension pulmonaire ayant des mécanismes multifactoriels incertains	
5.1.	Troubles hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndromes myéloprolifératifs, splénectomie
5.2.	Troubles systémiques : sarcoïdose, lymphangioléiomyomatose, histiocytose à cellules de Langerhans pulmonaires
5.3.	Troubles métaboliques : glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdies
5.4.	Divers : obstruction pulmonaire tumorale, médiastinite fibrosante, insuffisance rénale chronique, hypertension pulmonaire segmentaire

Tableau 1 : Classification de l'hypertension pulmonaire.

D'après Galiè N. et al, 2015 [18].

3. Aspects tissulaire et cellulaire

Différents mécanismes physiopathologiques expliquent l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires dans l'HTP : l'inflammation, l'hyperréactivité vasculaire et le remodelage artériel. Ces mécanismes sont étroitement liés entre eux afin d'aboutir à l'HTP.

a. L'inflammation

L'inflammation vasculaire est une composante majeure de l'HTP. Certains posent même la question de l'auto-immunité dans le cas de l'HTAP comme le montre la revue de Perros, Humbert et Cohen-Kaminsky de 2013 [24]. De plus, l'HTAP peut se développer sur des terrains immunitaires altérés comme suite à une infection au VIH, ou des connectivites. L'HTAP familiale peut aussi être liée à une mutation du gène BMPR2 (Bone Morphogenetic Protein Receptor type II) qui entraîne entre autres une altération du développement des lymphocytes T dans le thymus [25].

L'inflammation vasculaire est présente pour tous les types d'HTP mais est majoritairement décrite dans l'HTAP. Elle se caractérise par un infiltrat inflammatoire dans le milieu périvasculaire composé majoritairement de Lymphocytes (LT) « helper » (CD4+), de LT cytotoxiques (CD8) et de LT (CD3+), de cellules dendritiques, de monocytes et de macrophages [26]. Dans l'HTAP idiopathique, il a été montré que les cellules immunitaires NK « Natural killer » y sont dysfonctionnelles [27]. Tudor fit en 1994 la première description de l'infiltrat inflammatoire dans les lésions plexiformes (cf. page 26) liées au remodelage de l'*intima* et de la *media* dans l'HTAP sévère.

La circulation pulmonaire connaît une élévation de la concentration sérique de nombreuses cytokines proinflammatoires : les InterLeukines (IL) IL-1 β et IL-6, premières cytokines identifiées [28], mais aussi les interleukines IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 et le TNF- α [29], [30]. La concentration de certaines d'entre elles a pu être corrélée à la gravité et de ce fait au taux de mortalité de la pathologie. Ainsi les IL-2, IL-6, IL-8 et IL-12p70 sont considérées comme des marqueurs de la gravité de l'HTP [29], [31].

De nombreuses études démontrent l'importance de l'IL-6 dans le développement de l'HTP. Des souris surexprimant l'interleukine 6 spécifique aux poumons développent une HTP avec des lésions importantes au niveau de l'intima [32]. Des rats et des souris, auxquels a été injectée de l'IL-6 recombinante humaine, montrent une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires [33], [34]. Des souris « Knock-Out » (KO) pour l'IL-6, exposées à un environnement hypoxique pendant deux semaines, développent une HTP et une hypertrophie cardiaque droite moins sévères que chez les souris sauvages. La muscularisation des artères est, elle aussi, atténuée chez les souris KO [35].

Dans l'HTP, il est aussi observé une élévation de la sécrétion de cytokines chimioattractantes, les chimiokines au niveau de l'inflammation. Les chimiokines sont de petites protéines « basiques », solubles, responsables de la migration des leucocytes. La sécrétion de chimiokines et la surexpression de molécules d'adhérence (comme VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) et ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)) au niveau de l'atteinte vasculaire permet la diapédèse des leucocytes (processus d'infiltration des leucocytes dans le milieu périvasculaire en 4 étapes : la migration, le « roulement », l'adhérence et l'extravasation) [36].

Deux chimiokines sont particulièrement étudiées : les RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) et la fractalkine [37], [38].

La fractalkine est la seule chimiokine connue pour exister sous forme soluble ou comme protéine d'ancrage à la membrane. Son activité se fait par l'intermédiaire du récepteur CX3CR1 (Chemokine Receptor 1) exprimé à la surface des LT et de monocytes. Le récepteur CX3CR1 joue un rôle critique pour le recrutement des LT et des monocytes [39], [40]. Il est surexprimé par les lymphocytes T circulants (CD4+ et CD8+) chez les patients atteints d'HTAP. Cette surexpression n'est pas retrouvée pour les HTP secondaires à une thromboembolie chronique [41], [42]. En 2007, Perros et son équipe ont montré l'implication de cette chimiokine dans la prolifération des CMALP de la *media* dans l'HTP [52].

La chimiokine RANTES est un chimioattractant important des monocytes et macrophages. Dorfmueller et al. [37] ont mis en évidence sa possible implication dans l'évolution de l'HTAP de par la surexpression de l'ARNm au niveau des poumons au cours de la pathologie et leur production par les cellules endothéliales.

Une autre chimiokine chemoattractante pour les monocytes/macrophages appelée MCP-1 (Monocyte Chemoattractant protein-1) voit sa concentration plasmatique augmenter dans le cas de l'HTAP idiopathique, particulièrement dans les stades précoces de la pathologie, montrant ainsi sa contribution à son développement [30].

Deux hypothèses font débat quant au point de départ du processus inflammatoire. La première parle d'une inflammation « inside-out »[44], [45]. Elle explique que les cellules inflammatoires proviendraient majoritairement de la circulation sanguine et s'infiltreraient dans le milieu périvasculaire (*media-adventice*) par l'*intima*. La seconde hypothèse décrit l'*adventice* comme la première tunique infiltrée par les cellules inflammatoires. Cette hypothèse s'appuie sur la présence naturelle de cellules de l'immunité dans l'*adventice* et des études montrant l'influx rapide de leucocytes dans cette tunique [46]. Aussi, dans le modèle animal d'HTP induit par un environnement hypoxique, l'*adventice* connaît une inflammation précoce et persistante participant ainsi à l'entretien de la maladie [47]. Dans cette seconde hypothèse, dite « outside-in », les fibroblastes joueraient un rôle déterminant dans l'activation des cellules immunitaires et dans l'entretien du phénomène. Certains les appellent même « cellules sentinelles ». Cette dénomination s'explique par la capacité de certains fibroblastes à sécréter des cytokines (IL-1 β and IL-6), des chimiokines comme RANTES et MCP-1, et des facteurs de croissance comme le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) aux prémices de la pathologie [48], [49].

b. La vasoréactivité

Au cours de l'HTP, on observe une altération de la réactivité des artères.

Cette altération peut s'expliquer par une vasoconstriction importante et soutenue des artères intrapulmonaires, vasoconstriction maintenue au repos, participant ainsi au rétrécissement du diamètre de la lumière des artères. Le rétrécissement de la lumière des vaisseaux qui en découle, accroît la résistance à l'écoulement du flux sanguin et augmente les RVP des artères intrapulmonaires. La perfusion des alvéoles en aval de ces artères diminue, affectant la réoxygénation du sang veineux [60], [61].

Différents phénomènes entrent en jeu pour expliquer cette vasoconstriction : l'hypoxémie, la dysfonction endothéliale et enfin la perturbation de l'homéostasie calcique.

La vasoconstriction hypoxique pulmonaire est un réflexe physiologique de contraction du muscle lisse vasculaire pulmonaire en réponse à une baisse locale de la pression partielle en oxygène. La situation hypoxémique se définit à partir d'une PO_2 inférieure à 60 mmHg, la normale étant de 100 mmHg [52], [53]. Ce réflexe est bénéfique lorsque l'hypoxie est localisée et transitoire. Il permet la réorientation du flux sanguin vers les alvéoles fonctionnelles, afin de maintenir le rapport perfusion alvéolaire sur la perfusion sanguine proche de 1 (condition physiologique). Il optimise ainsi l'oxygénation du sang veineux.

Mais lorsque l'hypoxie est généralisée (par exemple dans les HTP liées à un séjour prolongé en altitude ou des maladies hypoxémiantes), ce phénomène devient inadapté et même délétère car persistant, participant alors à l'augmentation des RVP et à plus long terme au remodelage des vaisseaux (cf. page 24).

L'altération de la réactivité des artères dans l'HTP s'explique aussi par le déséquilibre présent entre les facteurs vasoconstricteurs surexprimés (thromboxane A₂, sérotonine, endothéline-1, phényléphrine ou prostaglandine F_{2α}) et les molécules vasodilatatrices déficitaires (le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline...) [51], [54]. Ce déséquilibre est induit majoritairement par l'endothélium lésé au cours du développement de la pathologie. En effet, l'endothélium qui passe d'un état quiescent (état ne présentant pas de capacité d'adhésion) à un état actif et adhésif, montre une moindre capacité à produire des médiateurs vasodilatateurs tels le NO et la prostacycline et, au contraire, relargue

excessivement des facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline-1. On parle alors de dysfonction endothéliale. Les fibroblastes adventitiels ont aussi la capacité de sécréter de l'endothéline 1, et participent donc au maintien de la vasoconstriction par les CMLAP de la *media*.

Une autre molécule tient une place importante dans les phénomènes de constriction présents dans l'HTP, la sérotonine. La sérotonine est produite majoritairement au niveau des cellules entérochromafines de l'intestin puis est transportée par les plaquettes ou sous forme libre dans la circulation sanguine. La sérotonine libre est rapidement métabolisée par les cellules endothéliales du foie (mais aussi des poumons). Au vu de leur position dans le corps, chez un sujet sain, les poumons ne rencontrent pas de fortes concentrations en sérotonine. Mais au cours de l'HTP, la sérotonine voit sa concentration plasmatique fortement augmenter [55]. Des études indiquent qu'elle peut être aussi produite par l'endothélium pulmonaire [56], [57]. La présence accrue de sérotonine et l'élévation de la sensibilité de l'artère à la sérotonine amplifient ses effets vasoconstricteurs et mitogènes principalement par son action sur les CMLAP [58]–[61].

Le calcium joue un rôle primordial dans la contraction vasculaire : il est indispensable à la contraction des CMLAP de la *media* et est impliqué dans de nombreuses voies de signalisations cellulaires. Dans le cadre de l'HTP, la concentration en calcium intracellulaire dans les CMLAP est augmentée [62]–[65], participant ainsi à la vasoconstriction continue des artères. La perturbation de cette homéostasie calcique peut être due à une expression anormale des canaux potassiques voltage-dépendants. Il a été montré dans l'HTP que les canaux potassiques voltage-dépendants subissaient une dérégulation au niveau de leur expression ou de leur fonction, maintenant les CMLAP dans un état dépolarisé favorisant l'entrée de calcium dans la cellule [66]–[68].

La sérotonine est aussi connue pour augmenter les entrées de calcium dans les CMLAP par l'activité de canaux calciques voltage-dépendants ou d'autres types de canaux perméables au calcium (canaux TRPV4) [69]–[71].

L'élévation du calcium cytosolique perturbe aussi le tonus myogénique. Le tonus myogénique est la capacité des artères pré-capillaires (les artérioles) à se contracter suite à une élévation de la pression intraluminale. Il régule les débits sanguins locaux protégeant ainsi les capillaires des brusques variations de pression qui pourraient les endommager.

Dans l'HTP, l'exacerbation de ce phénomène adaptatif participe aussi à l'augmentation des RVP [72], [73].

c. Le remodelage artériel

Le remodelage artériel s'observe pour les trois tuniques des artères intrapulmonaires (**Figure 8**) [74]. Il apparaît plus tardivement par rapport aux phénomènes précédemment cités et se fait de façon progressive. Il touche les artères de diamètre inférieur à 500 μm chez l'Homme, est irréversible et participe à l'augmentation des RVP.

La première tunique touchée par ce phénomène est sujet à débat : la *media* a longtemps été considérée comme la première tunique subissant des modifications morphologiques dans l'HTP, mais de nombreuses études montrent, particulièrement dans les modèles hypoxiques, que les changements dans le tissu adventiciel sont plus précoces et importants que dans les autres couches du vaisseau [75]–[80].

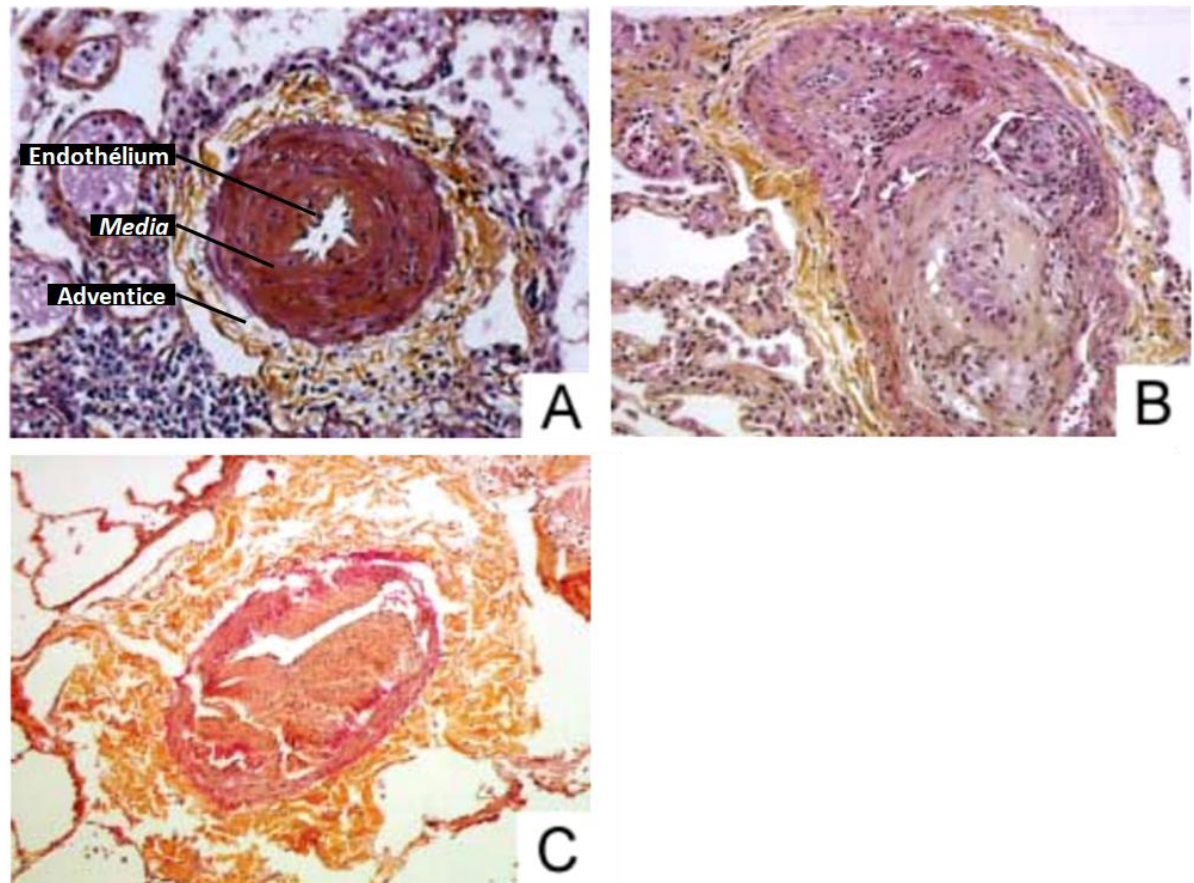


Figure 8 : Photographies représentatives de lésions anatomo-pathologiques d'artères intrapulmonaires humaines de patients souffrant d'HTAP

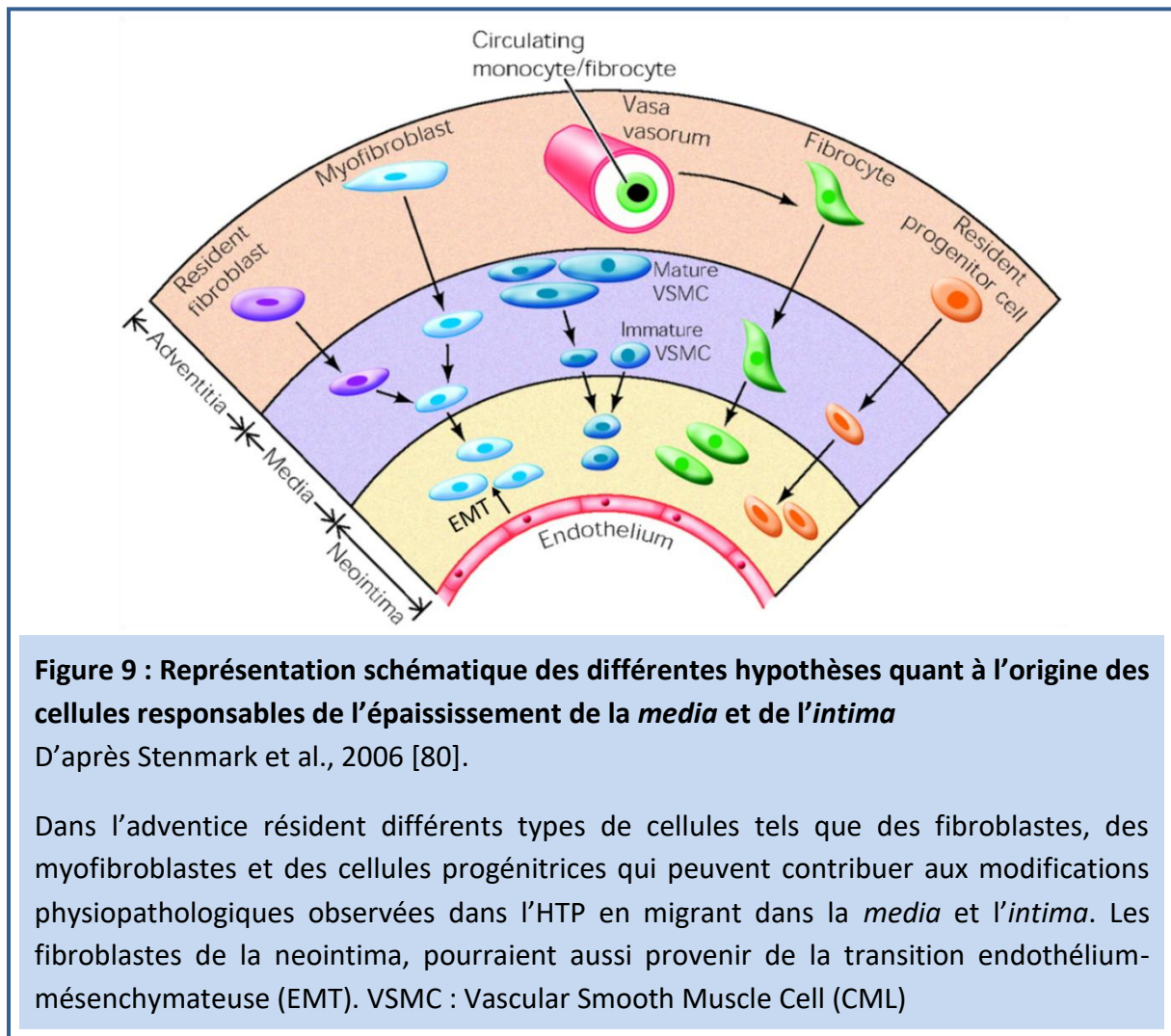
D'après Montani et al 2013, [74].

A : Importante hypertrophie de la *media*. B : Lésion plexiforme, C : Lésion thrombotique
Coloration : hématoxyline et éosine, zoom x20.

i. L'intima et les cellules endothéliales

Trois phénomènes majeurs ont lieu dans l'intima au cours de l'HTP : la formation de la néo-intima, la prolifération aberrante des cellules endothéliales (CE) et l'apparition de lésions intimales. Ils participent à l'épaississement de la paroi intimale et de ce fait, au rétrécissement de la lumière de l'artère et à l'augmentation des RVP.

La néo-intima est une couche de myofibroblastes et de MEC entre l'endothélium et la lame élastique interne (la présence de cellules progénitrices est aussi démontrée). Ces myofibroblastes pourraient provenir de fibroblastes adventitiels activés lors du déclenchement de la pathologie (mais les mécanismes rendant possible leur migration de l'adventice à l'intima sont mal identifiés) ou d'une possible transition endothélio-mésenchymateuse [81] (Figure 9).



La prolifération aberrante des CE amène à un envahissement anarchique de la lumière du vaisseau qui avec l'altération de l'endothélium participe à l'apparition de lésions intimales. Les mécanismes menant à ce dérèglement ne sont pas connus. Ils mettent en cause la dysfonction endothéliale, l'augmentation locale de facteurs de croissance comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un déséquilibre dans la balance prolifération/apoptose et des mécanismes de stress physique comme les contraintes de cisaillement induites par le flux sanguin ou les augmentations de pression intraluminale.

Différents types de lésions peuvent être observés, [82] (**Figure 8**, page 24 et **Figure 10**) :

- Les lésions thrombotiques sont formées par l'agrégation de matériel fibreux. Au cours de l'HTP, l'endothélium rendu dysfonctionnel passe d'un état quiescent à un état actif et adhésif favorisant les dépôts de fibrine.
- Les lésions plexiformes sont des lésions complexes et désorganisées, liées à une prolifération focale et monoclonale de cellules endothéliales [83] associée à une prolifération de myofibroblastes, de cellules musculaires lisses, et à l'accumulation de matrice extracellulaire. Elles sont considérées comme caractéristiques de l'HTAP humaine et sont difficilement reproductibles dans les modèles animaux d'HTP. Seuls deux modèles sévères d'HTP semblent présenter ce type de lésion, les modèles combinant l'injection de molécules (SU-5416 (modèle SUGEN) ou de monocrotaline) et un environnement hypoxique (cf. page 32 et 33).

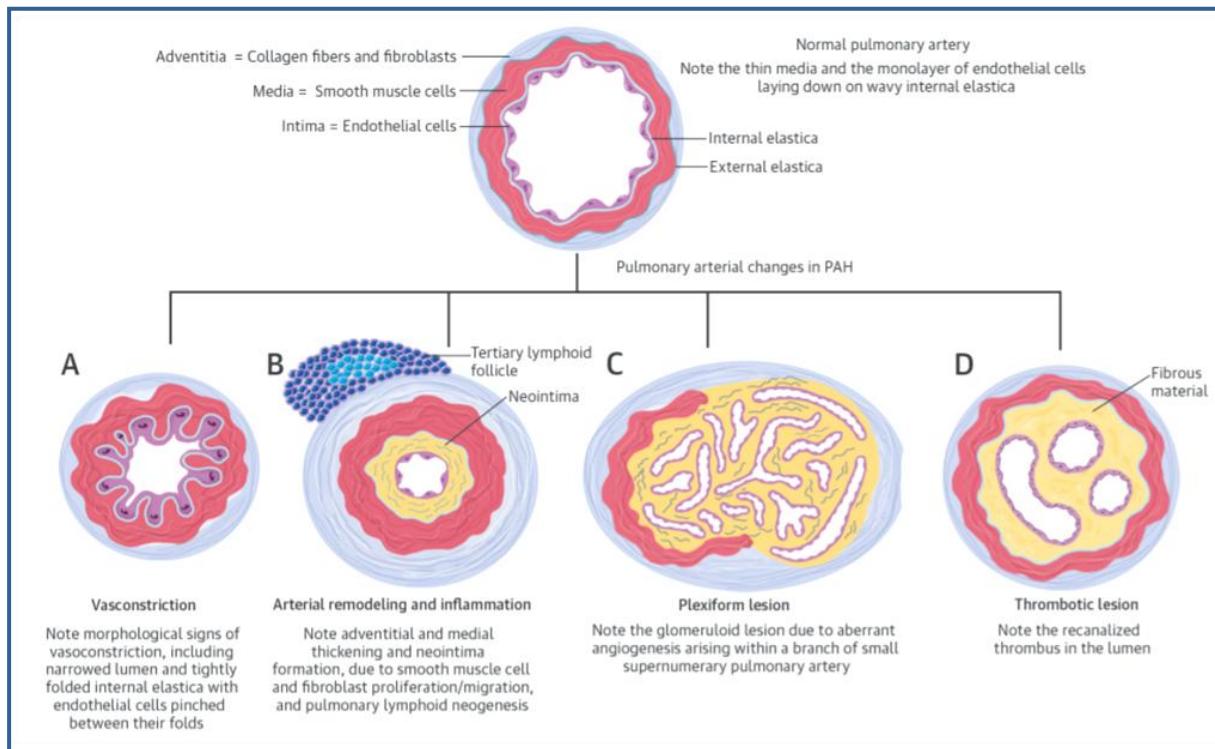


Figure 10 : Physiopathologie de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP)

D'après McLaughlin et al., 2015, [81].

A : La vasoconstriction pulmonaire est un évènement précoce et important.
 B : Remodelage et inflammation des artères pulmonaires : l'inflammation active de nombreuses réponses cellulaires qui participent au remodelage artériel, l'adventice et la media s'épaississent et il y a formation d'une néointima.
 C : Les lésions plexiformes : Dysfonction endothéliale, prolifération, résistance à l'apoptose, et les mécanismes cellulaires associés sont responsables de phénomènes angiogéniques aberrants pouvant conduire à des lésions plexiformes.
 D : L'artériopathie thrombotique, un profil pathologique très présent de l'HTAP, est une caractéristique physiopathologique importante du trouble. En effet, la dysfonction endothéliale entraîne une thrombose locale dans l'HTAP.

ii. La *media* et les CMLAP

Avec l'adventice, la *media* est précocement touchée par les phénomènes de remodelage. Chez les patients souffrant d'HTP, elle s'épaissit et colonise les artères non-muscularisées comme les petites artérioles qui précèdent les capillaires des alvéoles. Deux phénomènes cellulaires participent de façon majeure à ce remodelage : l'hyperplasie (croissance cellulaire) et l'hypertrophie (turgescence cellulaire) des CMLAP qui composent la *media*.

La muscularisation des petites artères est présente dans toutes les HTP [84]. Elle est très bien décrite dans les modèles animaux hypoxiques chroniques. Elle peut être observée chez les modèles rats hypoxiques dès 2 jours d'exposition à l'environnement hypoxique [85]. La prolifération des CMLAP, la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes ou d'autres précurseurs de CMLAP (normalement présents dans les régions des artères non muscularisées) et les péricytes expliqueraient cette muscularisation [85]. Une autre étude montre que cette muscularisation est majoritairement due à la migration des CMLAP le long des artérioles [86].

La prolifération des CMLAP qui fait suite à l'HTP est dite concentrique. Ce phénomène couplé à l'hypertrophie cellulaire participe à l'épaississement irréversible de la *media* et donc la réduction de la lumière artérielle. L'étude de Meyrick de 1979 indique que l'hypertrophie serait plus impliquée que la prolifération cellulaire des CMLAP [75].

D'autres hypothèses expliquent que la migration des fibroblastes et myofibroblastes ou des cellules progénitrices dans la *media* tient une place importante dans son remodelage (**Figure 9**, page 26).

Ces phénomènes contribuent également au maintien de la contraction des vaisseaux et donc leur perte de réactivité.

Plusieurs facteurs interviennent dans ces processus : l'augmentation du taux de facteurs de croissance circulants, par exemple le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor) [87], participe à la croissance cellulaire des CMLAP ou encore l'augmentation du taux de sérotonine libre dans la circulation pulmonaire [55] qui induit une prolifération excessive des CMLAP et leur hypertrophie [88]–[90].

iii. L'adventice et les fibroblastes

Au cours de l'HTP, l'adventice est remodelée et épaissie [79]. Les modèles animaux d'HTP montrent que le remodelage adventiciel est important, particulièrement dans les modèles animaux hypoxiques chroniques où il constitue un phénomène précoce et majeur [75]. Dans les modèles animaux monocrotaline (cf. page 32), ce remodelage est moins prononcé mais reste conséquent [76].

L'adventice est la tunique la plus hétérogène ce qui rend son remodelage plus complexe. En réponse à des stress hormonaux, inflammatoires, environnementaux (hypoxie, ischémie) ou physiques (augmentation de pression intraluminale), les cellules qui composent l'adventice (les fibroblastes, les monocytes/macrophages, les cellules progénitrices) sont les premières cellules artérielles à présenter des marqueurs d'activation, en particulier les fibroblastes qui prolifèrent et se différencient en myofibroblastes.

L'activation des fibroblastes est très étudiée dans cette pathologie : ils jouent un rôle majeur dans la fonction vasculaire et selon l'hypothèse « outside-in », ils seraient des cellules sentinelles responsables de la cascade inflammatoire. Les cellules qui composent l'adventice, et majoritairement les fibroblastes, seraient aussi responsables du remodelage des autres tuniques par leur migration dans ces couches (**Figure 9**, page 26).

Dans le remodelage adventiciel, les fibroblastes ont un intérêt singulier. Il a été montré une modulation de leur activité en particulier dans les modèles animaux hypoxiques chroniques. On observera ainsi leur prolifération, leur différenciation en myofibroblastes, la surproduction d'éléments de la MEC, leur migration vers la *media* et l'*intima*, ainsi que la synthèse de nombreuses chimiokines et cytokines inflammatoires, d'ERO et de facteurs de croissances importants pour le maintien de l'inflammation et la néovascularisation [9].

Une étude de 2014 de Chen et al [91] montre que la sérotonine (dont la concentration sanguine est augmentée dans l'HTP) est capable de moduler l'activité des fibroblastes. Elle promeut leur migration et leur différenciation en myofibroblastes de manière dose-dépendante et stimule la sécrétion de collagène et de fibronectine.

D'après certaines études, les fibroblastes sont les cellules qui répondent en premier au stress présent lors de la mise en place de l'HTP, notamment par leur importante réponse proliférative [92]–[94]. De plus, une importante partie de ces fibroblastes se différencie en

myofibroblastes [9] qui correspondent à des fibroblastes plus actifs, ayant développé une propriété contractile conférée par l'expression de la protéine α SMA. Cette différenciation peut être induite par les variations de tension environnementale [95].

L'activation des fibroblastes va être responsable de la modification de la MEC. Dans la pathologie, on observe une surexpression de collagène I et III ainsi que d'autres constituants comme l'élastine, la fibronectine, l'ostéopontine et la tenascine-C. La rigidité de la MEC est alors augmentée influant sur l'élasticité du vaisseau et sur la dynamique du flux sanguin. De plus, la modification de composition de la MEC modifie les interactions cellules/éléments de la MEC qui sont connues pour réguler l'activité de certaines cellules comme les fibroblastes eux-mêmes. Ces modifications favorisent entre autres la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes [96], [97].

Cette activation passe aussi par la capacité des fibroblastes à dégrader la MEC, la lame basale et le collagène interstitiel (par la dégradation du collagène, de la fibronectine et des protéoglycanes). Cette propriété permet aux fibroblastes de migrer vers les autres couches de l'artère et ainsi participer à leur épaissement ou à la muscularisation des petites artères. La capacité accrue à dégrader la MEC s'explique par la surexpression de Métalloprotéinases Matricielles (MMP) en particulier la 2 et la 9. Les métalloprotéinases sont des protéines appartenant à la classe des peptidases qui participent à la catalyse de la coupure de la liaison peptidique dans les protéines. Des études ont d'ailleurs montré que la diminution de l'expression de MMP diminue le remodelage artériel chez les modèles animaux MCT et hypoxie chronique [98]–[101].

Dans des formes sévères d'HTP, d'HTAP idiopathiques, de fibroses pulmonaires idiopathiques et dans l'obstruction thromboembolique d'artère intrapulmonaire, il a été montré une augmentation de la densité des Vv dans l'adventice [102], [103] responsable en partie du maintien de la pathologie. Cette néovascularisation a été retrouvée dans les modèles animaux d'HTP. Les fibroblastes activés, de par leur capacité à relarguer des facteurs de croissance comme le VEGF et le PDGF, collaborent avec les cellules endothéliales à la formation de ces nouveaux vaisseaux [104], [105].

Les fibroblastes ont donc un rôle majeur dans le remodelage adventitial et plus généralement dans le remodelage artériel global. De ce fait, les étudier dans le développement et l'installation de l'hypertension pulmonaire est d'un grand intérêt.

4. Les différents modèles animaux d'hypertension pulmonaire

a. Modèle groupe 1 : l'hypertension pulmonaire induite par l'injection de monocrotaline

La monocrotaline (MCT) est un alcaloïde pyrrolizidinique toxique présent dans 17 espèces différentes de *Crotalaria*, la plus connue étant *Crotalaria spectabilis*, une plante de la famille des Fabacées, originaire d'Asie [106], [107]. Elle est connue pour sa toxicité essentiellement hépatique et pulmonaire qui débute par une atteinte des cellules endothéliales [108]–[111].

La MCT n'est pas toxique en tant que telle. En effet, sa toxicité provient de son métabolite, la monocrotaline pyrrole qui est issue de sa biotransformation hépatique par les cytochromes P450. Le métabolite est ensuite transporté dans le sang par les globules rouges lui permettant ainsi d'atteindre la circulation pulmonaire où il provoquera des effets délétères mimant l'HTAP.

C'est en 1967, que ce modèle d'HTAP chez le rat a été mis au point. D'abord réalisé par l'ingestion de la plante par l'animal [112], il s'effectue aujourd'hui via injection de MCT 60 à 80 mg / kg de masse corporelle du rat par voies sous-cutanée ou intrapéritonéale [113].

Dans ce modèle, les premières lésions observées se situent au niveau de l'endothélium. Dès le quatrième jour post-injection, le métabolite provoque un gonflement des mitochondries de l'endothélium, ainsi que la génération ERO amenant sur plus long terme, à de multiples lésions de l'endothélium [114]. A quatre semaines, on observe un épaississement de la paroi artérielle, une modification de la réactivité vasculaire, une importante augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne et un fort remodelage cardiaque droit [108], [109].

Ce modèle a la particularité de présenter une forte composante immunitaire/inflammatoire (composante très importante dans la mise en place de l'HTAP humaine), qui, avec les fortes PAPm observées, expliquent l'intérêt de son utilisation pour l'étude des HTP de ce groupe. L'inflammation se caractérise par l'activation de cellules de l'inflammation comme les macrophages et les cellules dendritiques, ainsi que la production de cytokines de l'inflammation (IL6, TGF- β ...)[115].

Cependant, ce modèle n'est pas en capacité de montrer les lésions plexiformes retrouvées chez l'Homme pour cette pathologie (**Figure 8** et **Figure 11**).

À noter qu'il existe pour les cytochromes d'importantes variabilités inter-individuelles et inter-espèces en ce qui concerne la présence et la fonctionnalité même de l'enzyme. La métabolisation de la MCT et par là même, ses effets, peuvent donc s'en retrouver modifiés. La souris, par exemple, n'est pas capable de produire le métabolite monocrotaline pyrrole. Quelques modèles d'HTAP par injection de MCT ont quand même été développés mais à des doses de MCT très élevées (de l'ordre de 600 mg/kg de masse corporelle par voie intrapéritonéale) et répétées hebdomadairement sur trois à dix semaines selon les études [116]–[118].

b. Modèle groupe 3 : l'hypertension pulmonaire induite par exposition à une hypoxie chronique

L'HTP induite par l'exposition à une hypoxie chronique est une méthode robuste et reproductible, facile à mettre en place et applicable à de nombreuses espèces. Elle est principalement utilisée chez la souris et le rat.

Afin de leur faire développer de l'HTP, les animaux sont placés trois semaines dans un caisson hypobare ou normobare. Le caisson hypobare soumet les animaux à une pression de 380 mmHg (la pression au niveau de la mer étant pour rappel de 760 mmHg) simulant ainsi un séjour en haute altitude (5500 m) où la PO₂ est diminuée de moitié (10 % O₂ contre 21 % au niveau de la mer). Le caisson normobare ne joue pas sur la pression mais sur la quantité d'oxygène présente. Le caisson est lié à une bouteille d'O₂, permettant le contrôle de la

concentration en O₂ dans l'environnement clos. Ainsi, les animaux sont directement exposés à 10 % d'O₂, soit une situation hypoxémique dans le caisson.

Les premières modifications structurales apparaissent dès la première semaine avec la muscularisation des petites artères au niveau des alvéoles, normalement dépourvues de cellules musculaires lisses. Puis les artères s'épaississent principalement au niveau de la *media* (hypertrophie médiale) et de l'adventice [12], [17]. Mais dans ce modèle, le remodelage de l'*intima* n'est pas ou peu présent (**Figure 8**, page 24 et **Figure 11**).

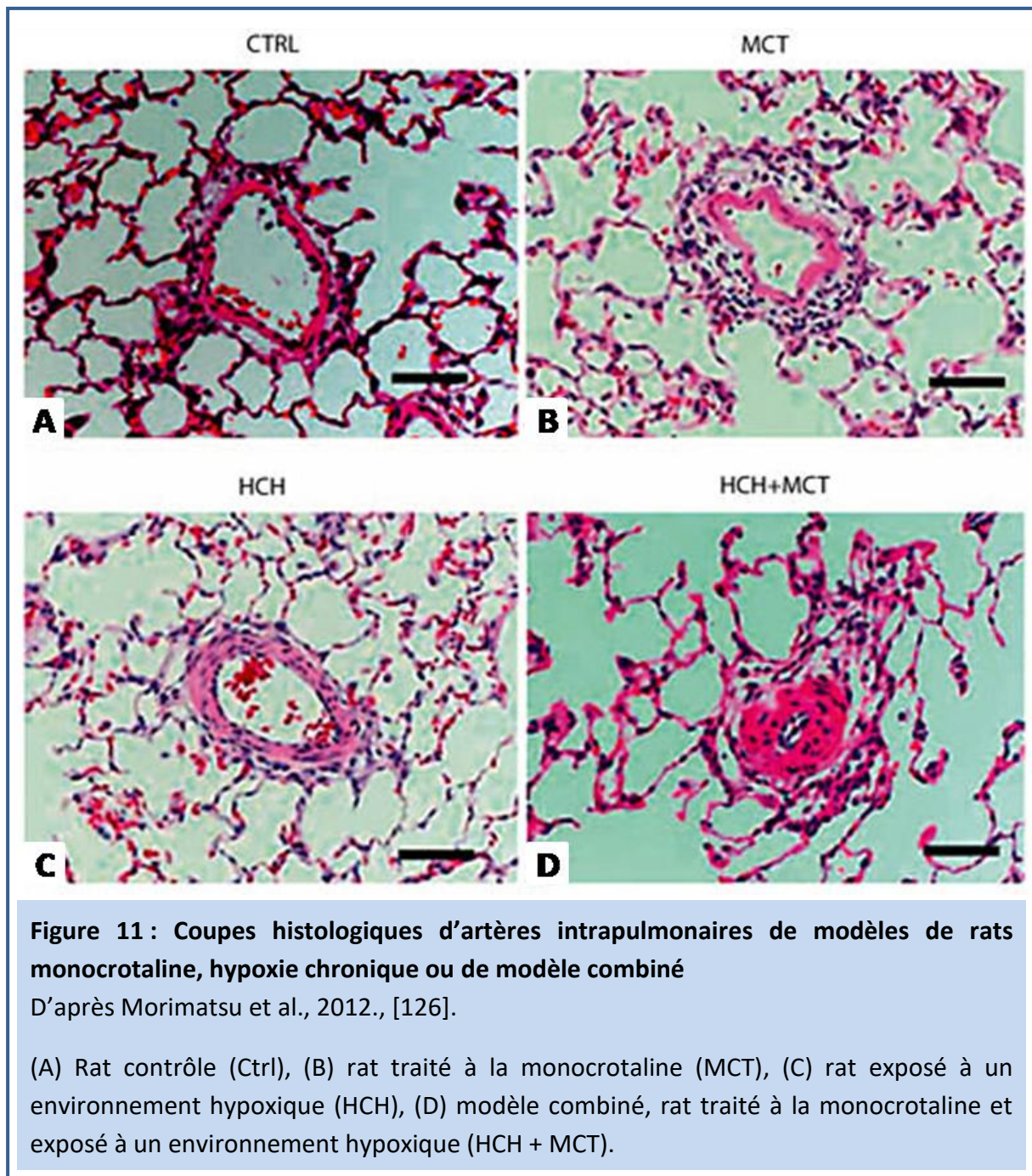
Une composante inflammatoire moins importante que pour le modèle utilisant la MCT (pas d'infiltrat inflammatoire) est observée. Bien que faible, cette inflammation reste primordiale dans la mise en place de cette HTP [119], [120].

A trois semaines, les PAPm sont augmentées (> 35 mmHg chez le rat) et le ventricule droit du cœur remodelé (hypertrophie cardiaque droite).

Il n'est pas retrouvé, dans ce modèle, d'obstruction vasculaire ou de lésions plexiformes, comme dans le modèle précédent. L'absence d'atteinte intimale est aussi une de ces limites. De plus, la mise en place de l'HTP est réversible chez l'animal après quelques jours passés à pression atmosphérique normale [121], [122].

Il est important de noter que l'âge des animaux joue un rôle dans l'instauration de la pathologie. En effet, l'effet de l'hypoxie chronique ou de l'injection de la monocrotaline sera plus marqué chez les animaux en pleine croissance (donc jeune). Il est donc indispensable de toujours utiliser des animaux de même âge pour la réalisation des expériences [123], [124].

De plus, seuls les animaux mâles sont utilisés pour ces modèles. En effet, les femelles sont de par leur statut hormonal, et plus précisément grâce à la présence de progestérone, protégées contre le développement de l'HTP pour ces modèles [125], [126].



c. Autres modèles d'hypertension pulmonaire (liste non exhaustive)

Les deux modèles présentés précédemment sont les deux modèles employés au cours de ma thèse. Cependant, d'autres modèles existent et apportent d'autres types d'approches de la pathologie afin d'essayer de reproduire les lésions types plexiformes retrouvées chez l'Homme.

i. Modèles sévères mimant l'hypertension pulmonaire de groupe 1

Modèle combinant l'injection de MCT et l'exposition hypoxie chronique

Développé au laboratoire et réalisé sur le rat, il associe une injection intrapéritonéale de MCT 60 mg/kg avec l'exposition à un environnement hypoxique de 3 semaines (identique au modèle hypoxie chronique) [127], [128].

Ce modèle est caractérisé par des PAPm qui correspondent à de l'HTAP sévère, un infiltrat inflammatoire, un remodelage vasculaire important des trois tuniques artérielles et une altération marquée de l'endothélium avec la présence de lésions thrombotiques et de types plexiformes (**Figure 11**).

Modèle SUGEN

Ce modèle, développé par l'équipe du Professeur Taraseviciene-Stewart en 2001 [129], combine l'injection (unique ou répétée selon l'espèce) d'un inhibiteur du site tyrosine kinase spécifique du récepteur au VEGF 2 le SU-5416, et une exposition de l'animal à un environnement hypoxique.

Seul, le SU-5416 cause une HTP dite moyenne, de par le remodelage artériel et les valeurs de PAPm induits. Mais, associé à un environnement hypoxique, le phénotype devient sévère et irréversible, et engage généralement le pronostic vital de l'animal (en fonction de l'espèce). Deux semaines suffisent à la diminution de l'expression d'ARN messagers pour la survie

cellulaire (Bcl-2, Bcl-X et IGF1) [130]. Enfin, on observe des lésions de l'endothélium de types plexiformes et des occlusions, une prolifération des cellules musculaires lisses entraînant un important épaissement de la paroi vasculaire, une insuffisance cardiaque droite et une PAPm élevée.

Pour ce modèle, le protocole comprend une injection de SU-5416 (injection unique de 20 mg/kg chez la souris et répétées pour les autres espèces), un passage de trois semaines dans un environnement hypoxique (un caisson hypobare, P = 380 mmHg), puis un retour dans des conditions normoxiques dix à onze semaines [129], [131], [132].

L'HTP développée avec ce modèle montre une résistance aux traitements comme pour l'HTAP humaine. De plus, jusqu'à présent les investigations n'ont pas montré d'effet délétère sur les autres organes du SU-5416. Bien que sévère, ce modèle ne présente pas d'infiltration de monocytes ou macrophages.

ii. Modèles animaux génétiquement modifiés

Des rats génétiquement modifiés pour surexprimer l'angiopoïétine 1 développent une HTP dite sur « hypertrophie médiale » [133]. L'angiopoïétine 1 est, entre autres, responsable de la maturation des vaisseaux, et chez l'adulte, de la quiescence vasculaire.

Des souris surexprimant, au niveau du muscle lisse de l'artère, le transporteur à la sérotonine (5-HTT) développent une HTP en normoxie et connaissent une diminution de la vasoréactivité à l'hypoxie [134].

Les rats fawn hooded sont une souche de rats développant spontanément une HTP. Ils présentent un déficit de stockage plaquettaire de la sérotonine élevant alors les concentrations en sérotonine libre dans la circulation sanguine [135], [136]. Les effets vasoconstricteurs et mitogènes de la sérotonine s'en retrouvent amplifiés tout comme dans l'HTP.

iii. **Modèle hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né**

La ligature du canal artériel *in utero* chez l'animal permet d'observer une Hypertension Pulmonaire Persistante du Nouveau-né (HTPN) : on y observe un remodelage sévère des 3 tuniques, ainsi qu'une altération de la relaxation endothéliale [137], [138].

5. Les traitements

Actuellement, il n'existe pas de traitement pharmacologique curatif pour l'HTP. La stratégie thérapeutique engagée agit sur la symptomatologie de la maladie. Elle a pour but d'améliorer la survie et le confort de vie des malades par des traitements médicamenteux et une hygiène de vie particulière. Parmi les traitements proposés, il y a les traitements médicamenteux spécifiques qui s'attaquent directement aux différents mécanismes intervenant dans le développement de l'HTAP et les médicaments non spécifiques traitant plutôt des conséquences de la pathologie. Il existe aussi des traitements non médicamenteux généralement chirurgicaux.

Chaque type d'HTP est pris en charge de façon différente en fonction de l'étiologie et des caractéristiques de la maladie. La stratégie thérapeutique consiste généralement à combiner les différentes familles thérapeutiques afin de cibler les différentes voies dysfonctionnelles de l'HTP.

a. Les traitements médicamenteux spécifiques

Les traitements médicamenteux spécifiques agissent sur des mécanismes participant au développement de l'HTP. Ces médicaments sont généralement des traitements à vie.

i. Les inhibiteurs de l'influx calcique

Dans l'HTP, la $[Ca^{2+}]$ intracellulaire des CMLAP est augmentée. Les inhibiteurs des canaux calciques voltage-dépendants diminuent les influx de calcium dans la cellule. Ils permettent la vasodilatation du vaisseau via leur effet sur les CMLAP et ainsi diminuent la PAPm et les RVP. Ils ne sont pas décrits pour avoir un effet sur le remodelage vasculaire. Les inhibiteurs calciques utilisés dans ce cadre sont le diltiazem, la nifédipine et l'amlodipine.

ii. La voie de la prostacycline

La prostacycline a une action vasodilatatrice et antiproliférative. Elle inhibe aussi l'agrégation plaquettaire. Dans l'HTP, il y a un défaut au niveau de sa production, les médicaments traitant cette voie ont pour but de pallier à son absence [139]. Il s'agit d'analogues de la prostacycline. Les molécules disponibles sont l'époprosténol, le tréprostinil et l'iloprost.

La prostacycline et ses analogues ont une durée de vie très courte et ne peuvent être administrés par voie orale. Leur distribution dans le corps humain doit être continue.

L'époprosténol est utilisé dans les cas graves d'HTP. Il est administré par voie intraveineuse (IV) en continu par une pompe portable reliée à un cathéter central. Il s'agit d'un traitement très lourd mais qui a nettement amélioré le pronostic de la maladie.

Le tréprostinil peut être utilisé par voie sous-cutanée (SC) en continu. Mais il est souvent très mal toléré par les patients au niveau du point de perfusion amenant à un arrêt de son utilisation.

L'iloprost peut être utilisé par inhalation. Il semble moins efficace que les deux autres. Il nécessite 6 à 9 inhalations par jour de 10 minutes chacune.

Ces traitements sont très contraignants. Un agoniste sélectif du récepteur à la prostacycline a été développé, le sélexipag, commercialisé depuis mai 2016. Il agit de façon similaire aux analogues de la prostacycline mais est administré par voie orale grâce à sa formule chimique adaptée. En janvier 2017, il avait été suspecté d'être lié au décès de 5 patients survenus précocement après le début du traitement et il avait été recommandé de ne plus initier de

nouveau traitement. Cette mesure a été levée en avril 2017, mais ce médicament reste sous étroite surveillance au niveau européen.

iii. La voie de l'endothéline

L'endothéline est synthétisée par les CE et favorise la prolifération vasculaire et la vasoconstriction. Elle est produite en excès dans l'HTP. Les traitements impliqués dans cette voie consistent à enrayer l'action de l'endothéline en bloquant ses récepteurs. Ainsi le bosentan, l'ambrisentan et le macitentan permettent d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses et contribuent à dilater les vaisseaux [140]. Ces médicaments sont administrés par voie orale et sont généralement bien tolérés. Ils sont utilisés en première intention chez des malades ayant une forme moyennement sévère de la maladie.

iv. La voie du NO

Le NO, tout comme la prostacycline, souffre d'un défaut de production dans l'HTP. Le NO possède lui-aussi un effet vasodilatateur et inhibiteur de la prolifération vasculaire. Etant un gaz à temps de demi-vie très court, il est difficilement envisageable d'imaginer son administration en continu chez le patient. Les médicaments utilisés dans cette voie agissent sur le NO de manière indirecte. Il s'agit d'inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5. Le NO produit par les CE diffuse vers les CML où il stimule l'activité de la Guanylate Cyclase soluble (GCs) responsable de la synthèse du GMP cyclique. Le GMP cyclique, qui par son implication dans la diminution du calcium intracellulaire, est responsable de la vasorelaxation de la CML. La phosphodiesterase de type 5 est responsable de la dégradation du GMP cyclique. Ces médicaments permettent donc l'augmentation de la concentration intracellulaire de GMP cyclique et la vasodilatation du vaisseau [141]. Les molécules proposées sont le sildénafil et le tadalafil.

Il a aussi été développé un stimulateur de la GCs, le riociguat, qui permet d'augmenter la synthèse de GMPc en stimulant directement la GCs (indépendamment du NO) et en augmentant la sensibilité de la GCs au NO par la stabilisation du complexe GC-NO[142].

L'ensemble de ces médicaments est administré par voie orale.

b. Les traitements non spécifiques

L'objectif de ces médicaments est d'éviter des complications liées à l'HTP.

Les anticoagulants : les anticoagulants employés sont les antivitaminiques K. Ils sont utilisés lorsque l'HTP présente des risques d'anomalie de la coagulation et de la fibrinolyse. Des traitements administrés sur du long terme en IV peuvent aussi rendre nécessaire la prise de ces médicaments car ils augmentent le risque de thrombose.

Les diurétiques : les diurétiques, comme le furosémide et la spironolactone, permettent de diminuer la volémie et ainsi la surcharge ventriculaire. Ils sont à utiliser avec précaution, particulièrement pour les patients âgés au vu de l'impact sur la fonction rénale. Un ionogramme sanguin régulé doit être effectué.

Les digitaliques : d'après la Haute Autorité de Santé (HAS), les digitaliques peuvent être prescrits en cas de fibrillation auriculaire permanente ou paroxystique. Ils permettent d'améliorer la fonction cardiaque, mais leur utilisation doit être prudente en particulier dans les formes sévères d'HTAP avec hypoxémie ou en cas d'altération de la fonction rénale. La molécule la plus utilisée est la digoxine.

c. Les traitements non médicamenteux

L'oxygénothérapie au long cours : l'oxygénothérapie est prescrite le plus souvent lorsque le patient souffre d'une hypoxémie importante ($\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$). L'objectif du traitement est principalement symptomatique et a pour but de maintenir la PaO_2 du patient au dessus de 60 mmHg

La chirurgie : La chirurgie est généralement pratiquée pour les formes sévères d'HTP, en dernier recours en cas d'échec des traitements médicamenteux.

- **L'atrioseptostomie** : cette opération consiste à réaliser une ouverture dans le septum inter-auriculaire par voie endovasculaire. Elle permet de faire diminuer les pressions droites et améliore ainsi le débit cardiaque.
- **La transplantation pulmonaire** : la transplantation pulmonaire est le dernier recours thérapeutique. Actuellement, on privilégie les transplantations bipulmonaires ou cardio-pulmonaires (bloc cœur/poumon). Il s'agit du seul traitement curatif de l'HTP.

En complément des traitements, il est très important d'adapter le mode de vie des patients afin d'aider au soulagement des symptômes de la maladie. Ainsi, il est recommandé de limiter ses efforts en préservant un minimum d'exercice (comme la marche quotidienne), d'avoir un régime hyposodé et une bonne hygiène de vie (contrôler son poids et ne pas fumer).

d. Vers de nouvelles pistes de traitements

Différentes pistes thérapeutiques sont à l'étude. On s'intéresse, entre autres, à la voie de la sérotonine [143]–[145] qui est impliquée dans de nombreux mécanismes délétères de la maladie via l'utilisation d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine. Une autre cible potentielle est le ciblage du Peptide Intestinal Vasoactif (VIP). Il s'agit d'une hormone neuropeptidique capable d'induire une vasodilatation pulmonaire et ayant des propriétés anti-proliférative des CML, anti-agrégation plaquettaire et anti-inflammatoire [146].

Actuellement, malgré de nombreux progrès dans le domaine, il n'existe pas de traitement curatif (excepté chirurgical) pour l'HTP et le pronostic de l'HTAP idiopathique, par exemple, reste sombre avec une survie de 55 % à trois ans [147]. Il est donc primordial de poursuivre les recherches afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques plus efficaces. De nombreux traitements actuels agissent comme modulateur de la concentration du calcium intracellulaire (les inhibiteurs de l'influx calcique et les agents pharmacologiques de la voie du NO) qui voit sa concentration basale augmenter au cours de l'HTP. De plus, le calcium est un messager secondaire très impliqué dans de nombreuses voies de signalisation

(cf. page 45). Etudier d'autres cibles agissant sur la régulation du calcium intracellulaire est une piste intéressante pour lutter contre l'HTP.

III. Les canaux TRP et l'hypertension pulmonaire

1. L'importance de l'homéostasie calcique

Le calcium est l'un des principaux messagers intracellulaires. Il est responsable de l'activité de nombreuses enzymes et intervient dans les phénomènes d'exocytoses. Ses variations de concentration intracellulaire vont déclencher des réponses moléculaires et cellulaires adaptatives. Dans la CML par exemple, une augmentation transitoire de calcium intracellulaire peut être responsable de l'activité contractile de la cellule : le calcium intracellulaire va former un complexe avec la calmoduline et activer la kinase légère de la chaîne légère de la myosine (MLCK) responsable de la contraction. Les mécanismes de prolifération et de migration passent aussi par les voies de signalisations calciques. Le calcium est également lié à la mort cellulaire par apoptose [148]. En effet, une concentration intracellulaire trop importante de calcium dans le cytosol déclenche l'activation de diverses lipases et phosphatases pouvant provoquer la mort cellulaire.

Dans les cellules eucaryotes, la $[Ca^{2+}]$ cytoplasmique basale est maintenue aux alentours de 100-200 nM alors que dans le milieu extracellulaire, elle est de 1 à 2 mM.

Il existe trois principales réserves calciques intracellulaires : le Réticulum Endo/Sarcoplasmique (RE/RS), la mitochondrie et les lysosomes (**Figure 12**). Le RE/RS et la mitochondrie jouent un rôle important dans les voies de signalisations du calcium.

Le RE/RS est le principal réservoir de calcium intracellulaire. Il va être responsable de l'amplification de la réponse calcique grâce à la libération du calcium intracellulaire par activation des Récepteurs à l'inositol trisPhosphate (RIP₃) et à la ryanodine (RRy). La réponse de certains récepteurs membranaires est couplée à l'activation d'une phospholipase C capable de cliver le phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate en DiAcylGlycérol (DAG) et en Inositol TriPhosphate (IP₃). L'IP₃ se fixe à ses RIP₃ présents sur le RE/RS qui libèrent alors du calcium au niveau intracellulaire. Le RRy, quant à lui, est un canal cationique dont le principal modulateur endogène est le calcium. Ainsi, la concentration intracellulaire en ions calcium permettra l'activation ou l'inhibition du canal [149]. L'activité du RRy peut être couplée à l'ouverture de canaux de la membrane plasmique perméable au calcium. Une étude menée

au laboratoire [150] montre un lien entre l'ouverture du canal TRPV4 (« Transient Receptor Potential Vanilloid » de type 4) (cf. page 55), un canal cationique non sélectif mais majoritairement perméable au calcium, et l'activation des R_{Ry} permettant ainsi l'amplification du signal calcique. Le RE/RS joue aussi un rôle de tampon en recapturant le calcium cytosolique dans le réticulum via les pompes SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase).

La mitochondrie va avoir un rôle de « dissipateur » de calcium en cas d'excédent dans le cytosol : elle stocke temporairement le calcium puis le relâche dans le cytosol progressivement [151]. Deux canaux sont particulièrement impliqués dans ce circuit, le VDAC (Voltage-Dependant Anion Channel) et le MCU (Mitochondrial Calcium Uniport) [152]. Le lysosome est un organe riche en ions calcium. Suite à son activation par un messenger secondaire le NAADP (Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate), produit à partir du NADP, il libère du calcium dans le cytosol par ses canaux « Two Pore Channel » (TPC). Cette libération de calcium peut être amplifiée par l'activation des récepteurs R_{Ry} et participer ainsi aux mécanismes cellulaires menant par exemple à la contraction, la prolifération et la sécrétion [153].

Au niveau de la membrane plasmique se présentent aussi plusieurs structures protéiques qui participent à la régulation de la signalisation calcique (**Figure 12**) : la PMAC (Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase), l'échangeur sodium/calcium (Na⁺/Ca²⁺), les Canaux Calciques Voltage-Dépendants (CCVD) et les canaux cationiques voltage-indépendants. La pompe Ca²⁺-ATPase permet la sortie du calcium de la cellule contre l'entrée de protons (H⁺) grâce à l'énergie que procure l'hydrolyse de l'ATP avec pour stœchiométrie 2 H⁺/1 Ca²⁺. L'échangeur Na⁺/Ca²⁺ échange un ion Ca²⁺ contre trois ions Na⁺ selon le gradient électrochimique du sodium. Généralement l'échangeur va dans le sens d'une sortie du calcium contre l'entrée du sodium mais cela peut être inversé en fonction du gradient électrochimique du sodium [154]. Les CCVD s'ouvrent suite à une dépolarisation de la membrane et font rentrer le calcium dans la cellule. Les canaux cationiques indépendants du voltage, quant à eux, sont généralement non sélectifs au calcium. Ils sont classés selon leurs modes d'activation. Parmi eux, se présentent les canaux mécanosensibles comme les « Stretch-Activated Channels » (SAC) dont les TRP (Transient Receptor Potential) (cf. page 51).

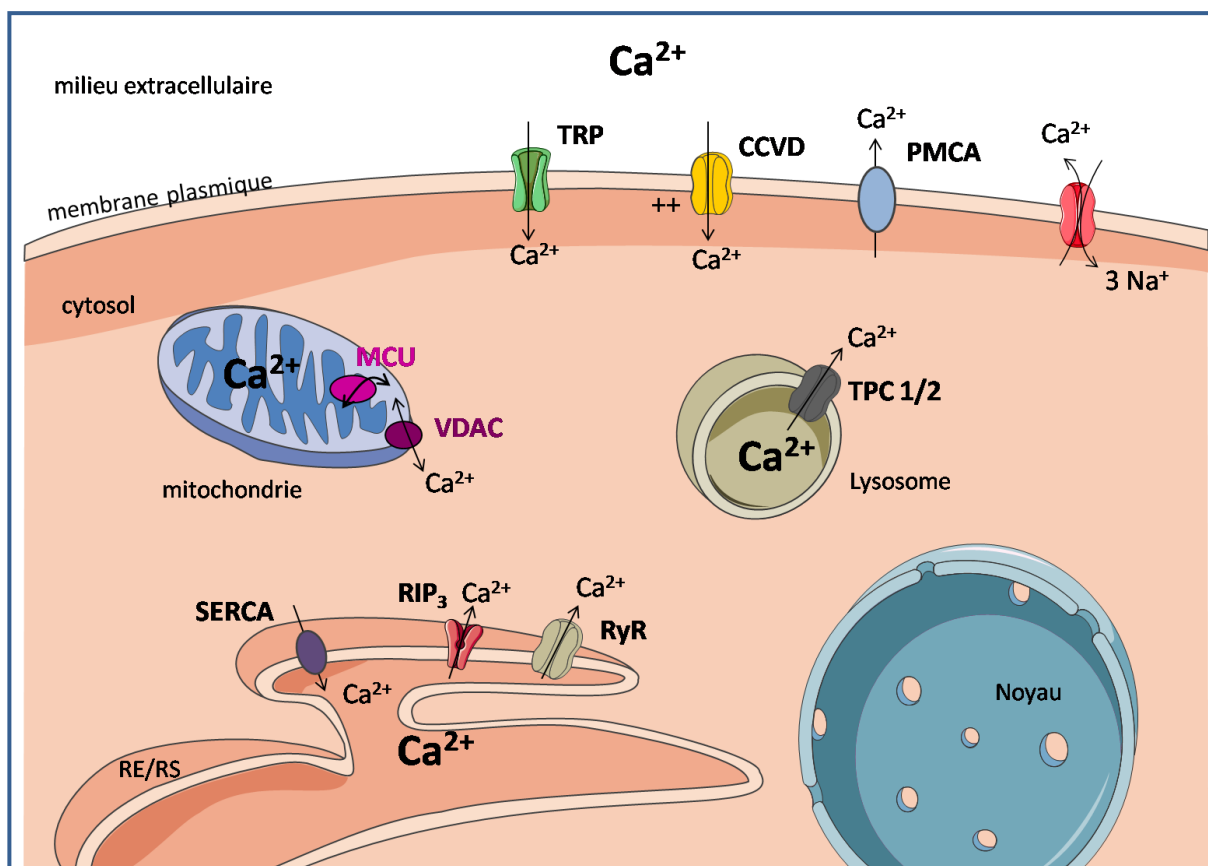


Figure 12 : Schéma de la signalisation calcique

D'après la thèse de Parpaite T., Rôle de l'environnement cellulaire sur les canaux sensibles à l'étirement dans l'hypertension pulmonaire, 2015.

Le calcium est l'un des principaux messagers intracellulaires, il est l'objet d'une fine régulation au sein de la cellule assurée par la présence de canaux, de pompes et d'échangeurs exprimés sur la membrane cellulaire ainsi que sur les organites cellulaires. Ces systèmes permettent le maintien de l'homéostasie calcique ou assurent l'amplification contrôlée des signaux calciques. (TRP : Transient Receptor Potential channel, CCVD : Canaux Calciques Voltage-Dépendants, PMCA : Plasmic Membrane Ca^{2+} ATPase, TPC : Two-Pore Channel, SERCA : Sarco/Endoplasmique Reticulum Ca^{2+} ATPase, RyR : Récepteur à la Ryanodine, RIP_3 : Récepteur à l' IP_3 , MCU : Mitochondrial Calcium Uniport, VDAC : Voltage Dependend Anion Channel.)

Le calcium et sa régulation ont donc un rôle primordial dans l'activité cellulaire. La perturbation de l'homéostasie calcique est impliquée dans de nombreuses pathologies. Dans l'HTP, elle participe aux divers aspects de la physiopathologie de la maladie : l'inflammation, l'hyperréactivité vasculaire et le remodelage artériel (cf. page 19). Les études ont, jusqu'à présent, majoritairement porté sur l'impact de cette dérégulation au niveau de la *media* et

de l'*intima*. Pourtant la dérégulation du calcium dans les fibroblastes a, elle aussi, été décrite comme impliquée dans de nombreuses maladies. Dans les fibroses pulmonaire et cardiaque, où le fibroblaste est majoritairement responsable du remodelage délétère observé, la réduction du stress du RE (engendrant une perturbation de l'homéostasie calcique) réduit la fibrose pulmonaire [154] tandis que le blocage des canaux calciques voltage-dépendants diminue la formation du tissu fibreux au niveau du cœur [155], [156]. La fibrose intervient dans le processus évolutif d'une inflammation chronique et se définit par la prolifération, la différenciation des fibroblastes ainsi que plus particulièrement la surproduction de MEC. L'ensemble de ces phénomènes figure dans le remodelage adventiciel observé au cours de l'HTP.

Un autre exemple de l'importance de l'homéostasie calcique dans les fibroblastes a été rapporté par l'étude de Ji et al. [157]. En effet, ils montrent que sa dérégulation dans les fibroblastes de la peau est impliquée dans les dommages observés suite à l'exposition aux rayons Ultra-Violet B (UVB). Ces rayons, responsables de cancers de la peau, sont capables d'atteindre l'épiderme et de léser l'ADN des cellules présentes. L'équipe explique que les UVB induisent la déplétion en calcium du RE, l'expression de marqueurs de stress du RE, ainsi que la mort cellulaire. En rétablissant la fonction du RE et ainsi l'homéostasie calcique (via l'utilisation du salubrinal, une molécule connue pour son rôle protecteur de la cytotoxicité induite par le stress du RE), ils préviennent les dommages dûs à ce photoagent.

L'ensemble de ces données suggère l'importance du calcium dans les fibroblastes d'AIP dans le contexte physiopathologique de l'HTP. Il paraît donc judicieux d'étudier le rôle des canaux de la membrane plasmique perméables au calcium. Notre choix s'est porté sur un canal de la famille des TRP, le canal TRPV4, un canal cationique non sélectif mais majoritairement perméable au calcium possédant une autre particularité d'intérêt dans la pathologie : une mécanosensibilité.

2. Les canaux mécanosensibles

Le stress physique appliqué sur les vaisseaux au cours de l'HTP, engendré par l'augmentation des contraintes de cisaillement, de la pression intraluminale ainsi que par l'élévation des tensions pariétales, est une autre composante majeure de la pathologie qui doit être prise en considération.

Les «Stretch-Activated Channels» (SAC) sont des canaux décrits comme sensibles à l'étirement cellulaire. Il s'agit de canaux mécanotransducteurs, c'est-à-dire capables de convertir des signaux physiques (déformation de la membrane cellulaire par exemple) en signaux biologiques. Les modifications de la composition de la MEC qui influencent la rigidité de l'environnement cellulaire, sont aussi à prendre en compte dans les réponses de ces canaux.

Un canal mécanotransducteur se définit de la façon suivante : la perte de son expression doit conduire à une perte de la mécanosensibilité et son expression hétérologue (c'est-à-dire l'expression du gène dans un organisme hôte ne possédant pas naturellement ce gène) doit conduire à l'acquisition de la capacité à répondre à un stimulus mécanique. Aussi, les propriétés pharmacologiques et biophysiques du canal candidat doivent correspondre au courant endogène étudié et des modulateurs de la mécanosensibilité doivent montrer des effets sur l'activité du canal.

Il existe des inhibiteurs des SAC non spécifiques d'un canal SAC particulier. Le peptide GsMTx-4, issu du venin de tarentule *Grammostola spatulata*, bloque l'activité des SAC en empêchant l'ouverture du canal sans bloquer le pore [158]. Le gadolinium et la streptomycine bien que moins spécifiques des SAC, sont deux autres molécules utilisées pour l'inactivation des SAC.

Leurs mécanismes d'activation sont sujet à débat, trois mécanismes sont proposés à ce jour [159] : l'activation du canal par application directe de variations de tension sur la membrane cellulaire, l'activation par l'intermédiaire de protéines du cytosquelette ou de la MEC et, l'activation indirecte par la production d'un second messager (**Figure 13**).

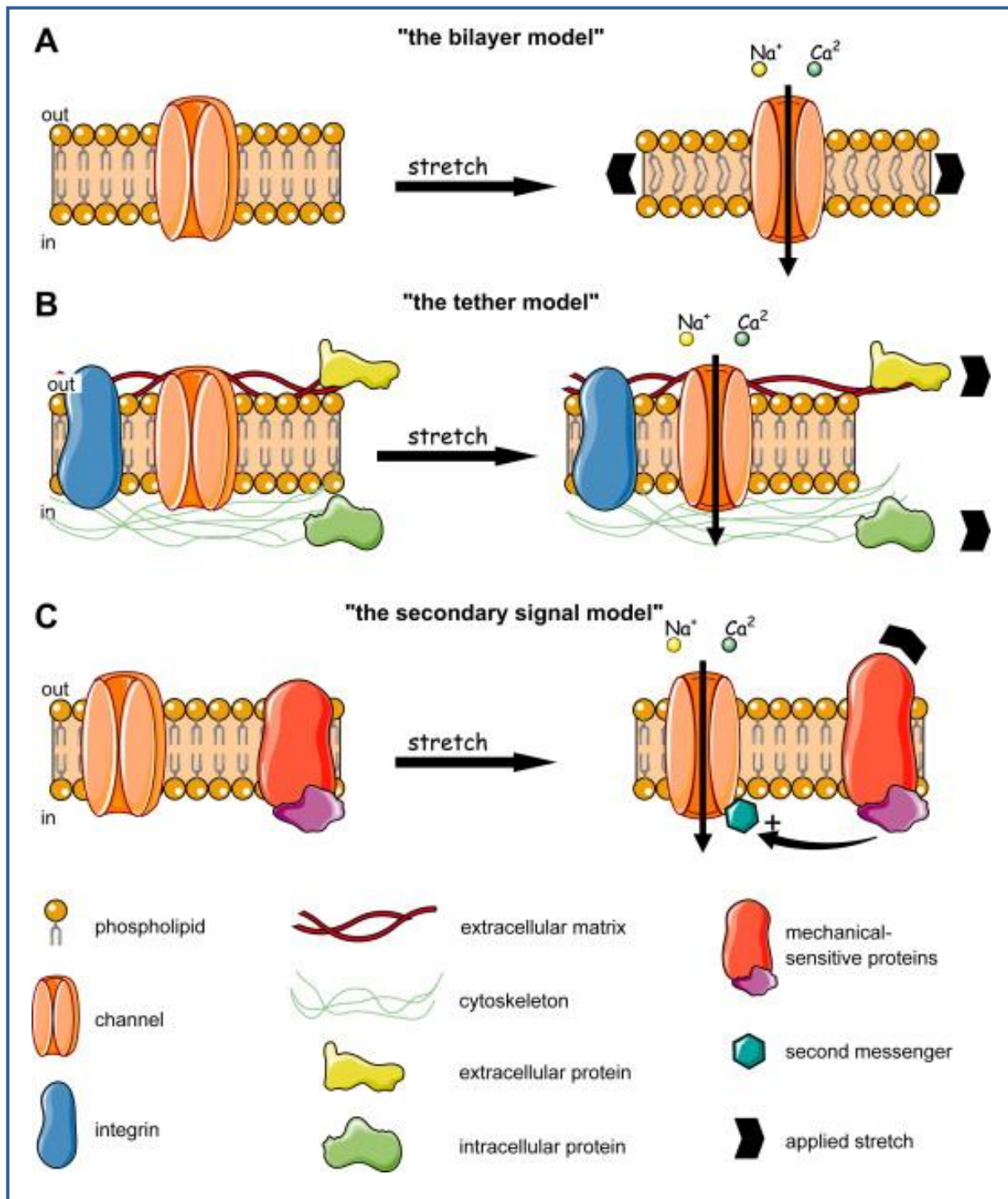


Figure 13 : Mécanismes d'activation des SAC

D'après Guibert C et al, 2008 [158].

(A) Activation directe par variation de tension de la membrane plasmique, (B) Ouverture du canal via sa liaison aux protéines du cytosquelette et/ou à la MEC. (C) Activation indirecte du canal par l'intermédiaire d'un second messenger ou d'une phosphorylation du canal produit par un senseur au stress mécanique situé non loin sur la membrane.

Parmi les canaux répondant aux caractéristiques qui définissent les mécanotransducteurs, il y a de nombreux membres de la famille des TRP (« *Transient Receptor Potential* »). En effet, certains sont, entre autres, responsables des phénomènes de mécanotransduction retrouvés au niveau de l'oreille interne [160], [161] (dans les cellules ciliées de la cochlée) ou au niveau neuronal pour la nociception. Il s'agit de canaux cationiques non sélectifs perméables aux ions calcium, en grande majorité.

Deux canaux directement sensibles à l'étirement ont été récemment découverts : Piezo 1 et Piezo 2. Ce sont des canaux cationiques non sélectifs possédant un nombre très important de domaines transmembranaires (30 à 40) [162], [163]. Ils auraient un rôle dans la sensibilité aux contraintes de cisaillement du système vasculaire [164] et, dans la régulation du flux urinaire et de la distention de la vessie [164].

3. Les canaux TRP et l'hypertension pulmonaire

a. La classification des canaux et leurs structures

L'archétype de ce canal TRP a été découvert en 1969 chez *Drosophila melanogaster*, par Cosens et Manning, et décrit pour son rôle dans la phototransduction impliquant un signal calcique [165].

Aujourd'hui, les canaux TRP forment une superfamille qui en fonction des homologies de leurs acides aminés, se divise en 7 sous-familles (**Figure 14**) : les TRPC (« canonical »), les TRPM (« Melastatin »), les TRPV (« Vanilloid »), TRPA (« Ankyrin »), TRPP (« Polycystin »), TRPML (« Mucolipin ») et TRPN (ou NOMPC pour « NO Mechanoreceptor Potential C »). Les sous-familles TRPC et TRPM regroupent respectivement sept et huit types de canaux (TRPC1-TRPC7 et TRPM1-TRPM8), les TRPV contiennent 6 membres (TRPV1 à TRPV6) et les TRPP, TRPML et TRPN respectivement cinq, trois et trois membres. Les différents TRP s'assemblent en homo- ou hétéro-tétramères formant ainsi un canal cationique non sélectif [166].

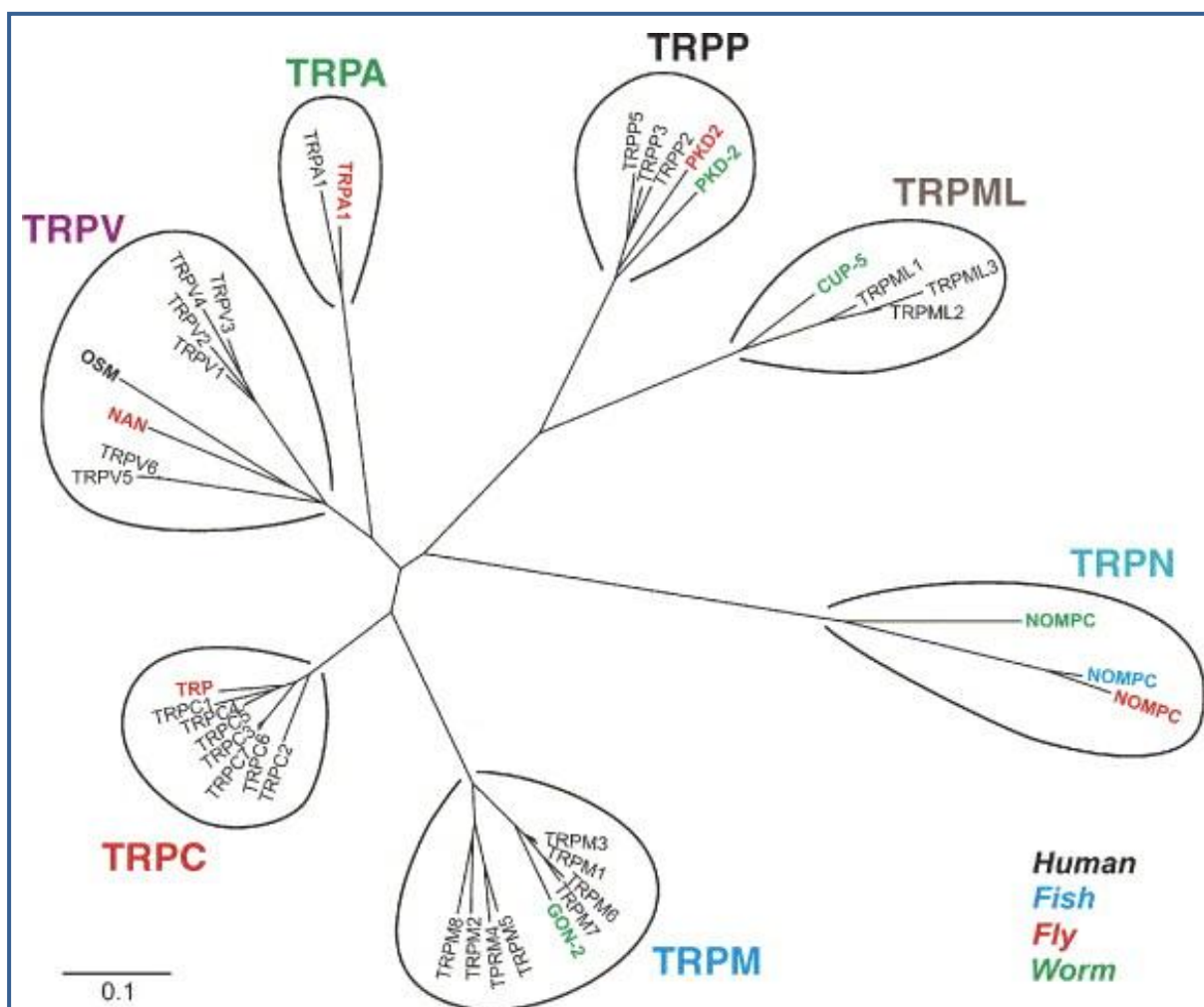


Figure 14 : Arbre phylogénique de la superfamille des canaux TRP « Transient Receptor Potential »

D'après Pedersen, S.F. et al., 2015, [165].

Les canaux TRP forment une superfamille divisée en 7 sous familles : les TRPC (« canonical »), les TRPM (« Melastatin »), les TRPV (« Vanilloid »), TRPA (« Ankyrin »), TRPP (« Polycystin »), TRPML (« Muclipin ») et TRPN (ou NOMPC pour « NO Mechanoreceptor Potential C »).

D'un point de vue structural tous les canaux TRP contiennent six domaines transmembranaires formant un pore entre les cinquièmes et les sixièmes domaines (**Figure 15**) et ayant de longs domaines C-Ter et N-Ter cytosoliques. Sur le domaine N-Ter se présentent des motifs ankyrines dont le nombre de répétitions varie selon les canaux. Ces domaines sont utiles pour les interactions protéines-protéines et les liaisons au cytosquelette. Sur la partie C-Ter figure le domaine « TRP ». Ce domaine est presque invariant pour toutes les isoformes [167].

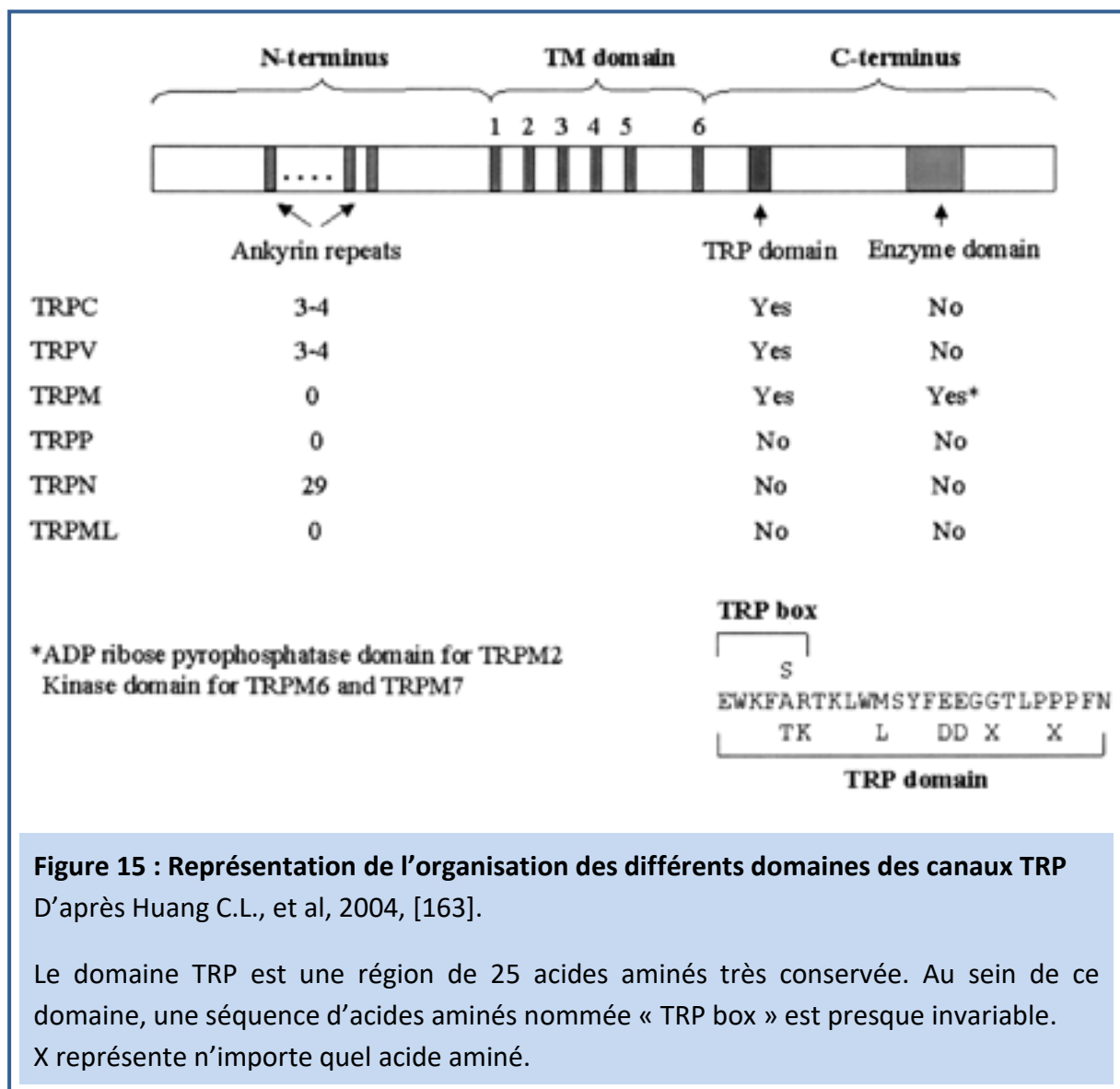


Figure 15 : Représentation de l'organisation des différents domaines des canaux TRP
D'après Huang C.L., et al, 2004, [163].

Le domaine TRP est une région de 25 acides aminés très conservée. Au sein de ce domaine, une séquence d'acides aminés nommée « TRP box » est presque invariable. X représente n'importe quel acide aminé.

b. L'activation des TRP

L'étude des propriétés biophysiques des canaux TRP s'effectue principalement par expression hétérologue.

Tous les canaux TRP sont perméables aux cations. Leur perméabilité au calcium varie considérablement en fonction des isoformes [168]. La structure du pore joue un rôle essentiel dans cette perméabilité et dans la sélectivité du canal [169], [170]. Le ratio P_{Ca}/P_{Na} varie de 0,3 pour TRPM2 à plus de 100 pour les TRPV5 et TRPV6. Les canaux TRPM5 et TRPM6 sont eux imperméables au calcium.

Les canaux TRP sont polymodaux : ils peuvent être activés de façon très variée par des messagers intra- ou extracellulaires, des composés chimiques, des stimulations mécaniques ou un stress osmotique et en fonction de l'état de remplissage des réservoirs calciques intracellulaires [171]. Beaucoup sont sensibles à des effets thermiques comme TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM3, TRPM8 et TRPA1 [172]. Certains TRP sont constitutivement ouverts comme TRPC3 et TRPC6 [173].

De nombreux membres de cette superfamille sont identifiés pour avoir une activité mécanosensible. Parmi eux, on retrouve TRPA1 TRPC1, TRPC6, TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM4, TRPM7, TRPP1 et TRPP2 [174]–[178]. Cette activité participe au tonus myogénique via les CML et à la sensibilité au flux sanguin des cellules endothéliales [179].

L'étude des TRP est rendue délicate par leur capacité à former des hétéromères qui de par leurs assemblages différents pourraient former des canaux de fonctionnalités distinctes comme analogues. L'utilisation de variants dominant-négatifs ou d'ARN antisens peut perturber tant les homo- que les hétérotétramères. Aussi, le risque de redondance fonctionnelle pourrait dans des cas de « knockdown » ou « knockout » compenser la perte d'une isoforme.

Des souris transgéniques pour différentes isoformes de ces canaux sont disponibles. Au laboratoire, nous avons à notre disposition la souris KO pour le gène *trpv4* [180] grâce au don du Professeur Philippe Gailly de l'université Catholique de Louvain en Belgique.

4. L'isoforme TRPV4

a. La structure du canal TRPV4

TRPV4 aussi appelé OTRPC4 (« OSM-9-like TRP Channel 4), TRP12 et VROAC (« vanilloid Receptor-Related Osmotically Activated Channel ») est à 40 % identique à la structure de TRPV1 et 2. Le gène humain de *trpv4* est localisé sur le chromosome 12q23-q24. La protéine est formée de 871 acides aminés ce qui représente un poids moléculaire de 98 kDa. Il existe cinq épissages alternatifs pour ce gène mais deux seulement s'insèrent dans la membrane plasmique [181], [182]. Chez les mammifères, le gène *trpv4* conserve un haut degré d'homologie de séquence (~95–98%).

Le canal TRPV4 est ubiquitaire. Il est principalement exprimé dans les reins, le cœur, l'oreille interne et le cerveau mais aussi dans le foie, la trachée, les glandes salivaires, l'épithélium, et les poumons [183]–[185].

Sa structure (**Figure 16**) présente, comme tous les canaux TRP, six domaines transmembranaires avec la formation du pore entre les domaines 5 et 6. Au niveau du N-Ter cytosolique est retrouvé trois à quatre répétitions du motif ankyrine. Ce domaine serait responsable de sa liaison avec les protéines du cytosquelette [186] et les tronquer influencerait sur l'adressage de TRPV4 à la membrane. Ce domaine ankyrine de la partie N-Ter serait aussi fortement impliqué dans l'oligomérisation de TRPV4 en hétérotétramère [181], [187]. La partie C-Ter serait responsable de la sensibilité à la concentration de calcium intracellulaire du canal grâce à la présence de domaines de liaison au complexe Ca^{2+} -calmoduline [188]. Elle pourrait aussi être importante dans le processus d'oligomérisation [189].

TRPV4 est un canal cationique non sélectif, perméable au calcium, au magnésium et au sodium avec un ratio $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ proche de 6 et $P_{\text{Mg}}/P_{\text{Na}}$ de 3 [190], [191].

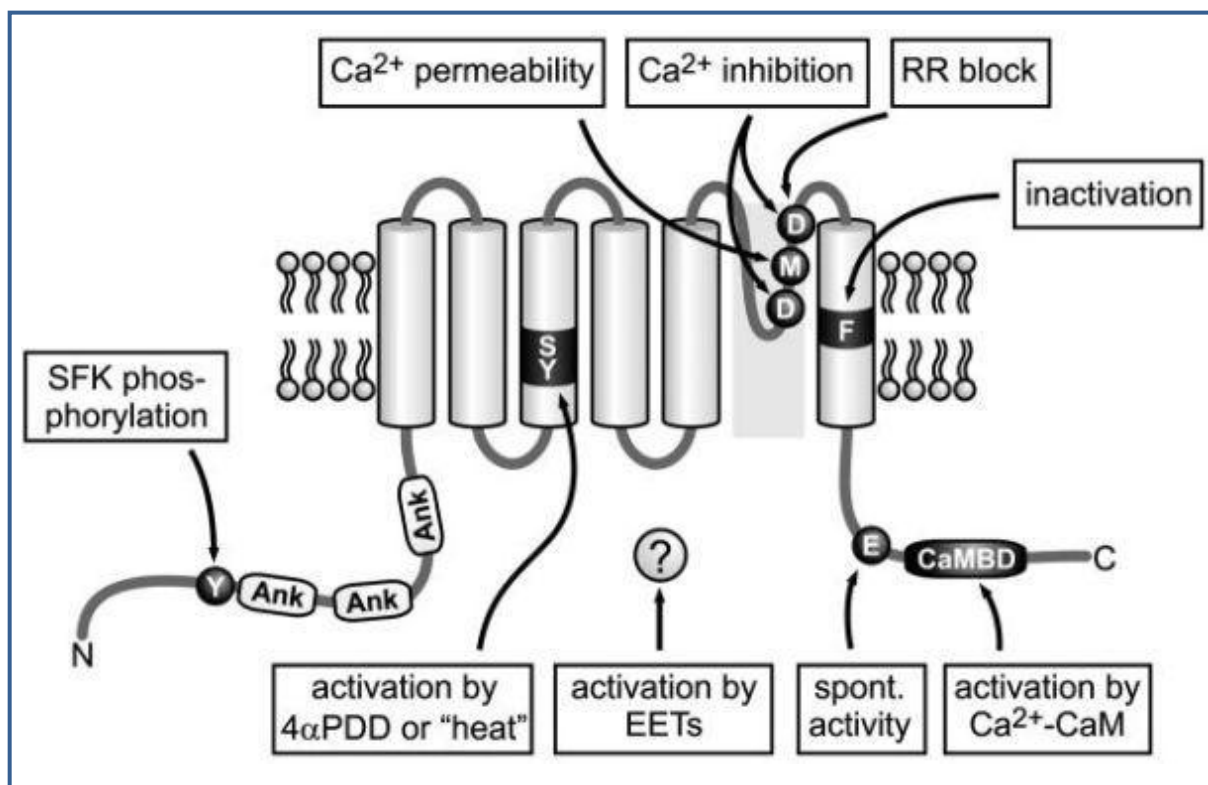


Figure 16 : Structure du canal TRPV4

D'après Plant T.D. et Strotmann R., 2007, [192].

TRPV4 possède six domaines transmembranaires avec la formation du pore entre les domaines 5 et 6. Les terminaisons N-Ter et C-Ter sont cytosoliques, au niveau du N-Ter, on retrouve trois à quatre répétitions du motif ankyrine.

b. Les différents modes d'activation de TRPV4

Le canal TRPV4 a d'abord été décrit comme un canal osmosensible, c'est-à-dire capable de s'activer suite à des modifications de l'osmolarité. Dans des conditions physiologiques normales, l'osmolarité du liquide extracellulaire est d'environ 285 mosmol / kg de molécule d'H₂O et est maintenue constante par l'homéostasie des fluides corporels. Des expériences d'expression hétérologue du gène *trpv4* ont montré que l'application d'une solution hypotonique augmentait l'activité du canal, et par ce fait, la concentration intracellulaire en ions calcium. L'inverse est observé en milieu hypertonique (**Figure 17**). Ces variations d'activité ont lieu pour de faibles modifications d'osmolarité [184], [186], [192], [193]. La souris KO pour le gène *trpv4* présente une anomalie pour la régulation de

l'osmolarité des fluides corporels : elle est dite « hyperosmolaire », ressent moins la soif et la réponse des CE à des solutions hypotoniques est abolie [180], [194], [195]. L'hyper- et l'hypo- osmolarité causent des variations de volumes cellulaires (respectivement rétrécissement ou « gonflement » de la cellule) engendrant ainsi des tensions au sein de la membrane cellulaire qui affectent de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation cellulaires [196], [197]. Ces variations de tension appliquées à la membrane cellulaire ne sont pas sans rappeler les mécanismes impliqués dans la mécanosensibilité [198].

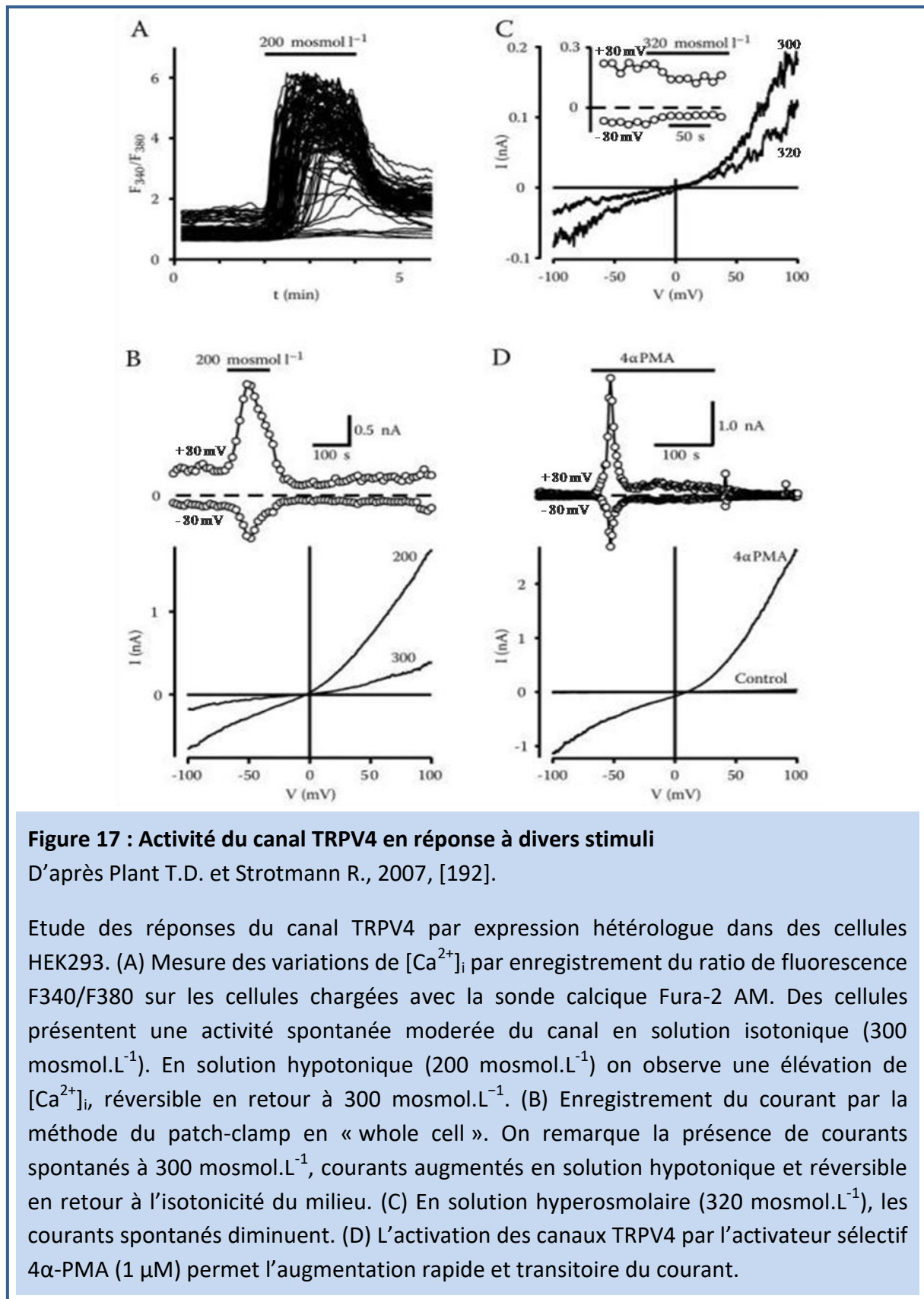
Les canaux TRPV4 sont décrits comme mécanosensibles. Ils peuvent être activés par les variations de flux sanguin au niveau des CE et plus précisément par les contraintes de cisaillement [179], [199], [200]. En effet, des études ont montré que la vasodilatation induite en réponse à la présence de contraintes de cisaillement est dépendante de l'expression de TRPV4 dans les CE des artères de souris [201].

La mécanosensibilité de TRPV4 passe aussi par sa liaison au cytosquelette qui permet entre autres la transmission du message mécanique. L'activité de TRPV4, mesurée par les influx de calcium dans la cellule, est nettement diminuée en présence d'agents stabilisateurs des microtubules (comme le taxol). Et l'activation de TRPV4 par son activateur sélectif le 4 α -PDD (4 α -phorbol 12,13-didécanoate) entraîne le désassemblage des microtubules [202]. L'activité de TRPV4 peut également dépendre de leur présence au sein de microdomaines membranaires comme les cavéoles. Les cavéoles sont de petites invaginations de la membrane plasmique maintenues par la présence de protéines appelées cavéolines (Cav), comprenant trois isoformes (Cav-1, Cav-2, Cav-3). Le canal TRPV4 colocalise avec la cav-1 dans les CE et les CMLAP [203], [204]. Ces cavéoles sont aussi, d'après de nombreuses études, impliquées dans la sensibilité des cellules aux phénomènes mécaniques comme les réponses aux contraintes de cisaillement et aux déformations membranaires [205]–[210].

Ce canal est aussi décrit comme un canal thermosensible. Il est activé pour des températures autour de 27 °C, température non nocive suggérant un rôle de TRPV4 dans la thermorégulation normale du corps humain [172], [211], [212].

Des expériences d'expression hétérologue du gène *trpv4* ont montré que ce canal possède une activité constitutive [193] (**Figure 17**). Son activité peut être aussi déclenchée par des composés endogènes comme des dérivés de l'acide arachidonique, plus particulièrement

l'acide 5,6-EpoxyEicosaTrienoïque (5,6-EET). Ces métabolites peuvent provenir entre autres de l'activation de la phospholipase A2 par la sérotonine (5-HT) [69], [71].



Des molécules chimiques synthétiques peuvent aussi déclencher l'ouverture du canal facilitant ainsi l'étude de cette protéine. Parmi ces molécules on retrouve le 4 α -PDD, le 4 α -PMA (4- α -Phorbol-12-myristate-13-acetate) et le GSK1016790A. Le GSK1016790A à l'avantage d'être plus puissant et sélectif que les 4 α -PDD et 4 α -PMA [213]. Il existe aussi des bloqueurs synthétiques du canal dont le plus connu est le HC067047. Actuellement, une étude clinique de phase 2 est en cours pour un nouvel inhibiteur synthétisé par le laboratoire GlaxoSmithKline le GSK2193874, pour l'amélioration de la fonction respiratoire chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque congestive.

Le canal TRPV4 est sujet à une régulation par le calcium : le calcium est impliqué dans l'ouverture, la potentialisation de l'activité et la fermeture du canal. Ces mécanismes ne sont pas clairement définis. L'absence de calcium extracellulaire abolit les réponses spontanées du canal et les réponses au 4 α -PDD sont d'amplitudes plus faibles. La décroissance du courant s'effectue aussi plus lentement [188], [193]. La stimulation répétée du canal montre une diminution des réponses au cours du temps, voire une inhibition [188], [193]. Watanabe et al. ont observé une réduction de l'amplitude du courant à mesure que la $[Ca^{2+}]_i$ augmentait [214].

c. L'implication de TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire

i. Etat de l'art

Parmi la famille des TRPV, le canal TRPV4 est l'isoforme dont l'ARNm est le plus exprimé dans l'artère intrapulmonaire [215]. D'un point de vue cellulaire, il a été montré comme présent dans l'endothélium et le muscle lisse vasculaire [215], [216]. Cependant sa présence au niveau de l'adventice et plus précisément au sein des Fibroblastes Adventitiels des artères intraPulmonaires (FAP) n'a pas encore été démontrée.

Dans la pathologie de l'HTP, la plupart des études se sont intéressées au rôle de TRPV4 dans les CMLAP. Elles ont d'ailleurs démontré l'importance de ce canal dans l'HTP développée chez les rats hypoxiques chroniques de par sa surexpression et la potentialisation de son activité dans les CMLAP de ces animaux [150], [217].

L'étude de TRPV4 au sein du laboratoire a révélé que sa stimulation provoquait la migration des CMLAP de rats en conditions normoxiques et que cet effet est amplifié en conditions hypoxiques [218], [219]. L'étude de Yang et de ses collègues, de 2012, a aussi montré les effets bénéfiques de l'absence du gène *trpv4* chez les souris placées en conditions hypoxiques chroniques : le remodelage de la paroi artérielle pulmonaire est atténué comparé aux animaux contrôles, les pressions artérielles pulmonaires moyennes sont moins élevées et l'hypertrophie ventriculaire droite est fortement réduite [217].

D'un point de vue physiologique, il a été prouvé que TRPV4 jouait un rôle important dans la vasoconstriction hypoxique chez la souris. En effet, ce réflexe physiologique de contraction du muscle lisse vasculaire pulmonaire en réponse à une baisse locale de la pression partielle en oxygène est diminué chez les souris KO pour ce gène [203]. *In vitro*, l'inhibition du canal sur les CMLAP humaines soumises à des conditions hypoxiques réduit l'influx de calcium dans les cellules [203].

Aussi, des études, menées entre autres au laboratoire, ont également montré que l'hyperréactivité des artères à la sérotonine présente dans la pathologie de l'HTP, passe en partie par l'activation des canaux TRPV4 des CMLAP et ce, via les dérivés de l'acide arachidonique provenant de l'activation de la phospholipase A2. [69], [71], [220].

Le canal TRPV4 est donc fortement impliqué dans le remodelage de la *media* au cours de l'HTP.

Au sein de l'intima, le canal TRPV4 est peu étudié. Dans la circulation systémique, il a été montré que le canal jouait un rôle dans la vasodilatation dépendante de l'endothélium de par leur couplage avec des canaux potassiques qui via des jonctions GAP, hyperpolarisent les CML [221]–[223]. Dans la circulation pulmonaire, la vasodilatation serait due à la production de NO stimulée par le calcium entré par TRPV4 [224].

Au vu des rôles connus du canal TRPV4 dans les tissus vasculaires, il est pertinent de chercher si le canal TRPV4 est impliqué dans le remodelage de l'adventice.

ii. TRPV4, fibroblaste et HTP ?

Jusqu'à présent, le canal TRPV4 n'a pas été décrit dans les FAP. Chez l'Homme, il a été décrit comme exprimé dans les fibroblastes cardiaques [225], pulmonaires (non artériels) [226], [227] et de la peau [228] et comme impliqué dans des pathologies touchant ces différents tissus.

En effet, le rôle de TRPV4 dans les fibroblastes a clairement été mis en évidence dans de nombreuses fibroses [229] où se présentent des phénomènes analogues à ceux observés dans l'HTP : la prolifération, la différenciation des fibroblastes, ainsi que la surproduction de MEC. Ainsi, dans les fibroses pulmonaire et cardiaque [225], [228], [230]–[232], il est montré que la différenciation des fibroblastes induite par TGF β ou par l'augmentation de la rigidité de la MEC, passe par l'activation du canal TRPV4. Le canal est aussi impliqué dans la modification de la composition de la MEC : la présence du canal est nécessaire à la surproduction de collagène et de fibronectine (constituants majeurs de la MEC participant à sa rigidité). Dans le modèle animal de la fibrose pulmonaire induite par l'injection de bléomycine, la fibrose est nettement réduite chez la souris KO pour le gène *trpv4* [232].

Des investigations sur le rôle de TRPV4 dans la sclérodémie ont été réalisées. La sclérodémie est une maladie caractérisée avant tout par le durcissement de la peau et liée à

une accumulation du collagène et à un épaissement de la MEC provoquant une atteinte des vaisseaux de petit calibre qui deviennent fibreux au niveau de leur paroi. Ces investigations ont, elles aussi, démontré la nécessité du canal dans la différenciation des fibroblastes dermaux induite par TGF β ou par l'augmentation de la rigidité de la MEC chez la souris comme chez l'Homme. Le canal TRPV4 est aussi impliqué dans la surexpression de collagène par ces fibroblastes [228].

Une autre pathologie caractérisée par un fort remodelage impliquant les fibroblastes pulmonaires démontre l'importance du canal TRPV4. Il s'agit du remodelage des voies aériennes dans l'asthme. En effet, l'activité de TRPV4 est augmentée dans les fibroblastes issus de poumons de patients asthmatiques [227]. L'ouverture du canal serait responsable de la surproduction de fibronectine et de la différenciation des fibroblastes. Dans le modèle animal d'asthme allergique induit par *Dermatophagoides-farinae*, le remodelage est aussi fortement atténué chez les souris KO pour ce gène [227].

Dans l'HTP, une étude récente, menée par Glenn Marsboom, rapporte un lien entre la formation des cavéoles et la prolifération des FAP [233]. La mutation de la cav-1, retrouvée dans certaines HTAP, affecte la formation des cavéoles dans les fibroblastes. *In vitro*, les fibroblastes possédant cette mutation prolifèrent davantage que les fibroblastes contrôles. La production de collagène est aussi nettement augmentée chez ce mutant. Une colocalisation de TRPV4 et de cav-1 a été montrée dans plusieurs études, dont une menée au laboratoire en 2016 [203], [234]. Les effets de cav-1 présentés dans l'étude de Marsboom pourraient être liés à l'activité du canal TRPV4 qui ne serait plus confiné dans les cavéoles dans le cadre de la pathologie.

Une étude menée par Chen en 2014 présente un lien important entre les FAP et la sérotonine durant l'HTP. La sérotonine module les activités fibrotiques des FAP, elle favorise leur prolifération, leur migration et leur différenciation, ainsi que la surproduction d'éléments de la MEC (le collagène 1a et la fibronectine). Le canal TRPV4 pourrait être en partie responsable de ces effets. TRPV4 pourrait être activé par des dérivés de l'acide arachidonique provenant de l'activation de la phospholipase A2 par la sérotonine [66].

Au vu des nombreuses implications du canal TRPV4 dans des pathologies ayant des analogies avec l'HTP et des pistes existantes quant à l'implication de TRPV4 dans la

dysfonction des FAP au cours de l'HTP, TRPV4 paraît être une cible privilégiée dans l'étude du remodelage adventitial des artères intrapulmonaires au cours de l'HTP.

OBJECTIFS

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie vasculaire pulmonaire d'évolution chronique, caractérisée par une élévation progressive de la pression artérielle pulmonaire moyenne aboutissant à une défaillance cardiaque droite et au décès du patient. Un des aspects de la pathologie est le remodelage vasculaire présent au niveau des trois tuniques qui forment l'artère intra pulmonaire.

Cette thèse a pour objectif d'étudier le lien entre le canal TRPV4 et l'HTP à travers son rôle dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires et plus généralement dans le remodelage de cette tunique. Jusqu'à présent l'activité de ce canal dans la pathologie a été seulement décrit dans l'*intima* et la *media*.

Ce travail s'articule autour de deux axes : l'un tissulaire et l'autre cellulaire. Ainsi, dans une première partie, nous nous sommes intéressés au lien entre l'expression du canal TRPV4 au niveau tissulaire et le remodelage adventiciel présent dans l'HTP. Pour ce faire nous avons utilisé deux modèles animaux d'HTP, le modèle « monocrotaline » mimant une HTP de groupe 1 et le modèle « hypoxie chronique » mimant une HTP de groupe 3. Et grâce à une collaboration avec le Pr Philippe Gailly de l'Université Catholique de Louvain (Bruxelles, Belgique), nous avons aussi pu travailler sur une souche de souris knock-out pour le gène *trpv4*. Dans la seconde partie, nous avons souhaité décrire le rôle du canal TRPV4 dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires. Plus précisément, nous avons recensé les implications du canal dans les mécanismes cellulaires des fibroblastes, mécanismes mis en place par la pathologie : leur prolifération, leur migration et leur invasion, ainsi que leur production de matrice extracellulaire.

Ce travail fait actuellement l'objet d'un premier article qui sera très prochainement soumis au journal Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology avec pour titre :

« TRPV4 channel mediates pulmonary artery adventitial fibroblast activation and excessive adventitial remodeling in pulmonary hypertension ».

MATERIEL ET METHODES

I. Animaux

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

1. Rats

Les rats utilisés sont de souche Wistar. Ils sont issus de l'élevage de la société Janvier et de la reproduction réalisée dans notre animalerie. Pour cette étude, nous utilisons des rats d'un poids compris entre 200 et 350 grammes et âgés de 8 à 13 semaines maximum. En effet, il s'agit des conditions optimales déterminées pour l'obtention des Fibroblastes Adventitiels d'artères intrapulmonaires (FAP).

2. Souris « sauvages » et mutées pour le gène codant pour le canal TRPV4

Les souris utilisées pour cette étude sont de fond génétique C57BL/6.

a. Souris « sauvages »

Les souris « sauvages » utilisées comme contrôles proviennent de chez Janvier ou sont issues de la reproduction réalisée dans l'animalerie. Pour cette étude, nous utilisons des souris d'un poids situé entre 20 et 30 grammes et âgées de 8 à 13 semaines maximum.

b. Souris « knock-out » pour le gène *trpv4*

Les souris « knock-out » pour le gène *trpv4* proviennent du laboratoire du Professeur Philippe Gailly de l'Université Catholique de Louvain en Belgique, qui nous en a fait le don.

La génération de la mutation a été initialement produite par Wolfgang Liedtke et ses collègues (Rockefeller University) et a fait l'objet d'une publication dans le journal PNAS [180]. Chez la souris, le gène codant pour *trpv4* est situé sur le chromosome 5. Il est constitué de 15 exons. La génération de l'allèle mutant a été réalisée en ciblant l'exon 12 du gène codant pour le domaine du pore et les domaines transmembranaires 5 et 6. La disruption de l'exon a été faite par l'insertion d'une cassette néomycine par recombinaison homologue.

Afin d'obtenir la lignée stable de souris mutées knock-out pour le gène *trpv4* (*trpv4*^{-/-}), des croisements entre souris hétérozygotes pour la mutation *trpv4* (*trpv4*^{+/-}) puis des croisements successifs à partir de ces souris nouvellement obtenues ont été réalisés. Les croisements entre souris *trpv4*^{-/-} assurent la stabilité de la mutation pour la lignée.

La présence de l'allèle muté chez la souris est détectée par PCR au moment du sevrage des souriceaux. Un petit morceau de l'extrémité de la queue des animaux est prélevé et utilisé pour le génotypage. L'ADN génomique total est extrait avec le kit commercial REDEExtract-N-Amp™ (XNAT-1KT,SIGMA). Les régions d'ADN génomique d'intérêt sont amplifiées par PCR à l'aide de deux couples d'amorces : l'un ciblant l'allèle sauvage du gène codant pour *trpv4* (exon 4), l'autre ciblant l'allèle mutée (en ciblant la cassette néomycine insérée dans l'exon 4). Pour ce faire, 5 µL d'ADN génomique sont mélangés à 10 µL d'une solution « mix PCR », fournit dans le kit, qui contient la polymérase, des dNTP, des oligos dT et les deux couples d'amorces, éléments indispensables à la formation des amplicons.

L'amplification se fait par l'utilisation d'un thermocycleur de type Uno II, Biometra : l'ADN subit une dénaturation à 95°C pendant 5 min et 30 s, puis se succèdent 32 cycles d'hybridation des amorces (60°C pendant 30 s) et d'élongation (72°C pendant 11 min). La réaction se stoppe à 4°C et les amplicons sont détectés sous une lampe U.V, avec du SYBR green (un agent intercalant de l'ADN double brin non spécifique), après migration sur gel d'agarose 1 %. Un amplicon de 750 paires de bases correspond à l'allèle sauvage, et un amplicon à 500 paires de bases correspond à l'allèle muté.

3. Modèles animaux d'hypertension pulmonaire

L'âge des animaux étant important dans le développement de la pathologie, ces modèles seront réalisés sur des groupes d'animaux d'âges et de poids similaires.

a. Le modèle animal d'hypertension pulmonaire de groupe 1 induit par la monocrotaline

Ce modèle d'hypertension pulmonaire est induit par l'injection de MonoCroTaline (MCT), un alcaloïde pyrrolizinidique toxique, en Intra-Péritonéale (IP) chez l'animal. Le protocole d'injection est différent selon le rongeur utilisé.

i. Modèle d'hypertension pulmonaire de groupe 1 chez le rat

Chez les rats, le protocole nécessite une injection IP unique de MCT à 60 mg/kg de masse corporelle. La quantité nécessaire de MCT pour une injection de 100 µL est diluée en proportion égale dans du HCl 1 M et du NaOH 1 M et le pH de la solution est ajusté à 7. La MCT, par l'effet toxique de son métabolite sur l'endothélium (cf. page 32), provoque des lésions sur celui-ci qui aboutissent en quatre semaines au développement d'une HTP.

ii. Modèle d'hypertension pulmonaire de groupe 1 chez la souris

Chez la souris, le protocole nécessite une augmentation du nombre d'injections pour obtenir des effets similaires à ceux observés dans les modèles de rats. Ceci peut s'expliquer par le fait que la MCT est peu ou pas métabolisée par son organisme (cf. page 32). Ainsi, pour développer la pathologie, les souris reçoivent une injection IP hebdomadaire de MCT à la dose de 600 mg/kg sur une durée de neuf semaines [116].

Comme précédemment, la quantité nécessaire de MCT est diluée en proportion égale dans du HCl 1 M et du NaOH 1 M et le pH de la solution ajusté à 7.

b. Le modèle animal d'hypertension pulmonaire de groupe 3 induit par une exposition hypoxique chronique

Le modèle d'HyperTension Pulmonaire (HTP) induit par une exposition à un environnement hypoxique chronique est le même chez la souris ou le rat. Comme décrit (cf. page 33) et selon le protocole mis en place au laboratoire [65], les rongeurs sont placés 3 semaines dans un caisson hypobare où les animaux sont soumis à une pression de 380 mmHg (la pression normale étant de 760 mmHg) équivalente à un séjour à 5500 m d'altitude. La diminution de la pression barométrique permet la réduction dans le caisson de la Pression partielle en diOxygène (PO_2) de moitié, la passant ainsi de 160 mmHg à 80 mmHg. La PO_2 alvéolaire des rongeurs et, par ce fait, la PO_2 des capillaires sont alors diminuées engendrant une situation d'hypoxémie. L'exposition prolongée à ces conditions conduit au développement d'une HTP pour ces animaux.

4. Euthanasie des animaux

L'euthanasie est réalisée par injection IP d'une dose létale (12 mg/100 g) de pentobarbital sodique à 400 mg/mL (Exagon®, Axience). Le bloc cœur/poumon est ensuite récupéré pour la réalisation des différentes expériences.

II. Remodelage cardiaque et vasculaire

1. Etude du remodelage cardiaque : le rapport de Fulton

Le rapport de Fulton (RF) correspond à la masse du Ventricule Droit (VD) rapportée à la masse du Ventricule Gauche et du Septum ($RF = \frac{VD}{VG + S}$). Il permet d'estimer l'hypertrophie ventriculaire droite et ainsi d'attester de l'état hypertendu des animaux dans les différents modèles utilisés.

Les rats contrôles ont un rapport de Fulton proche de 0,2. Chez les rats ayant développé la pathologie, l'indice se situe au delà de 0,3.

2. Mesure de la pression ventriculaire droite systolique par cathétérisme invasif

La Pression Ventriculaire Droite Systolique (PVDs) est mesurée en tant qu'indice de la pression artérielle pulmonaire. Les souris sont anesthésiées avec de la kétamine (100 mg/kg de masse corporelle) et de la xylazine (10 mg/kg de masse corporelle). A partir du diaphragme, la cage thoracique est délicatement ouverte à travers le sternum pour exposer le cœur. Une aiguille de 25 G, dont la pointe est héparinée, reliée à un capteur de pression (Baxter Uniflow) est insérée dans le ventricule droit. La PVDs est mesurée grâce au logiciel LabChart, en faisant la moyenne des PVDs des 15 premières secondes de l'enregistrement.

Les souris sont ensuite euthanasiées puis le bloc cœur/poumons est prélevé afin de réaliser les études de remodelage cardiaque et vasculaire.

3. Mesure du remodelage artériel pulmonaire par morphométrie

a. Réalisation des coupes histologiques des poumons de souris

i. Déshydratation des tissus et inclusion en paraffine

Les poumons sont immergés pour fixation dans du PFA (ParaFormaldéhyde) 4 % pendant 2 h. Après 3 rinçages au PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X, les poumons sont déshydratés dans une série de bain d'éthanol de concentrations croissantes (50 à 100 %). Ils sont ensuite plongés 30 min dans du toluène, puis mis en cassette et inclus dans de la paraffine coulée à 60 °C. Le temps d'inclusion est de 90 min. Les "blocs de paraffine" ainsi formés sont stockés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

ii. Réalisation des coupes de poumon

Les "blocs de paraffine", sortis extemporanément de 4 °C, sont coupés au microtome (RM2245, Leica) afin d'obtenir des coupes longitudinales de poumon (épaisseur 4 µm). Ces coupes sont déposées à l'aide d'une goutte d'eau sur des lames en verre puis séchées sur une plaque chauffante à 40 °C. Les lames sont stockées à température ambiante.

iii. Déparaffinage et la coloration "Elastica van Gieson"

Le déparaffinage s'effectue en réalisant les étapes inverses à l'inclusion. Les coupes sont d'abord incubées 10 min dans du toluène, puis immergées dans différents bains d'éthanol de concentrations décroissantes (100 à 50 %) afin de réhydrater les coupes et permettre aux « colorants » de marquer correctement les tissus.

Les coupes sont marquées par « Elastica van Gieson » grâce au kit Elastic Stain® (#HT25A, SIGMA) qui permet une meilleure visualisation de la *media* en colorant les limitantes élastiques externes et internes en noir. L'adventice est colorée en rose (dû à la présence importante de collagène).

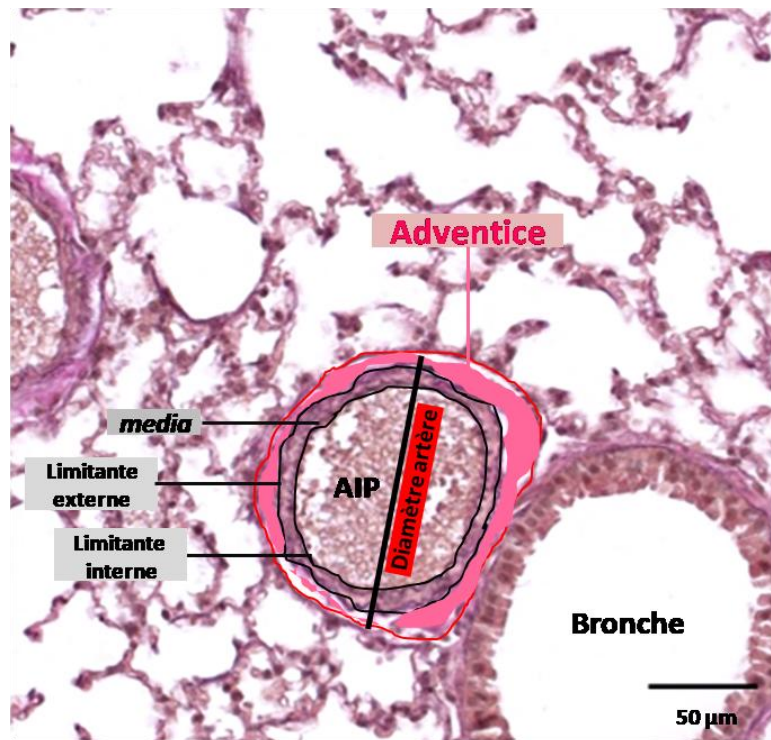
Le protocole de coloration « Elastica van Gieson » correspond à celui fourni avec le kit et s'effectue à température ambiante. Le montage est réalisé grâce à la colle Eukitt® (O. Kindler & ORSAtec) après une nouvelle déshydratation des coupes dans les différents bains d'éthanol et un bref passage des lames dans du toluène ou du xylène.

iv. Quantification du remodelage adventiciel

Les coupes ont été observées au BIC (Bordeaux Imaging Center) à l'aide du microscope Hamamatsu NANOZOOMER 2.0HT. Les images sont prises à l'aide du logiciel NDP.2, avec un zoom 20 X et l'épaisseur de l'adventice est quantifiée avec le logiciel ImageJ.

Le remodelage adventiciel est quantifié par estimation de la surface de l'adventice, par application d'un seuillage, rapporté au diamètre externe du vaisseau (**Figure 18**). Les résultats sont ensuite normalisés par rapport à l'épaisseur de l'adventice des souris contrôles.

Seules les artères dont la section est ronde ($30 < \varnothing < 150 \mu\text{m}$, diamètre sans l'adventice) sont utilisées pour l'étude afin d'éviter les biais de coupe.



$$\text{Quantification adventice} = \frac{\text{Surface de l'adventice}}{\text{Diamètre}}$$

Figure 18 : Méthodologie de la quantification de la surface de l'adventice

L'image est issue de la coupe histologique de poumon de souris WT (Wild Type) placée en caisson hypobare (modèle hypoxie chronique) et est marquée par la coloration « Elastica Van gieson ». L'acquisition de l'image est réalisée à l'aide du microscope Hamamatsu NANOZOOMER 2.0HT au zoom 20X et du logiciel NDP.2. L'échelle correspond à une mesure de 50 μm.

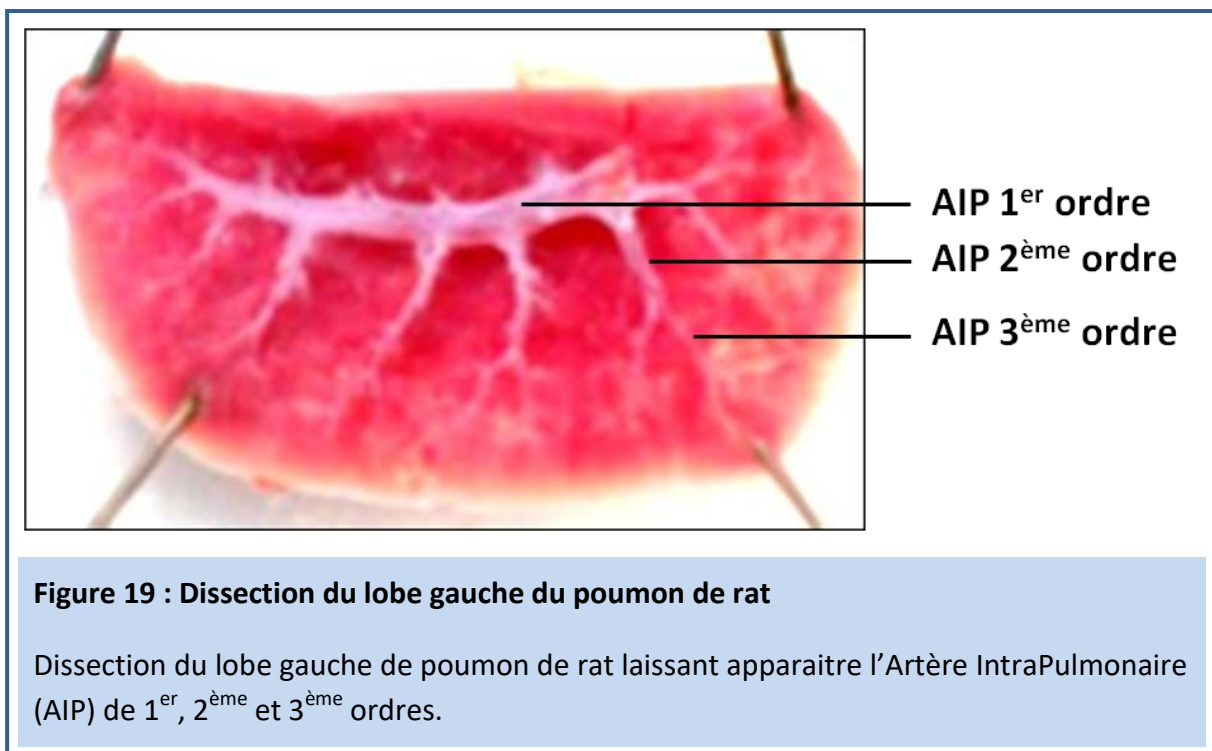
v. Quantification du remodelage de la *media*

La quantification du remodelage de la *media* est mesurée à partir des mêmes artères sélectionnées pour l'étude du remodelage adventiciel. Cette mesure est réalisée par soustraction de l'aire sous la lame élastique interne (correspondant à la lumière du vaisseau) à l'aire sous la lame élastique externe rapportée au diamètre du vaisseau sans l'adventice (*media-media*). Les résultats sont ensuite normalisés par rapport à l'épaisseur de la *media* des souris contrôles.

III. Culture des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

1. Microdissection des poumons de rats

Après euthanasie des animaux (cf. page 74), le bloc cœur/poumons est récupéré et placé dans du milieu DMEM (« Dulbecco's modified Eagle's medium ») (D0822, SIGMA) complémenté d'AnTiBiotiques à 1 % (ATB : pénicilline et streptomycine, (P4333, SIGMA)) et d'Acides Aminés Non Essentiels à 1 % (AANE (M7145, SIGMA)). Les AIP sont isolées par microdissection des poumons de rats (**Figure 19**) sous loupe binoculaire dans ce même milieu. L'adventice est ensuite délicatement retirée à l'aide de micro-pinces par léger « tiraillement » de la partie « fibreuse » de l'artère.



2. Caractérisation du tissu adventiciel

Afin de s'assurer de la nature des explants ainsi récupérés, un marquage d'une artère « entière », de l'adventice seule et des artères après extraction de l'adventice est réalisé.

Après isolement, les AIP et l'adventice sont immédiatement fixées au Formalin 10 % (HT501128, SIGMA) pendant 15 min, sous agitation rotative. Après 2 rinçages au PBS 1X, les échantillons sont inclus dans de l'OCT (« Optimal Cutting Temperature », (OCT mounting medium Q Path®, VWR)) puis placés à -20°C pour que l'OCT congèle. L'utilisation de l'OCT permet de s'abroger des étapes de déshydratation et de réhydratation nécessaires au paraffinage et déparaffinage des échantillons. Des coupes de 8 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées au cryostat (CM1950, Leica) et déposées par nombre de trois sur des lames SuperFrost Ultra Plus™ (Thermo Scientific™). Après élimination de l'OCT par séchage à 40 °C pendant 2 h, les échantillons sont prêts à être colorés. Ils sont conservés à -20 °C.

Les coupes d'adventice et d'AIP (avec et sans adventice) ont été marquées par une coloration « Elastica van Gieson » (cf. page 76). Cette coloration permet de distinguer au mieux la *media* en colorant les limitantes élastiques externes et internes en noir. Ainsi nous pouvons vérifier qu'après extraction de l'adventice, la *media* conserve son intégrité. L'adventice, quant à elle, est colorée en rose.

3. Obtention des fibroblastes adventiciels d'artères intrapulmonaires

L'adventice est récupérée de la façon décrite précédemment à partir des AIP de premier ordre issues des deux plus gros lobes (un droit et un gauche) de poumons du rat. L'adventice est ensuite découpée en petits explants d'environ 2 mm². Ces explants sont déposés en nombre de trois par puits de plaque 6 puits (9,6 cm²). Ils sont ensuite délicatement recouverts de 2 mL de DMEM complété d'1 % d'ATB et AANE ainsi que de 20 % de SVF (Sérum de Veau Fœtal, 10270-106, lot : 42Q2055K, Gibco). Les FAP commencent à sortir des explants après 2-3 jours. Après 5 à 7 jours de culture, le milieu est

changé tous les deux jours jusqu'à obtenir 90 % de confluence cellulaire (2 semaines environ).

4. Culture des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

Les passages sont réalisés lorsque les cellules atteignent une confluence supérieure à 90 %. Pour chaque passage les cellules sont tout d'abord rincées deux fois avec une solution HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) (55021C, SIGMA) afin d'éliminer le SVF contenu dans le milieu. En effet, le SVF a un effet inhibiteur sur la trypsine, peptidase qui clive les protéines membranaires d'adhésion. La trypsine (T3924, SIGMA) ne doit pas être mise au contact des cellules plus de 2 min. La trypsine contenant les cellules en suspension est reprise dans du milieu de culture (DMEM complétement d'1 % d'ATB et AANE et de 10 ou 15 % de SVF*), telle que la trypsine soit diluée au 10^{ème}. Les cellules sont ensuite culotées par centrifugation (5 min à 300 G) puis reprises dans le milieu de culture afin d'être réparties et/ou amplifiées**.

Le phénotypage des cellules a été réalisé par immunofluorescence (cf. page 88).

En raison de la différenciation des FAP au cours des passages, les cellules ne sont utilisées que jusqu'au 3^{ème} passage (cf. page 81).

** : Lors du premier passage, le milieu de culture utilisé contient 15 % de SVF. Pour les passages suivants, le milieu contient 10 % de SVF.*

*** : pour une bonne amplification, il est nécessaire d'ensemencer environ 150 000 cellules dans une flasque T75.*

5. Temps de dédoublement des cellules

Dans des puits de plaques 24 puits, 20 000 cellules par puits sontensemencées. Les cellules sont synchronisées par l'utilisation d'un milieu dénutri, c'est-à-dire ne contenant pas de SVF, pendant 24 h. Le lendemain matin, les cellules des 2 premiers puits (expérience réalisée en duplicat) sont récupérées et comptées grâce au compteur de cellule Luna™ Automated Cell Counting (Logos biosystems). Le nombre de cellules obtenues correspond au nombre de cellules à $t = 0$. Les cellules restantes sont placées dans le milieu de culture (contenant 10 % de SVF). A 6, 8, 10, 12 et 24 h, les cellules des puits restants sont récupérées par trypsination et comptées afin de déterminer le temps nécessaire au dédoublement de la population.

IV. Etude du canal TRPV4

1. Mise au point des siRNA

a. Principe et produits utilisés

Les siRNA (« short interfering RNA ») sont des agents qui ciblent une séquence correspondante de l'ARNm d'intérêt et empêchent sa traduction en protéine. Ainsi leur utilisation pour but d'éteindre l'expression de la protéine et ainsi sa fonction biologique. La transfection de siRNA ciblant *trpv4* permettra donc d'évaluer l'implication de ce canal dans les différentes fonctions physiologiques étudiées et de valider la sélectivité de l'action des agents pharmacologiques utilisés.

Les produits sont stockés à 20 µM dans de l'eau RNase-free à -20 °C.

b. Protocole

La transfection de siRNA a été mis au point à l'aide du protocole proposé par la société QIAGEN. La concentration choisie pour les solutions de transfection est de 25 nM de siRNA avec pour quantité de transfectant 1,5 µL pour 100 µL. La solution de *trpv4-siRNA* correspond à un mélange un pour un de deux siRNA ciblant deux séquences différentes de l'ARNm de TRPV4. La transfection se réalise sur un tapis cellulaire d'environ 80 % de confluence.

Chaque siRNA (**Tableau 2**) (stocké à 20 µM) est préalablement dilué au 1 µM dans de l'eau « RNase-free » puis à 125 nM dans le DMEM complétementé d'1% ATB et d'AANE. Le transfectant est ajouté extemporanément à raison de 1,5 µL pour 100 µL. Les solutions de transfection sont vortexées modérément 10 s puis incubées 10 min à température ambiante. Elles sont ensuite diluées au cinquième dans les puits contenant les cellules et du DMEM complétementé de 1 % ATB et AANE et 10% de SVF.

Après 8 h, le milieu de culture est changé (après rincage au HBSS) pour un milieu de culture

dénutri. Le lendemain matin, le milieu est à nouveau changé afin de réaliser l'expérience souhaitée.

L'efficacité du siRNA a été vérifiée par qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) et Western Blot (WB) et est présentée page 140.

Produits	Noms	Références - fournisseurs
<i>CTL-siRNA</i>	AllStars Neg. Control siRNA I	1027281 – QIAGEN
<i>Trpv4-siRNA</i>	Rn_Trpv4_2 FlexiTube siRNA SI00267743 Rn_Trpv4_3 FlexiTube siRNA SI00267750	1027418 - QIAGEN
Transfectant	HiPerFect Transfection Reagent	301704 - QIAGEN

Tableau 2 : Liste des produits utilisés pour la transfection

2. Caractérisation de la présence de l'ARNm de *trpv4* par retrotranscriptase et PCR quantitative

a. Obtention des ADN complémentaires

L'extraction des ARNm à partir des cellules FAP est réalisée avec le Kit RNeasy plus Micro Kit (74034, Qiagen) selon les indications du fournisseur après 2 lavages au PBS 1X. La densité optique des échantillons est lue par spectrophotométrie grâce au lecteur SPECTROstarnano (BMG LABTECH) à 260 nm et à 280 nm afin de s'assurer de la pureté des échantillons. Après extraction des ARN totaux, une synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à l'aide du kit qscript cDNA supermix (95048, Quantabio) avec le protocole suivant : 5 min à 25°C pour l'activation de l'enzyme transcriptase inverse, 30 min à 42°C pour la retrotranscription de l'ARN et 5 min à 85°C pour l'inactivation de l'enzyme.

b. PCR quantitative

La qPCR permet de mesurer en temps réel le niveau d'expression des transcrits amplifiés. Pour chaque PCR, le milieu réactionnel contient 2,5 µL d'ADNc à 2 ng/µL, 2,5 µL du mélange de primers (SIGMA) (**Tableau 3**) à 20 µM (brins sens et antisens) correspondant au gène cible et 5 µL de perfect SYBR Green Supermix (95053 Quantabio). Les primers ont été désignés à l'aide du programme NCBI Primer-BLAST. L'amplification est réalisée grâce à l'appareil CFX96 (Bio-Rad) selon le protocole présenté **Figure 20**. Les gènes domestiques choisis pour les expériences sont HPRT1 (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase) et YWHAZ (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta) (**Tableau 3**).

Nom	N° d'accession	Séquence primers (S : Sens, AS : AntiSens)	Taille amplicon
TRPV4	NM_023970.1	S : GCCATCGCTGACAACACCCGAGA	208
		AS : TGTCCTCATCTGTCACCTCCGTC	
HPRT1	NM_012583.2	S : TGTTGGATATGCCCTTGA	178
		AS : AGATGGCCACAGGACTAGAAC	
YWHAZ	NM_011740.3	S : CACAGCGGTAAACAAAATCCCAT	173
		AS : ACATTAACAAAGCTAGCCGTC	

Tableau 3 : Liste des paires d'amorces utilisées pour la qPCR

La quantification des ADNc par qPCR est réalisée grâce au SYBR Green, un agent intercalant de l'ADN double brin non spécifique émettant une fluorescence à 585 nm. En exprimant la variation de la fluorescence en fonction du temps, on détermine le Cq (cycle quantification) qui se définit comme étant le cycle d'amplification pour lequel la fluorescence atteint une valeur significativement différente de la fluorescence de base. Cette valeur est déterminée à un moment où l'amplification est dans une phase linéaire avec une efficacité maximale. Cette efficacité a été préalablement vérifiée en déterminant les Cq pour différentes concentrations en ADNc (réalisation d'une gamme). Il est considéré que l'efficacité maximale (E) est de 2 lorsqu'en doublant la concentration en ADNc, le Cq diminue d'un cycle. Pour ces expériences, l'efficacité est considérée comme proche de 100 %.

Les échantillons obtenus ont été déposés une fois sur gel d'agarose 2 % afin de s'assurer de l'amplification du bon amplicon.

L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager, version 3.1.

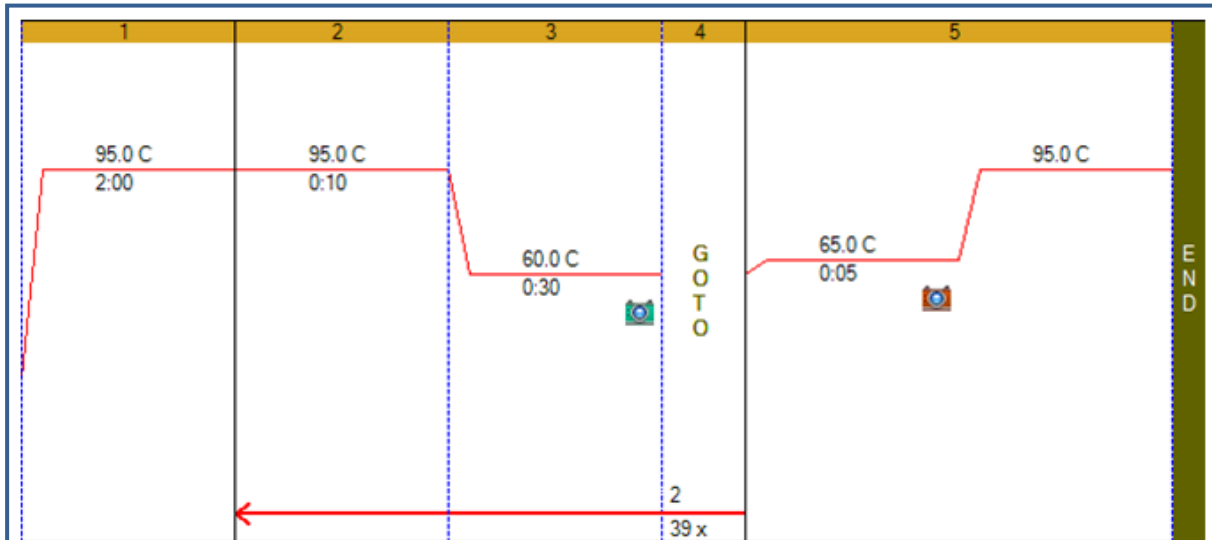


Figure 20 : Protocole de qPCR du gène *trpv4*

Le protocole contient 5 étapes. Le milieu réactionnel est chauffé à 95 °C pendant 2 min afin d'activer l'enzyme polymérase du supermix (1), puis 40 cycles d'amplifications comprenant une étape de dénaturation de 10 min à 95°C (2) suivis d'une étape d'hybridation de 30 min à 60°C (3) sont réalisés. L'acquisition de la fluorescence du SYBR green est effectuée à la fin de chaque cycle (4). Après l'amplification, la température est augmentée de 0,5°C en 0,5°C afin d'obtenir les courbes de fusion (« melt curve ») (5).

3. Immunomarquages

Des techniques d'immunohistochimie et d'immunocytochimie ont été réalisées pour cette étude. Ces techniques permettent de mettre en évidence des antigènes dans un tissu ou dans des cellules, grâce à des anticorps spécifiques et à des marqueurs. Les marqueurs utilisés ici sont des fluorochromes. Ainsi, le marquage des tissus artériels (AIP et adventice) a permis de s'assurer de la présence du canal TRPV4 dans les différentes tuniques de l'artère et le marquage des cellules a rendu possible le phénotypage des cellules et la mise en évidence du canal dans les FAP. Il est aussi utilisé pour la quantification de la dégradation de la gélatine (cf. page 97).

a. Immunomarquage sur tissus : immunohistochimie

Les coupes d'adventice et d'AIP sont obtenues comme décrit précédemment (cf. page 80), après inclusion des différents tissus dans l'OCT. Les coupes d'une même lame sont entourées à l'aide du marqueur Dako Pen (S200230-2, Agilent Dako) qui permet de créer des barrières physiques aux liquides hydrophiles. Toutes les solutions employées doivent être déposées délicatement afin de ne pas décoller les coupes.

Les différentes coupes sont incubées 5 min dans du SDS 1% (DodécylSulfate de Sodium) afin de démasquer les épitopes des protéines d'intérêt. Après 2 rinçages au PBS 1X, elles sont incubées 45 min dans une solution de PBS 1X - 0.05 % de tween contenant 3 % de BSA (« Bovin Serum Albumine ») afin de perméabiliser et saturer les sites aspécifiques. Les lames sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires d'intérêt (**Tableau 4**, page 100) dans une chambre humide pour éviter toute évaporation de la solution d'anticorps. Le lendemain, après 2 rinçages au PBS 1X, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à un fluorophore AlexaFluor 568® (Molecular Probes) (1/200ème) correspondant à l'espèce de l'anticorps primaire utilisé, anti-IgG de lapin ou de souris (**Tableau 5**, page 100), pendant 2 h à température ambiante, puis rincées de nouveau 2 fois avant d'être incubées 5 min avec du DAPI à 5 µg/mL (4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole), une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénines de l'ADN,

permettant ainsi le marquage du noyau. Le montage avec une contre-lamelle s'effectue à l'aide de milieu de montage contenant un agent anti-affadissement (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023, Dako).

A noter que les artères possèdent une autofluorescence verte des lames élastiques qui composent la *media*.

b. Immunomarquage sur cellules : immunocytochimie

i. Phénotypage

Après avoir retiré le milieu et rincé les cellules au PBS 1X, celle-ci sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4 % froid pendant 20 min à température ambiante. Après fixation, elles sont rincées 2 fois au PBS 1X. A cette étape les cellules peuvent être conservées à 4 °C.

Les cellules sont perméabilisées pendant 2 min dans du PBS 1X contenant 0,5 % de triton X-100 (091584D, Dutscher), un détergent de synthèse qui permet la dissolution des lipides de la membrane cellulaire. Les sites non spécifiques sont saturés avec une solution de PBS 1X contenant 5 % de BSA pendant 30 min. Les anticorps primaires (α SMA, calponine, vimentine et facteur de von Willebrand pour le phénotypage, **Tableau 4**, page 100) dilués dans une solution de PBS 1X avec 1 % de BSA sont incubés 1 h à température ambiante. Puis les cellules sont lavées avec du PBS, et l'anticorps secondaire couplé au fluorophore correspondant (**Tableau 5**, page 100) est incubé pendant 1 h dans du PBS 1X - BSA 1 %. Si un marquage par la phalloïdine couplée à la rhodamine B isothiocyanate à 5 μ g/mL (agent permettant un marquage de l'actine-F) est nécessaire, l'incubation se réalise lors de cette étape. Après un nouveau lavage au PBS, puis un passage dans de l'eau distillée (pour éliminer les sels), les lamelles sont montées à l'aide de milieu de montage Fluoroshield™ (T6057, SIGMA), qui contient un agent anti-affadissement et le DAPI qui marque les noyaux.

Le phénotypage des cellules est validé lorsque les cellules présentent une réponse positive au marquage de la vimentine, et n'expriment par le facteur de von Willebrand, la calponine et l' α SMA (cf. page 129).

ii. Expression du canal TRPV4 sur cellules vivantes

10 000 cellules FAP sontensemencées sur des lamelles circulaires de 14 mm de diamètre (O111540, Marienfeld-Superior) placées dans des plaques 12 puits. Après 3 lavages par du PBS 1X froid (4°C), les cellules sont placées 45 min à 4°C dans du PBS 1X 1,5% BSA, appelé « solution de blocage » qui permet de saturer les sites aspécifiques. Les cellules sont ensuite incubées 45 min à 4°C avec l'anticorps primaire reconnaissant le canal TRPV4 (**Tableau 4**, page 100) dilué dans la solution de blocage. Après 3 nouveaux lavages par du PBS 1X froid, les cellules sont incubées 45 min à 4°C avec l'anticorps secondaire couplé au fluorophore AlexaFluor 488® (**Tableau 5**, page 100). Les cellules sont enfin fixées au PAF 4 % pendant 10 min, puis les noyaux sont marqués par du DAPI (5µg/mL, 5 min). Les lamelles sont montées sur lames à l'aide de milieu de montage Dako Fluorescent Mounting Medium.

c. Acquisition des images

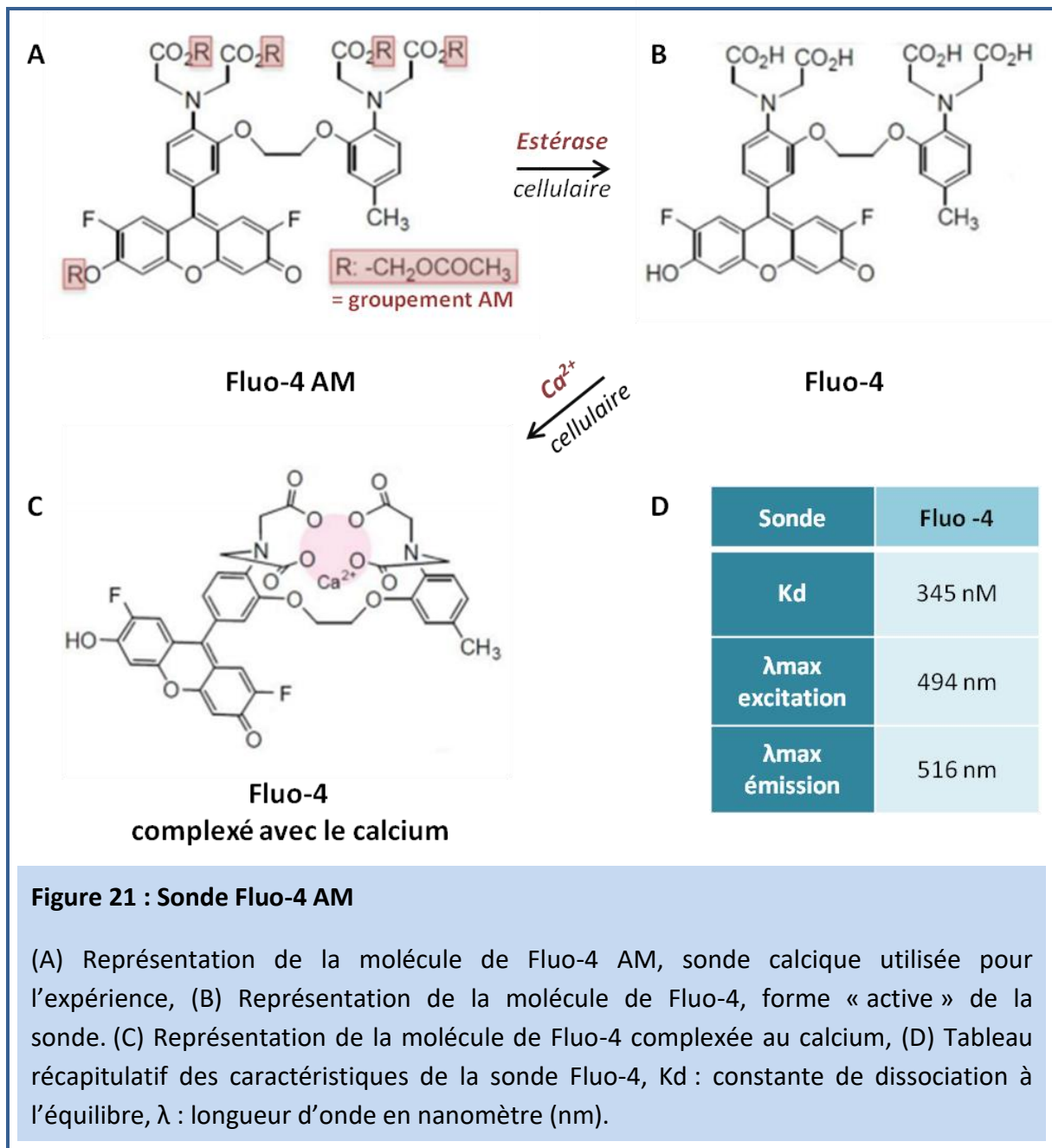
Les expériences d'immunocytochimie et d'immunohistochimie sont ensuite visualisées à l'aide d'un microscope confocal (Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning microscope) muni de deux objectifs, NA 1,40, Apochromat à immersion à huile, X20 et X60. Le fluorophore AlexaFluor 568® est excité à 543 nm à l'aide d'un laser hélium-néon et la fluorescence émise est filtrée à 605 ± 75 nm. Le fluorophore l'AlexaFluor 488® est excitée à 488 nm à l'aide d'un laser argon, et la fluorescence émise est filtrée à 515 ± 30 nm. Les noyaux sont révélés grâce à l'excitation du DAPI à 405 nm à l'aide d'un laser à diode et la fluorescence émise est filtrée à 450 ± 35 nm. Toutes les images ont été obtenues à la résolution de 16 bits à l'aide du logiciel NISElements et ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

Pour chaque expérience d'immunofluorescence, un contrôle négatif est réalisé avec l'anticorps secondaire seul.

4. Etude de la fonctionnalité du canal TRPV4 : mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ par utilisation de la sonde calcique Fluo-4 AM

a. Principe

L'utilisation de sondes calciques permet de réaliser des mesures dynamiques de la concentration en calcium libre intracellulaire. La sonde Fluo-4 est une sonde calcique de synthèse capable de lier le calcium avec un K_d de 345 nM, K_d se situant dans la gamme des niveaux de calcium intracellulaire de la plupart des lignées cellulaires. La sonde complexée avec le calcium est excitée avec une source lumineuse centrée sur son pic d'absorption, autour de 488 nm. L'émission de photon par le fluorophore, mesurée à 515 ± 30 nm, sera alors principalement dépendante de la présence de calcium dans le milieu. Afin de permettre à la sonde de traverser la membrane plasmique des cellules, un groupement acétoxyméthylester (AM) a été ajouté au Fluo-4 pour former le Fluo-4 AM (**Figure 21**). Ce groupement masque les charges négatives et rend la sonde hydrophobe. Ce groupement, qui empêche la chélation de l'ion calcium par le chélateur, est clivé par hydrolyse par les estérases du cytoplasme rendant la sonde Fluo-4 « active » (**Figure 21**). La sonde débarrassée de ces groupements AM est alors piégée dans le cytoplasme cellulaire. L'intensité de fluorescence de la sonde Fluo-4 est proportionnelle à la $[Ca^{2+}]_i$, il est alors possible de suivre des cinétiques rapides de variation de la concentration intracellulaire en calcium en mesurant en temps réel cette intensité de fluorescence.



b. Protocole

Les FAP sont ensemencées à 5000 cellules par puits de plaque 96 puits. Une fois adhérentes, elles sont transfectées avec les siRNA, si nécessaire (cf. page 83). Après starvation des cellules sur la nuit, la sonde Fluo-4 AM diluée à 1 μM dans une solution saline physiologique appelée MAC est distribuée en volume de 50 μL dans les puits. La plaque est alors placée 30 min à l'obscurité pour permettre la « charge » des cellules en sonde. Passé ce délai, les puits sont rincés avec du MAC puis la plaque est placée sur l'objectif X20 du microscope confocal Nikon. Les agents pharmacologiques sont dilués dans la solution MAC. Les FAP sont excitées avec un laser à 488 nm et l'émission est enregistrée à 515 ± 30 nm avec une caméra toutes les 8 s pour obtenir une cinétique des variations de fluorescence reflétant les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'acquisition des images est réalisée avec le logiciel EZ-C1 de Nikon. Les résultats sont exprimés par le rapport F/F_0 , correspondant à la fluorescence au temps t (F) divisée par la fluorescence initiale (F_0). La fluorescence initiale correspond à la moyenne des 3 premières acquisitions. Un rapport de 1 signifie qu'il n'y a pas de variation de fluorescence. Toute augmentation de ce rapport supérieur à 10 % est considérée comme une réponse calcique.

5. Etude de la viabilité cellulaire

a. Principe

La viabilité cellulaire est évaluée avec le test WST-1 (Water Soluble Tétrazolim-1, CELLPRO-RO ROCHE, SIGMA). Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la bioréduction du sel de trétrazolium, le Wst-1(4-(3-(4-Iodophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzènedisulfonate), incolore, en un dérivé formazan soluble et de coloration jaune, quantifiable par spectrophotométrie à 450 nm. Cette bioréduction est majoritairement dépendante de la NAD(P)H (une déshydrogénase de la chaîne respiratoire) des cellules vivantes. La quantité de formazan ainsi formée est alors directement corrélée à l'activité métabolique dans les cellules vivantes.

b. Protocole

8 000 cellules FAP sont ensemencées par puits de plaque 96 puits. Lorsque les cellules ont bien adhéré, elles sont transfectées si nécessaire. Elles sont ensuite placées dans du DMEM 1 % ATB et 1 % AANE sans sérum une nuit afin de les synchroniser et de réaliser le test dans les mêmes conditions que les autres expériences. Le lendemain matin, les cellules sont stimulées par les différents agents pharmacologiques (si besoin) (**Tableau 6**, page 100) dans un nouveau milieu DMEM 1 % ATB et 1 % AANE toujours sans SVF. Après 24 h de stimulation, 10 µL de Wst-1 sont ajoutés et l'absorbance de chaque puits est mesurée 2 h plus tard par un lecteur de microplate réglé sur une longueur d'onde de 450 nm. (SPECTROstar^{Nano}, BMG LABTECH). Trois réplicats pour chaque condition sont réalisés.

6. Quantification de l'expression protéique par la technique du Western Blot

La technique du Western blot (WB) permet d'évaluer de manière quantitative la quantité de protéines exprimées. Après lyse des tissus ou des cellules, les protéines sont séparées par électrophorèse puis détectées après transfert sur une membrane PVDF (« PolyVinylidene DiFluoride ») à l'aide d'anticorps primaires spécifiques et secondaires couplés à un chromophore (**Tableau 4, Tableau 5**, page 100)

L'intensité de marquage rapportée à l'intensité d'une protéine dite « de référence » permet d'évaluer de manière relative par rapport au contrôle la quantité de protéines d'intérêt présente dans l'échantillon donné.

a. Préparation des échantillons

150 000 cellules sontensemencées par puits de plaque 6 puits. Lorsque les cellules sont bien étalées, les cellules sont transfectées avec le siRNA (si nécessaire), puis traitées avec les différents agents pharmacologiques (selon l'expérience). Les agents pharmacologiques utilisés sont le GSK1016790A, un activateur sélectif du canal TRPV4 et le HC067047, un bloqueur sélectif du canal TRPV4. Le contrôle est traité par du DMSO (DiMéthylSulfOxyde), le solvant utilisé pour la solubilité des agents pharmacologiques. En fin d'expérience, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis « grattées » dans un volume suffisant (dépendant de l'expérience) d'une solution de lyse appelée RIPA complet (**Tableau 7**, page 100). Après grattage, la solution de lyse cellulaire est placée sous agitation dans la glace pendant 45 min. Les débris cellulaires sont enlevés par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. Les lysats peuvent alors être conservés à -80°C après cette étape. La quantité de protéines est mesurée à l'aide du kit DCTM Protein assay fourni par Bio-Rad. Avant dépôt, un tampon de charge dénaturant (Laemmly Sample Buffer 4X, 161-0747, Bio-Rad) contenant 10 % de β -mercaptoéthanol (un agent réducteur permettant la réduction des ponts di-sulfures et jouant le rôle d'anti-oxydant) ajouté extemporanément, est mélangé aux échantillons. Les échantillons sont ensuite dénaturés par action de la chaleur 5 min à 90°C.

Pour les tissus comme l'adventice, les échantillons sont obtenus par broyage dans un mortier dans une solution de lyse Tris 160 mM 5 % SDS de pH 6,3, contenant 1 % d'un cocktail d'antiprotéases (P8340, SIGMA) à température ambiante. 70 µL de solution sont utilisés par adventice de rat (adventice obtenue par microdissection des six lobes des poumons de rat).

b. Migration et transfert

30 µg de protéines sont séparées par électrophorèse conduite à 80 V, 20 min puis 150 V pendant 1 h 30 min sur un gel d'acrylamide (jusqu'à la sortie du gel du front de migration). 5 µL de marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ All Blue standards, 1610373 Bio-Rad) sont déposés. Différents gels sont utilisés pour les expériences : un gel de gradient 4 - 15 % acrylamide et un gel 10 % acrylamide. Les protéines sont ensuite transférées en milieu liquide sur une membrane de PVDF (IPVH00010, Immobilon-P, Millipore) par l'application d'un courant à 115 V pendant 1 h. Les sites non spécifiques sont saturés pendant 1 h en utilisant du TBS - Tween 0,1 % contenant 5 % de lait demi-écrémé (**Tableau 7**, page 100).

c. Marquage immunologique : révélation et analyse

Les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C dans du TBS - Tween 0,1 % contenant 1% de lait et les anticorps primaires (**Tableau 4**, page 100). Les membranes sont ensuite lavées avec du TBS - Tween 0,1 % et traitées avec une solution de TBS - Tween 0,1 % contenant 1 % de lait demi-écrémé et les anticorps secondaires correspondants (**Tableau 5**, page 100) couplés à la peroxydase de raifort (HRP, « horseradish peroxidase ») pendant 1 h à température ambiante. Les membranes sont ensuite traitées 5 min avec le kit immobilion™ Western (P907020, Millipore), contenant un substrat chimioluminescent de la peroxydase. La chimioluminescence est révélée à l'aide du système ChemiDoc XRS+ et les images sont analysées avec le logiciel Image Lab™ (version 5.1, Bio-Rad).

Les membranes peuvent être réutilisées pour la recherche de différentes protéines. En cas de poids moléculaire proche de la protéine déjà révélée, une étape dite de « stripping » est réalisée par l'utilisation de la solution Restore™ Western Blot Stripping Buffer (21063, Thermo SCIENTIFIC) appliquée sur la membrane pendant 10 min.

Pour l'analyse, l'intensité de chaque bande d'expression protéique est normalisée par rapport à l'intensité de la bande correspondant à la protéine GAPDH du même puits.

7. Etude de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est évaluée grâce à la technique d'incorporation du BrdU (bromodésoxyuridine) avec le kit Cell Proliferation ELISA (11647229001, Roche).

c. Principe

La méthode d'incorporation du BrdU utilise un analogue de la thymidine, le BrdU, qui s'intègre dans l'ADN génomique au cours de la phase S du cycle cellulaire. La phase S du cycle cellulaire correspond à la phase où le génome se duplique en vue de la mitose qui permet la prolifération cellulaire. Il est admis qu'en mesurant le taux d'incorporation du BrdU, donc la proportion de cellules en phase S, on mesure la proportion de cellules qui sont rentrées dans le cycle cellulaire (et ne sont plus en phase de quiescence) et sont donc en phase de prolifération/division cellulaire.

d. Protocole

8 000 cellules FAP sontensemencées par puits de plaque 96 puits. Lorsque les cellules ont bien adhéré, elles sont transfectées si nécessaire. Elles sont ensuite placées dans du DMEM 1 % ATB et 1 % AANE sans sérum une nuit afin de les synchroniser. Les cellules sont ainsi dans la même phase du cycle cellulaire. Le lendemain matin, les cellules sont stimulées par les différents agents pharmacologiques (**Tableau 6**, page 100) en présence du BrdU

(BrdU labelling solution du kit) à 10 μ M dans un nouveau milieu DMEM 1 % ATB et 1 % AANE toujours sans SVF. Après 24 h de stimulation, les cellules sont fixées et dénaturées par une solution alcoolisée (Fix-denat solution du kit) pendant 30 min à température ambiante. Le BrdU incorporé est révélé par un anticorps couplé à la peroxydase incubé 90 min à température ambiante. Après trois rinçages au PBS, une solution substrat de la peroxydase (Substrate Solution du kit) permet une révélation colorimétrique de l'anti-BrdU grâce à un lecteur de microplaques à 380 nm avec une longueur de référence à 490 nm (SPECTROstar^{Nano}, BMG LABTECH). Trois répliques pour chaque condition sont réalisés.

Pour chaque expérience, un contrôle positif de la prolifération cellulaire en milieu 10 % SVF est réalisé.

8. Etude de la dégradation de la MEC

a. Principe

L'étude de la dégradation de la MEC est réalisée par l'utilisation d'un coating de gélatine couplée à un fluorophore : Gelatin From Pig Skin, Oregon Green™ 488 Conjugate (G13186, ThermoFisher SCIENTIFIC). Ce coating permet l'étude des dégradations, entre autres celle du collagène (un des composants majoritaires de la MEC), en quantifiant les zones où la gélatine a été digérée par les cellules.

b. Protocole

Le coating de gélatine est réalisé sur des lamelles circulaires de 14 mm de diamètre (0111540, Marienfeld-Superior) à l'abri de la lumière et sous hotte. Sur du parafilm sont déposées des gouttelettes de 30 μ L de gelatine à 1 mg / mL (filtré à 0,2 μ m). Les lamelles sont délicatement déposées sur les gouttelettes afin d'obtenir un coating régulier sur leur surface. Après 30 min d'incubation, les lamelles sont déposées 15 min sur des gouttelettes de glutaraldéhyde 0,5 % dans PBS. Cette étape permet une meilleure réticulation de la

gélatine et améliore l'adhésion des cellules. Les lamelles sont placées dans des puits de plaque 24 puits et rincées 3 fois par 1 mL de PBS.

Les lamelles ainsi préparées peuvent être conservées dans du PBS à 4°C à l'abri de la lumière.

50 000 cellules sontensemencées dans les puits contenant les lamelles circulaires coatées. Lorsque les cellules ont adhéré, elles sont transfectées avec les siRNA (si nécessaire). Elles sont ensuite placées dans du DMEM 1 % ATB et 1 % AANE sans sérum une nuit afin de les synchroniser. Le lendemain matin, les cellules sont stimulées par les différents agents pharmacologiques (en présence ou non des siRNA contrôle et TRPV4) en milieu DMEM 1 % ATB et 1 % AANE. A 24 heures de stimulation, les cellules sont fixées par de la PFA 4 % 20 min à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1X, les cellules sont marquées par la phalloïdine couplée à la rhodamine B isothiocyanate (cf. page 88).

c. Analyse

Les coupes ont été observées au BIC (Bordeaux Imaging Center) à l'aide du microscope Hamamatsu NANOZOOMER 2.0HT. Les images sont prises à l'aide du logiciel NDP.2, avec un zoom 20 X et la surface de dégradation de la gélatine a été quantifiée avec le logiciel ImageJ.

L'acquisition de 10 à 15 champs d'un grossissement 10 X (résolution 1600 x 900 pixels) a été aléatoirement réalisée pour chaque lamelle. La gélatine est couplée à un fluorophore excité à 488 nm à l'aide d'un laser argon, et la fluorescence émise est filtrée à 515 ± 30 nm. Les noyaux sont révélés grâce à l'excitation du DAPI à 405 nm à l'aide d'un laser à diode et la fluorescence émise est filtrée à 450 ± 35 nm.

Les images ainsi obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Image J. Un même seuil de détection de la fluorescence est appliqué pour chaque champ au sein d'une même expérience. Ce seuil permet de déterminer les zones non fluorescentes de la gélatine qui correspondent à sa dégradation par les cellules. La quantification de la dégradation est exprimé sous forme de surface de dégradations par champ rapporté au nombre de cellules de ce même champ (compté grâce au marquage des noyaux au DAPI).

9. Etude de la migration cellulaire

a. Principe

La technique de l'invasion de brèche permet de quantifier la migration cellulaire en 2D. Une "brèche" ou lésion est réalisée sur une monocouche de cellules à confluence, engradant une zone acellulaire. Des images de la « brèche » sont alors prises à partir du moment où la brèche a été réalisée, à 6 h et à 24 h afin de suivre la migration cellulaire qui intervient pour « réparer » la brèche. Les images sont ensuite comparées au temps « zéro » afin d'estimer le nombre de cellules ayant migré dans la zone acellulaire et ainsi d'obtenir, en rapportant cette quantité au contrôle, le taux de migration cellulaire.

b. Protocole

Les cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits, préalablement quadrillées afin de créer des points de repère, puis cultivées jusqu'à confluence. Après une incubation d'une nuit dans un milieu sans sérum, afin de synchroniser les cellules, une brèche est réalisée à l'aide d'un cône de pipette 200 μ L et d'une règle afin d'obtenir une aire dépourvue de cellules. Les cellules sont ensuite stimulées par les différents agents pharmacologiques en présence ou non des siRNA en milieu DMEM 1 % ATB et 1 % AANE. Deux images par puits sur des positions distinctes de la brèche sont prises à 6 puis 24 h de stimulation à l'aide d'un microscope droit avec un objectif X10 et de la camera visicam TC 10 de VWR.

L'analyse est effectuée en comptant les cellules qui ont migré dans la zone acellulaire.

10. Listes des anticorps, des agents pharmacologiques et des solutions utilisés pour l'étude

Anticorps primaires	Références - fournisseurs	Espèces	Dilutions		
			IHC	IF	WB
αSMA	Clone 1A4, A5228 - SIGMA	Anticorps monoclonal de souris	1 : 200	1 : 100	1 : 50 000
β-actine	Clone AC-74, A2228 - SIGMA	Anticorps monoclonal de souris			1 : 10 000
Collagène I	ABT123, Merck - Millipore	Anticorps polyclonal de lapin			1 : 1 000
Facteur de Von Willebrand	AB7356 – Merck - Millipore	Anticorps polyclonal de lapin		1 : 500	
Fibronectine	Ab2413 - Abcam	Anticorps polyclonal de lapin			1 : 2000
GAPDH	sc-25778 – SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIE	Anticorps polyclonal de lapin			1 : 1000
TRPV4	Ab191580 - Abcam	Anticorps polyclonal de lapin			1 : 1000
	ACC-034 - Alomone	Anticorps polyclonal de lapin	1 : 100		
	ACC-124 -Alomone	Anticorps polyclonal de lapin		1 : 50	
Vimentine	Clone V9, V6389, SIGMA	Anticorps monoclonal de souris		1 : 200	

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires

(IHC : ImmunoHistoChimie, IF : immunoFluorescence, WB : Western Blot)

Anticorps secondaires	Références - fournisseurs	Espèces	Dilutions	Utilisations
Alexa-Fluor 568	A11004 et A11011 - Molecular Probe / Invitrogen	chèvre anti-souris et chèvre anti-lapin	1 : 200	Immunofluorescence
Alexa-Fluor 488	A11001 et A11008 - Molecular Probe / Invitrogen	chèvre anti-souris et chèvre anti-lapin	1 : 200	Immunofluorescence
Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	172-1011 - Bio-Rad	chèvre anti-souris	1 : 15000	Western blot
HRP goat anti-rabbit IgG antibody	PI1000 - VECTOR	chèvre anti-lapin	1 : 10000	Western blot
Autres			[C]	
DAPI	D9542 - SIGMA		5 µg/mL	Immunofluorescence
Phalloïdine-rhodamine B isothiocyanate	P1951 - SIGMA		5 µg/mL	Immunofluorescence

Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires et autres produits de marquage cellulaire

[C] : concentration

Noms – Abréviation	Références - Fournisseur	Concentrations utilisées	Protocoles de dilutions	Effets pharmacologiques
GSK1016790A - GSK	G0798 - SIGMA	$1 \cdot 10^{-7}$ M	10^{-4} M DMSO puis milieu aqueux	Activateur sélectif de TRPV4
4α-PDD	P8014 - SIGMA	$5 \cdot 10^{-6}$ M	10^{-3} M DMSO puis milieu aqueux	Activateur sélectif de TRPV4
HC067047 - HC	SML0143 - SIGMA	$5 \cdot 10^{-6}$ M	10^{-3} M DMSO puis milieu aqueux	Inhibiteur sélectif de TRPV4

Tableau 6 : Liste des agents pharmacologiques utilisés

Noms / Abréviations	Compositions
MAC	NaCl 130 mM ; KCl 5,6 mM ; CaCl ₂ 2 mM ; MgCl ₂ 1 mM ; HEPES 8 mM ; glucose 11 mM ; pH 7.,
TBS	Tris 20 mM ; NaCl 150 mM
TBS-TWEEN	Tris 20 mM ; NaCl 150 mM ; 0,05 % TWEEN 20 (2287, SIGMA)
Solution de lyse tissulaire	Tris 161 mM ; 5 % SDS ; pH 6,3 ; 1 % antiprotéases (P8340, SIGMA)
RIPA complet	RIPA buffer (97063-270, AMRESCO's) ; 1 % antiprotéases (P8340, SIGMA) ; 1 % Sodium Fluoride (P0759S, BioLabs [®]) ; 1 % Orthovanadate de Sodium (P0758S, BioLabs [®]) ; 0,5 % DNase (04716728001 ROCHE)
Runing buffer	Tris 25 mM ; glycine 190 mM ; 0,1 % SDS
Transfert buffer	Tris 25 mM ; glycine 190 mM ; 20 % ethanol absolu

Tableau 7 : Liste des solutions / tampons utilisé(e)s

11. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). "n" indique le nombre de fois où l'expérience a été réalisée et « N » le nombre de rats ou de souris utilisés. Pour comparer les moyennes, des tests non paramétriques (Mann-Whitney en cas de comparaison de 2 groupes, Kruskal-Wallis en cas de comparaison de plus de 2 groupes et Friedman en cas de comparaison de plusieurs groupes avec des mesures répétées) et paramétriques ANOVA (suivi d'un test post-hoc de Bonferroni) ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad – Prism 5.01[®]. Le test de normalité d'Agostino-Pearson a été réalisé avant utilisation du test ANOVA. Les différences sont considérées comme significatives quand $P < 0,05$. * indique une différence significative pour $P < 0,05$, ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats présentés dans cette these font actuellement l'objet d'un premier article qui sera très prochainement soumis au journal Arteriosclerosis, Thombosis and Vascular Biology :

TRPV4 channel mediates pulmonary artery adventitial fibroblast activation and excessive adventitial remodeling in pulmonary hypertension

Laure-Anne CUSSAC^{a,b}, Guillaume CARDOUAT^{a,b}, Nichiren TIRUCHELLVAM PILLAI^{a,b}, Marilynne CAMPAGNAC^{a,b}, Paul ROBILLARD^{a,b}, Christelle GUIBERT^{a,b}, Philippe GAILLY^c, Roger MARTHAN^{a,b}, Jean-François QUIGNARD^{a,b}, Jean-Pierre SAVINEAU^{a,b}, and Thomas DUCRET^{*a,b}

^aUniv. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France ; ^b INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France ; ^c Laboratory of CellPhysiology, Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, B-1200, Brussels, Belgium.

* Corresponding author: Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, INSERM U1045, Université de Bordeaux, 146 rue Léo-Saignat (case 13), F-33076 Bordeaux cedex, France.

Phone: +33.5.57.57.16.94; Fax +33.5.57.57.16.95; e-mail: thomas.ducret@u-bordeaux.fr

Running title: TRPV4 in pulmonary artery adventitial fibroblasts

Keywords: adventitia, fibroblast, migration, proliferation, pulmonary artery, TRP channel, *trpv4*^{-/-} mice

Abstract

Objective: Pulmonary arterial adventitial fibroblasts (PAF), the most abundant cellular constituents of adventitia, act as a key regulator of pulmonary vascular wall structure and function from the outside-in. Previous studies indicate that TRPV4 channel plays an important role in the development of pulmonary hypertension (PH), but no attention has been given to its role in the excessive adventitial remodeling. In the present study, we thus investigated its implication in the PAF activation occurring in PH.

Approach and Results: First, using Western blot, we determined that TRPV4 protein expression was up-regulated in adventitia from chronically hypoxic and monocrotaline rats, two animal models of PH. Furthermore, as assessed by hemodynamic and morphometric methods, the development of PH and the excessive adventitial remodeling in particular were attenuated in PH-induced *trpv4*^{-/-} mice. Then, to explore the role of TRPV4 in PAF phenotypic changes, we isolated and cultured PAF from rat adventitial intrapulmonary artery. Using RT-PCR, Western blot, immunostaining, and calcium imaging (fluo-4/AM), we showed that PAF expressed functional TRPV4 channels. In extension of these results, with pharmacological and siRNA approaches, we also demonstrated the involvement of TRPV4 in PAF proliferation (BrdU incorporation), migration (wound-healing assay), and extracellular matrix invasion (gelatin-FITC degradation) responses. Finally, Western blot experiments showed that TRPV4 activation up-regulated the expression of extracellular matrix protein synthesis (collagen and fibronectin).

Conclusions: These data reinforce the concept that PAF play an essential role in hypertensive pulmonary vascular remodeling and indicate the participation of TRPV4 channel activity in the PAF activation leading to the development of PH.

L'HyperTension Pulmonaire (HTP) est l'une des principales maladies touchant la circulation pulmonaire. Elle se définit par une Pression Artérielle Pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure ou égale à 25 mmHg au repos chez l'Homme, la PAPm au repos chez un sujet sain étant de 15 mmHg. Cette augmentation peut s'expliquer par l'élévation des résistances vasculaires pulmonaires occasionnée en partie par le remodelage artériel qui engendre un rétrécissement de la lumière artérielle.

Le remodelage artériel touche les trois tuniques formant l'Artère IntraPulmonaire (AIP) : l'*intima*, la *media* et l'*adventice*. Dans cette étude, nous nous intéresserons au remodelage adventiciel. En effet de plus en plus de travaux montrent les altérations précoces que subit l'*adventice* lors de la mise en place de l'HTP [7], [79] et ce via l'activation des fibroblastes.

Le canal cationique non sélectif TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) est l'isoforme de TRPV dont l'ARNm est le plus exprimé dans l'AIP [215], [216]. Il a déjà été montré qu'il était surexprimé dans les CMLAP de rats hypoxiques chroniques [150], [217] et que la délétion de ce gène chez des souris hypertendues (modèle hypoxie chronique) réduit le développement de la pathologie via la diminution du remodelage de la *media*, de la muscularisation des artères de petit calibre, des PAPm et du remodelage cardiaque [217]. Au sein des fibroblastes d'autres tissus, le canal TRPV4 a aussi été décrit jouant un rôle important dans le remodelage tissulaire [227], [228], [230], [232]. Jusqu'à présent, aucune étude porte sur le rôle de TRPV4 dans le remodelage de l'*adventice* des AIP et plus précisément dans l'activité des fibroblastes. Le travail réalisé au cours de cette thèse est donc le premier discutant d'un lien entre l'activité de ce canal et le remodelage adventiciel des AIP.

Dans cette première partie, nous allons nous intéresser à l'implication du canal TRPV4 dans le remodelage adventiciel. A l'aide de deux modèles animaux d'HTP « MonoCroTaline » (MCT) et « hypoxie chronique », (cf. pages 32 et 73) mimant respectivement des HTP de groupes 1 et 3, couramment utilisés au laboratoire [65], [235], nous allons dans un premier temps regarder l'expression du canal au niveau de l'*adventice* lors de l'HTP puis rendre compte de l'incidence de son absence sur le remodelage de l'*adventice*. Ces deux modèles engendrent le développement d'HTP mais d'une origine physiopathologique différente (cf. page 32) : le modèle « MCT » a une composante plus inflammatoire que le modèle « hypoxie chronique » où l'hypertrophie de la *media* prédomine.

I. Implication du canal TRPV4 dans le remodelage adventitial pulmonaire lors de l'hypertension pulmonaire

1. Quantification de l'expression de TRPV4 dans l'adventice de rat souffrant d'hypertension pulmonaire

La méthode de récupération de l'adventice n'étant pas utilisée en routine au laboratoire, nous avons dû la mettre au point et valider la technique avant de débiter notre étude.

a. Récupération du tissu adventitial

i. Nature du tissu

L'isolement de l'adventice a été réalisé chez deux espèces de rongeur, la souris et le rat. Il est plus délicat de récupérer l'adventice chez la souris, l'AIP étant plus petite et fragile. La quantité de matériel tissulaire récupéré est donc très faible pour cette espèce et ne permet pas d'assurer une quantité de tissu suffisante pour assurer l'ensemble des expériences. C'est pourquoi il a été choisi de travailler sur les rats.

Après isolation de l'AIP par microdissection des lobes de poumons de rat, l'adventice est récupérée par léger « tiraillement » de la partie « fibreuse » qui entoure l'AIP. Cette partie fibreuse n'est jamais entièrement récupérée afin de s'affranchir du risque de contamination du tissu récupéré par de la *media*.

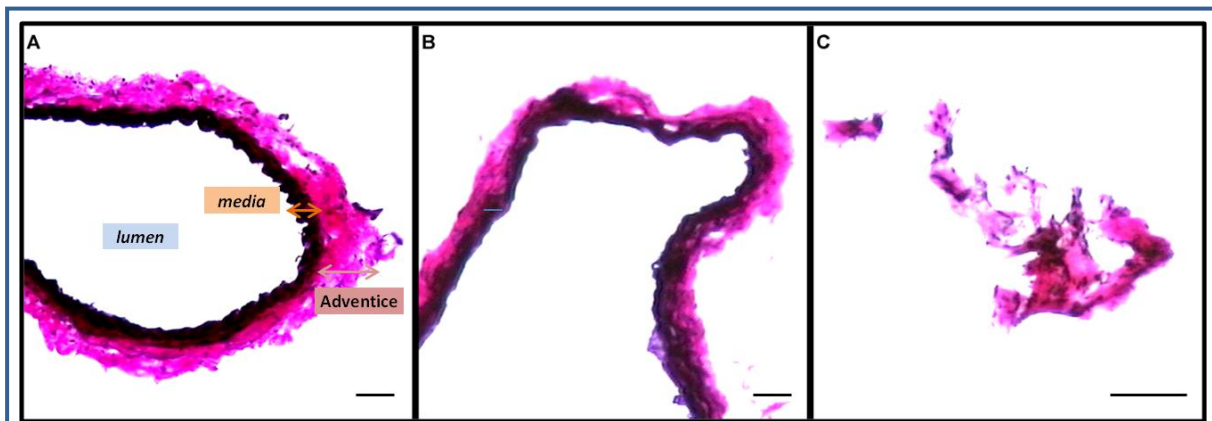


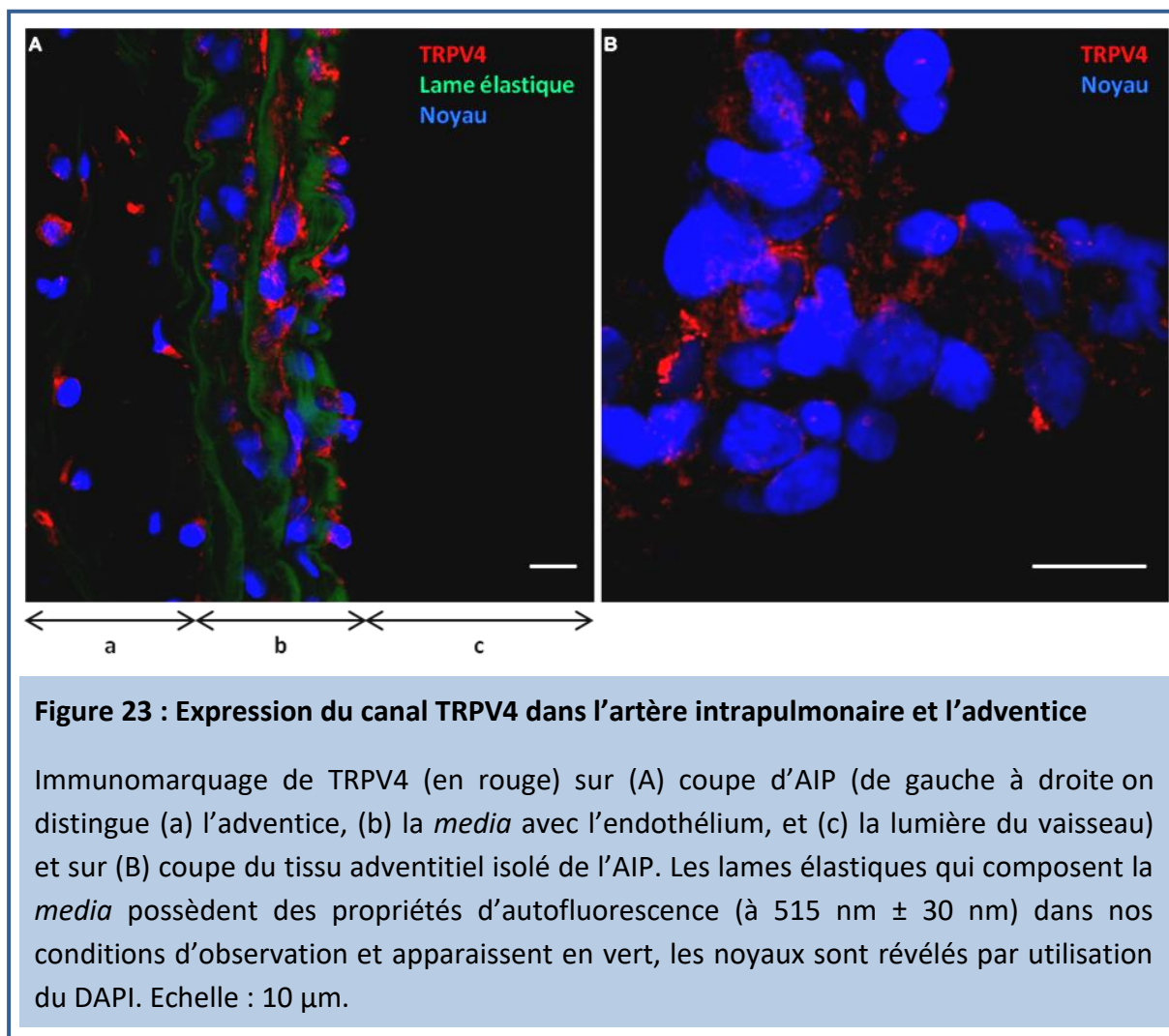
Figure 22 : Isolement de l'adventice de l'artère intrapulmonaire

Des coupes de 8 μm ont été réalisées à partir d'AIP de rats isolées par microdissection du lobe gauche. (A) AIP « complète », (B) AIP après isolement de l'adventice, (C) adventice. Coloration « elastica van Gieson », échelle : 80 μm .

Afin de confirmer la nature du tissu isolé, des coupes d'AIP avant et après retrait de l'adventice, ainsi qu'une coupe du tissu récupéré ont été réalisées et colorées par la coloration « Elastica van Gieson ». Cette coloration a pour avantage de marquer les fibres élastiques qui composent les lames élastiques de la *media* en noir et le collagène (qui est l'un des composants majeurs de l'adventice) en rose et ainsi, de nettement délimiter la *media* de l'adventice (**Figure 22 A**). Les noyaux apparaissent en marron-noir. Par ce marquage, il devient plus facile de confirmer la nature du tissu récupéré. La coupe présentée, **Figure 22 B**, témoigne de la conservation de l'intégrité de la *media* pour les artères après isolement de l'adventice et la présence résiduelle de collagène autour de la lame élastique externe. L'image présentée, **Figure 22 C**, correspondant au tissu prélevé, révèle la présence exclusive d'un tissu composé de collagène et de cellules. L'absence de débris de lame élastique dans cette coupe assure de la qualité de l'échantillon récupéré. Nous pouvons alors conclure à la nature adventitielle de ce tissu.

ii. Expression de TRPV4 au niveau du tissu adventitial

A partir de ces mêmes artères et du tissu adventitial, nous avons réalisé d'autres coupes et effectué des marquages immunohistochimiques afin de mettre en évidence l'expression du canal TRPV4 au niveau de l'adventice de ces AIP.



L'autofluorescence des lames élastiques qui forment la *media* permet de discerner les différentes tuniques qui constituent l'artère. Chaque tunique présente un marquage positif pour la protéine TRPV4 (**Figure 23**). La présence du canal dans les cellules qui composent la *media* et l'*intima*, respectivement les CMLAP et les cellules endothéliales avait déjà été montrée [215], [216], [236]. L'adventice est un tissu de composition cellulaire hétérogène. En effet, il abrite différents types cellulaires, des fibroblastes, mais aussi des cellules immunitaires comme les cellules dendritiques et les macrophages, des cellules progénitrices

et des adipocytes, mais la population largement dominante est celle des fibroblastes (cf. page 9). Le marquage du canal TRPV4 observé, **Figure 23**, est pratiquement présent sur toutes les cellules de l'adventice. Peu de cellules apparaissent comme ne pas exprimant le canal TRPV4. Les fibroblastes sont majoritaires dans l'adventice et de nombreuses publications ont démontré l'expression de ce canal dans les fibroblastes d'autres tissus (entre autres les fibroblastes cardiaques, pulmonaires et de la peau [227], [228], [230], [232]). Nous pouvons conclure que les fibroblastes de l'adventice d'AIP expriment le canal TRPV4.

Par cette première étude, nous montrons pour la première fois la présence de TRPV4 dans le tissu adventiciel et plus précisément dans les fibroblastes qui le composent.

b. Variation de l'expression du canal TRPV4 au cours de l'hypertension pulmonaire

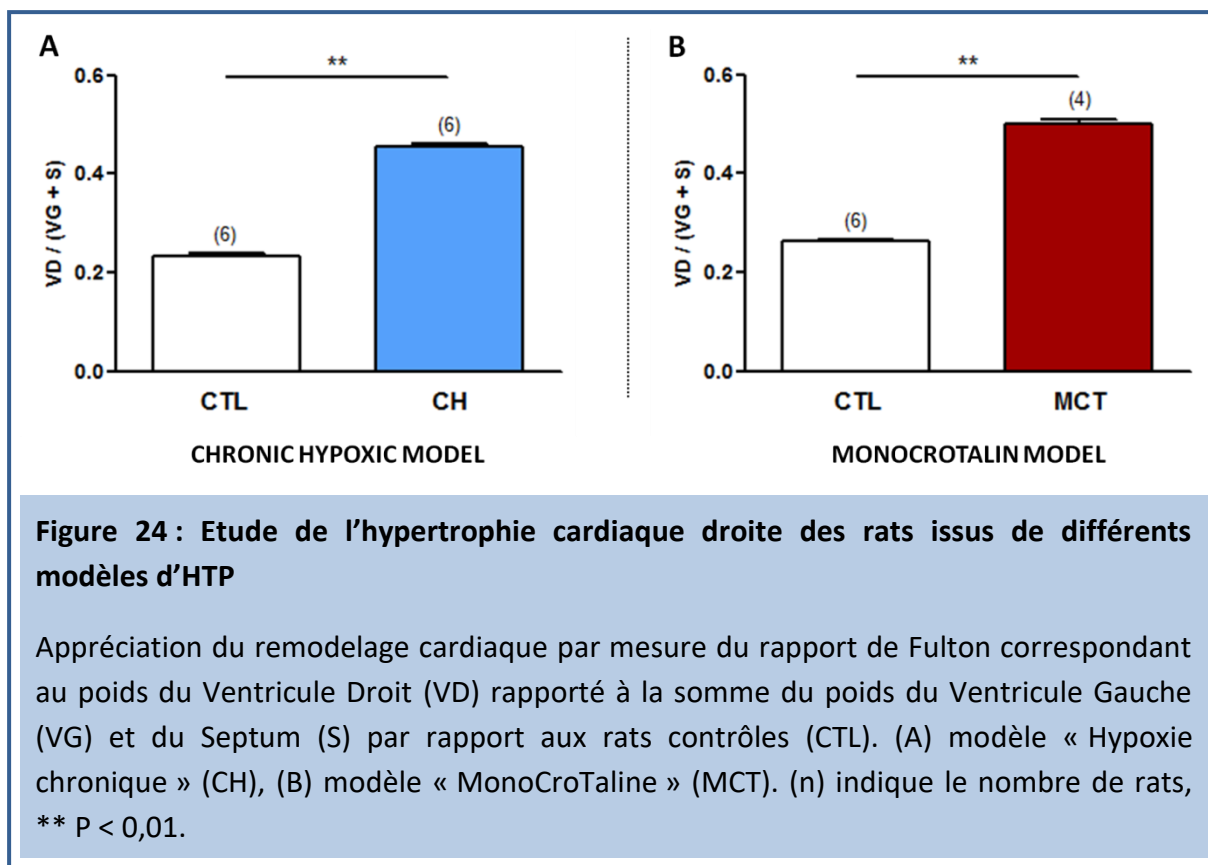
i. Mise en place de l'hypertension pulmonaire

L'état pathologique des animaux peut être attesté de deux façons : par la mesure de la PAPm et par l'étude de l'hypertrophie du ventricule droit.

La mesure de la PAPm se réalise par cathétérisme invasif qui est une technique contraignante et délicate se réalisant sur animaux anesthésiés. Les modèles d'HTP groupe 1 et 3 sur les rats sont des modèles robustes, couramment employés dans le laboratoire [65], [235]. C'est pourquoi pour ces animaux, seule l'étude du remodelage cardiaque droit est effectuée pour confirmer le statut pathologique.

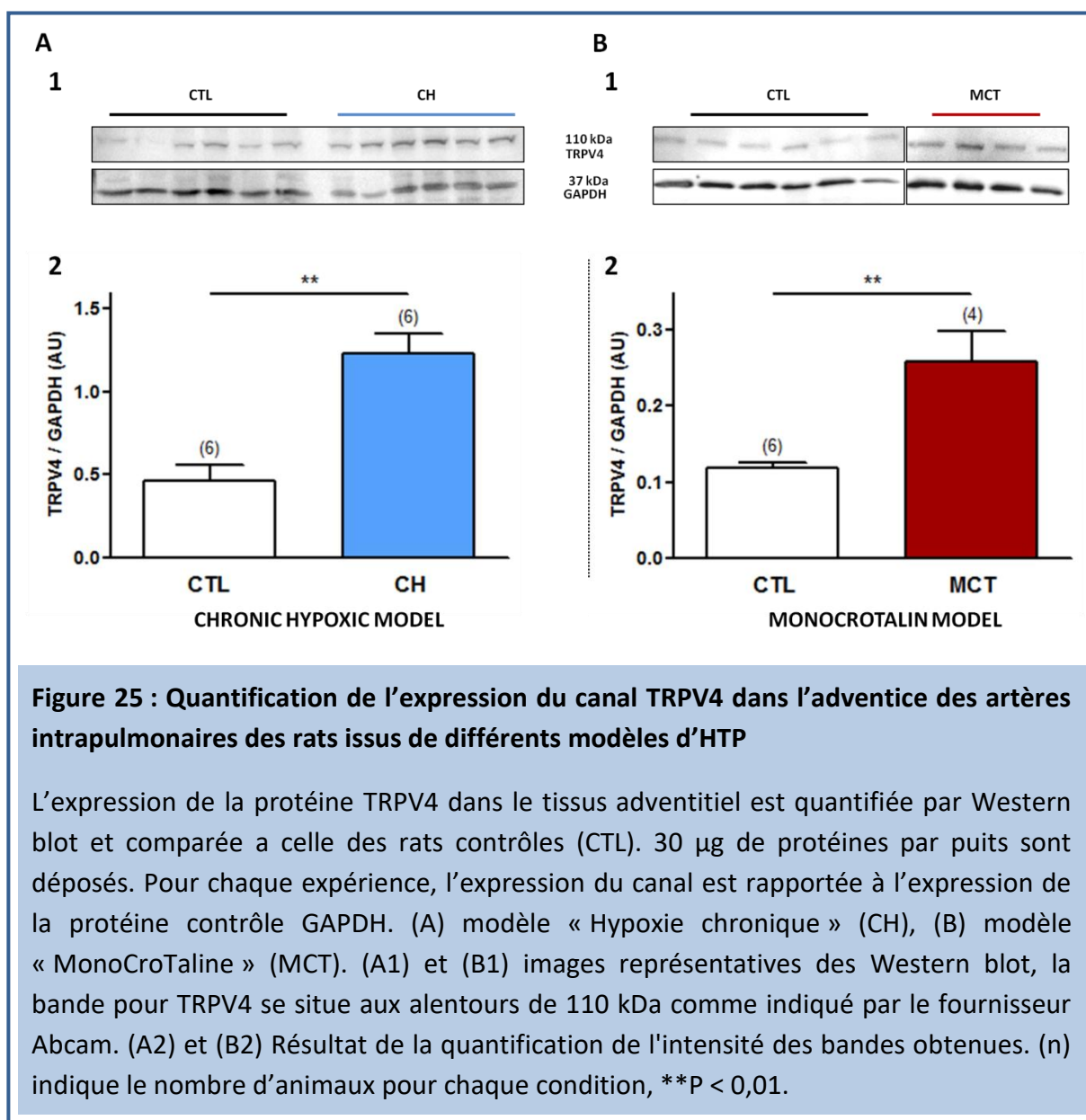
A noter que le modèle « MCT » est un modèle connu pour engendrer de la mortalité. Cette mortalité s'explique par le développement d'une d'HTP généralement plus grave et l'importante toxicité de la MCT (toxicité hépatique et sur l'ensemble des cellules endothéliales de l'organisme pouvant engendrer des atteintes multiples et délétères) (cf. page 32). Dans notre étude, sur six animaux utilisés, deux sont décédés.

Le remodelage cardiaque est estimé par la mesure du rapport de Fulton (F). Ce rapport représente le rapport du poids du Ventricule Droit (VD) sur la somme des poids du Ventricule Gauche (VG) et du Septum (S) ($F = \frac{VD}{VG+S}$).



Les résultats présentés, **Figure 24**, montrent un rapport de Fulton significativement augmenté pour les cœurs des rats soumis au séjour hypoxique ou ayant reçu une injection de MCT (respectivement $0,456 \pm 0,005$, $n = 6$, et $0,499 \pm 0,009$, $n = 4$) par rapport aux rats contrôles (respectivement $0,233 \pm 0,007$, $n = 6$) et $0,262 \pm 0,005$, $n = 6$) certifiant ainsi l'état pathologique des rats utilisés pour l'étude.

ii. Quantification de l'expression du canal TRPV4



La quantification de la protéine TRPV4 par Western blot indique une élévation de l'expression de celle-ci dans l'adventice des deux modèles d'HTP étudiés (**Figure 25**).

Pour le modèle hypoxique chronique, le rapport, de l'expression de TRPV4 sur l'expression de la protéine de ménage GAPDH, est de $0,460 \pm 0,095$ (n = 6) pour les rats contrôles contre $1,232 \pm 0,117$ (n = 6) pour les rats malades (**Figure 25 A**).

Le modèle « MCT », quant à lui, présente un rapport de $0,118 \pm 0,008$ (n = 6) pour les rats contrôles contre $0,258 \pm 0,041$ (n = 4) pour les rats ayant subi l'injection (**Figure 25 B**).

Pour ces deux modèles d'HTP, nous retrouvons une augmentation de l'expression du canal TRPV4 de l'ordre de 200 % par rapport aux différents contrôles. Quelle que soit l'origine de l'HTP, l'augmentation de l'expression du canal est similaire.

La surexpression du canal TRPV4 avait déjà été démontrée au niveau de la *media* [150], [217]. Par ces travaux, nous démontrons pour la première fois que le canal TRPV4 est également surexprimé au sein de l'adventice dans l'HTP.

Au vu de ces premiers résultats, il paraissait intéressant de poursuivre l'étude de ce canal dans la physiopathologie de la maladie.

L'expression du canal TRPV4 étant bien augmentée dans l'adventice d'AIP en situation d'HTP, nous étudions à présent sa nécessité dans le développement de la pathologie et plus particulièrement son rôle dans le phénomène de remodelage vasculaire. Pour rappel, l'étude de Yang, en 2012, a déjà montré dans des modèles d'HTP hypoxie chroniques chez la souris *trpv4^{-/-}*, que l'absence de ce canal atténuait le développement de la pathologie [217]. Nous allons, par notre travail, étudier chez ces souris le remodelage de l'adventice, et compléter notre approche par l'étude d'un deuxième modèle d'HTP, le modèle « MCT », où l'impact de l'absence de la protéine n'a encore jamais été décrit.

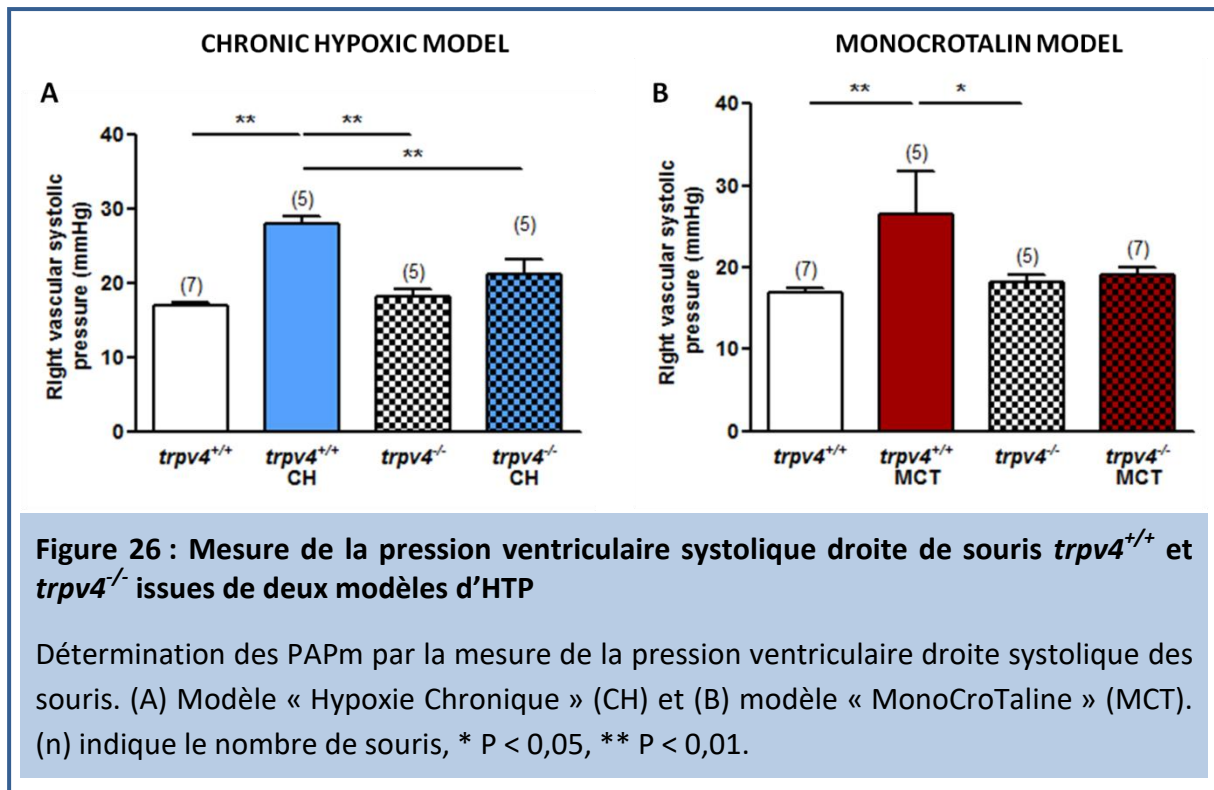
2. Implication du canal TRPV4 dans le développement de l'hypertension pulmonaire

Afin d'appréhender plus généralement le rôle de TRPV4 dans l'HTP nous avons choisi d'étudier l'impact du KO *trpv4* pour deux modèles d'HTP. Le modèle « hypoxie chronique » est robuste et bien caractérisé, l'absence de cette protéine permet une atténuation globale du développement de la pathologie : les PAPm et le rapport de Fulton sont diminués par rapport aux souris *trpv4*^{+/+} hypoxiques chroniques et le remodelage de la *media* est amoindri [217].

La mise en place du modèle « MCT » chez la souris est plus récent et a longtemps été plus controversé que chez le rat. Il n'a jamais été étudié chez la souris *trpv4*^{-/-}. Pour générer l'HTP, la MCT doit être métabolisée par l'intermédiaire de cytochromes P450 en MCT-pyrrole (métabolite actif et toxique). Or, il existe pour ces cytochromes une forte variabilité inter-espèces, et la souris n'est pas ou peu capable de réaliser cette biotransformation. Les premiers modèles d'HTP avec la MCT chez la souris montraient une faible reproductibilité quant au développement de la pathologie [116]. Mais l'augmentation des doses utilisées et de la fréquence des injections ont permis de diminuer ce manque de reproductibilité et de rendre ce modèle plus robuste [116]. C'est ce nouveau modèle qui est utilisé au laboratoire. Ce modèle d'HTP est décrit pour développer une HTP moyenne (moins sévère que chez les rats) présentant un faible remodelage cardiaque [116] et des PAPm moins élevées. Mais le remodelage artériel, faisant l'objet principal de ma thèse, a toujours été mis en évidence [116], [117], [237].

a. TRPV4 & augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne

C'est par la mesure de la Pression Ventriculaire Droite Systolique (PVDs) que nous déterminons la PAPm chez nos animaux.



En conditions contrôles, la PAPm n'est pas significativement différente pour les souris *trpv4*^{+/+} et les souris *trpv4*^{-/-} (respectivement $16,847 \pm 0,559$ mmHg (n = 7) et $18,161 \pm 0,879$ mmHg (n = 5)) (**Figure 26**). La délétion de la protéine n'affecte pas la PAPm physiologique des souris.

Les animaux *trpv4*^{+/+} soumis aux conditions hypoxiques ou ayant reçu les injections de MCT voient leur PAPm augmenter par rapport aux souris en conditions contrôles attestant bien de l'état pathologique des animaux (PAPm respectives de $26,9 \pm 1,433$ mmHg (n = 5) et $26,456 \pm 5,278$ mmHg (n = 5)) (**Figure 26**).

Pour le modèle hypoxie chronique, nous confirmons les résultats fournis par l'étude de yang 2012. Les souris *trpv4*^{-/-} hypoxiques montrent une PAPm ($21,040 \pm 2,659$ mHg (n=5)) diminuée par rapport aux animaux malades *trpv4*^{+/+} ($26,9 \pm 1,433$ mmHg, n = 5) (**Figure 26 A**)

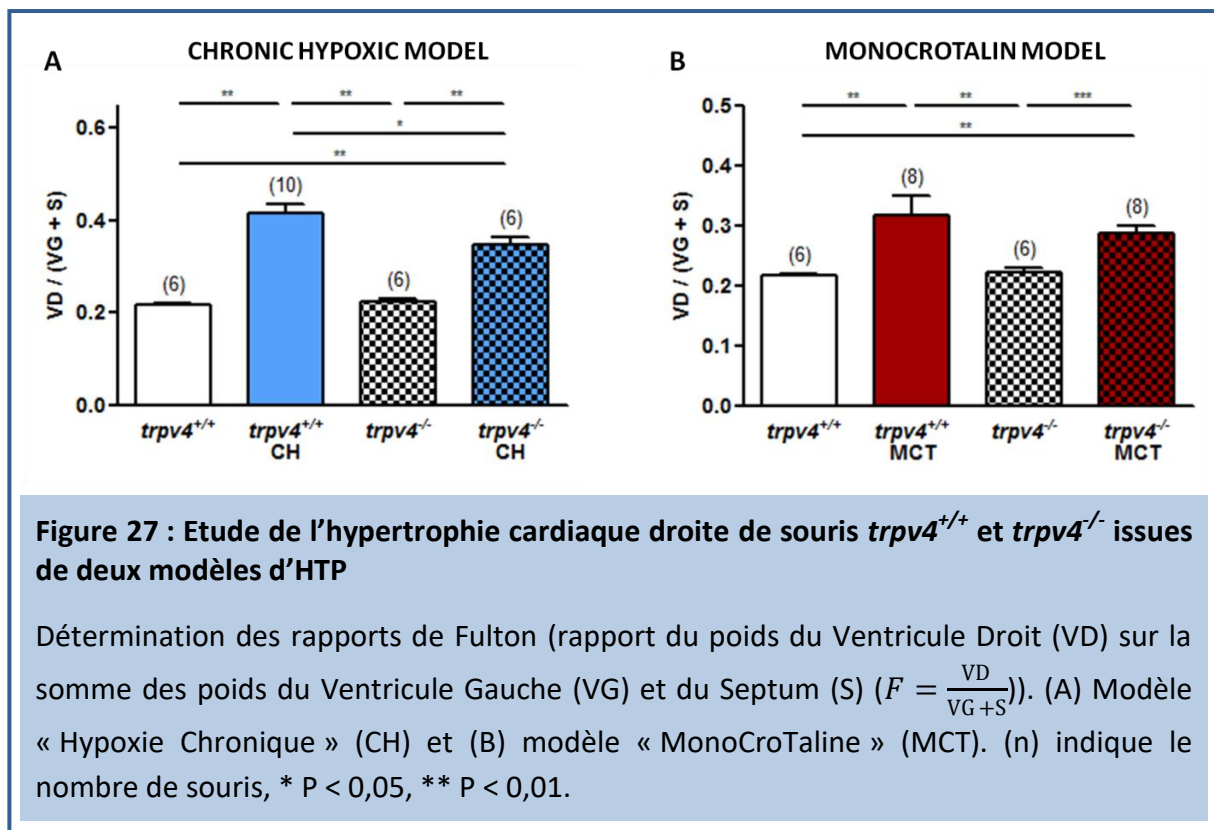
confirmant l'implication de la protéine dans le développement de l'HTP.

Ce résultat n'est pas retrouvé chez les souris *trpv4*^{-/-} ayant reçu l'injection de MCT ($19,071 \pm 0,934$ mmHg (n = 7)), la PAPm n'est pas significativement différente des souris *trpv4*^{+/+} atteintes d'HTP $26,456 \pm 5,278$ mmHg (n = 5) (**Figure 26 B**). Mais cette PAPm n'est plus différente des souris *trpv4*^{+/+} et *trpv4*^{-/-} en conditions contrôle. L'HTP développée par les souris « MCT » est moins sévère que celle développée par les souris soumis à l'environnement hypoxique. Dans ces conditions, il est possible que nous ne puissions pas observer l'impact de l'absence de canal TRPV4 sur la PAPm.

Avec ces résultats nous validons pour la première fois l'état pathologique des souris « knock-out » pour les deux modèles étudiés. Nous notons le rôle néfaste de la protéine dans le degré de sévérité de l'HTP de groupe 3 et nous envisageons alors l'hypothèse que ce canal est aussi impliqué dans la sévérité de la pathologie dans le modèle « MCT ».

Afin de confirmer ces résultats et notre hypothèse, nous avons étudié le deuxième paramètre permettant d'attester l'HTP, la mesure de l'hypertrophie ventriculaire droite par le rapport de Fulton.

b. TRPV4 & remodelage cardiaque



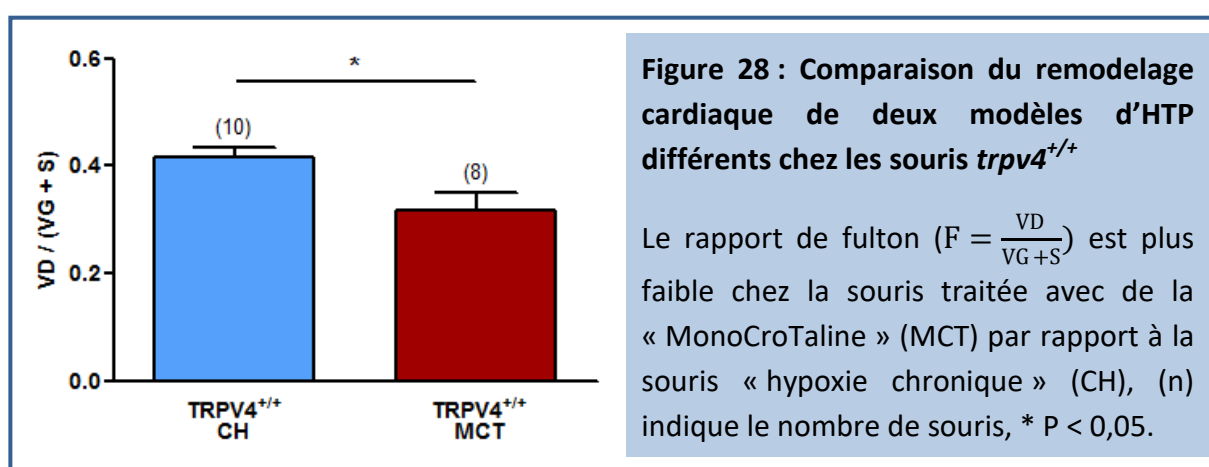
En conditions contrôles, le rapport de Fulton n'est pas significativement différent pour les souris *trpv4*^{+/+} et les souris *trpv4*^{-/-} (respectivement $0,217 \pm 0,002$ (n = 6) et $0,222 \pm 0,006$ (n = 6)) (**Figure 27**). Les animaux *trpv4*^{+/+} soumis aux conditions hypoxiques ou à l'injection de MCT ont bien développé une hypertrophie du cœur droit comme l'indique le rapport de Fulton augmenté, respectivement $0,415 \pm 0,019$ (n = 10) et $0,318 \pm 0,033$ (n = 8) (**Figure 27**). Les résultats retrouvés précédemment quant au statut pathologique des animaux *trpv4*^{+/+} sont donc confirmés.

Pour le modèle hypoxique, les souris *trpv4*^{-/-} ont développé une hypertrophie du ventricule droit ($F = 0,347 \pm 0,017$ (n = 6)) atténuée par rapport aux souris *trpv4*^{+/+} ayant séjourné trois semaines dans le caisson hypobare ($0,415 \pm 0,019$, n = 10) (**Figure 27 A**). Nous validons donc les résultats du papier de l'équipe de Yang, publié en 2012 [217].

Cette atténuation de l'atteinte ventriculaire n'est pas retrouvée pour le modèle MCT (**Figure 27 B**) : chez les souris *trpv4*^{-/-} ayant subi l'injection de MCT ($F = 0,288 \pm 0,017$ (n = 8)) nous n'observons pas un remodelage cardiaque significativement différent des souris *trpv4*^{+/+} « MCT » (**Figure 27 B**).

Le canal TRPV4 est impliqué dans le remodelage ventriculaire droit des souris placées dans le caisson hypobare. Couplés au constat précédent, ces résultats consolident l'idée du rôle néfaste du canal TRPV4 dans le développement de l'HTP pour ce modèle.

Concernant le modèle « MCT », nous ne pouvons, au vu des résultats de PAPm et de remodelage cardiaque droit décrits précédemment, arriver aux mêmes conclusions pour ce modèle. Les souris *trpv4^{+/+}* soumises à l'injection de monocrotaline développent un remodelage cardiaque moins important que celui observé chez les souris *trpv4^{+/+}* pour le modèle « hypoxie chronique » ($0,318 \pm 0,033$ (n = 8) contre $0,415 \pm 0,019$ (n = 10)) (**Figure 28**).



De plus l'absence du canal TRPV4 dans le modèle « hypoxie chronique » n'annihile pas le remodelage cardiaque mais le réduit significativement (**Figure 28**). Il est possible que dans le modèle « MCT », où la souris développe une HTP moins sévère avec un remodelage qui plus est significativement plus bas que pour le modèle « hypoxie chronique » (**Figure 28**), nous ne pouvons, la aussi, pas observer l'impact de l'absence de la protéine TRPV4 sur l'hypertrophie cardiaque droite.

Par cette première partie, nous nous sommes assurés de l'état pathologique des animaux pour les deux modèles étudiés et par ce fait avons validé leur utilisation pour l'étude du remodelage vasculaire. Bien que l'impact de l'absence de la protéine TRPV4 sur le développement de la pathologie ne soit pas confirmé pour le modèle « MCT », nous avons montré précédemment que l'expression de la protéine TRPV4 était, elle, bien augmentée

dans l'adventice pour ce modèle. C'est pourquoi nous étudions pour ces deux modèles le remodelage artériel et plus précisément le remodelage de l'adventice chez ces souris *trpv4*^{-/-}.

c. TRPV4 & remodelage des artères intrapulmonaires

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au remodelage de la *media* (**Figure 29 A et B**). En conditions contrôles, nous n'observons pas de différence d'épaisseur de la *media* pour les souris *trpv4*^{+/+} et les souris *trpv4*^{-/-} (quantification réalisée sur respectivement 36 et 15 AIP de 6 souris).

Pour les deux modèles (« hypoxie chronique » et « MCT »), nous constatons un remodelage de la *media* significatif par rapport aux souris en condition contrôle (augmentation de respectivement 45 ± 6 % et 23 ± 6 %, n analyse de 36 et 26 AIP) (**Figure 29 A et B**).

Les animaux décrits comme atteints d'HTP précédemment, développent bien un remodelage au niveau de la *media* et ce pour les deux formes d'HTP. Ces résultats confirment aussi la présence du remodelage artériel chez les souris ayant reçu les injections de MCT [116], [117], [237].

Les souris *trpv4*^{-/-} soumises aux conditions hypoxiques ou à l'injection de MCT voient ce remodelage significativement atténué et même non différent des souris contrôles (**Figure 29 A et B**) (99 ± 6 % pour le modèle « hypoxie chronique » et 103 ± 3 % pour le modèle « MCT », n analyse réalisée sur respectivement 20 et 39 AIP).

L'absence du canal TRPV4 permet donc l'atténuation de la pathologie pour les deux formes d'HTP. Ces résultats corroborent ceux retrouvés par Yang en 2012 pour le modèle d'HTP de groupe 3 et montrent pour la première fois ce même phénomène pour le modèle « MCT ». En effet ce remodelage n'avait jamais été quantifié pour le modèle d'HTP de groupe 1.

A partir de ces mêmes artères, nous avons quantifié le remodelage de l'adventice (**Figure 29 A et C**). En condition contrôle, la surface occupée par l'adventice rapportée au diamètre de l'AIP n'est pas différente pour les souris *trpv4*^{+/+} et les souris *trpv4*^{-/-} (quantification réalisée sur respectivement 36 et 15 AIP de 6 souris).

Pour les deux modèles (« hypoxie chronique » et « MCT »), nous constatons un remodelage de l'adventice significatif pour les souris *trpv4*^{+/+} par rapport au souris en conditions

contrôles (augmentation de respectivement 62 ± 10 % et 91 ± 11 % (n respectivement égal à 36 et 26 AIP analysées) (**Figure 29 A et C**). Nous confirmons donc que le remodelage adventitial est bien présent dans les deux formes d'HTP.

Ce remodelage adventitial est significativement amoindri chez les souris *trpv4*^{-/-} soumises aux conditions hypoxiques ou à l'injection de MCT. Il est, tout comme le remodelage de la *media*, non différent des conditions contrôles (106 ± 7 % pour le modèle « hypoxie chronique » et 125 ± 9 % pour le modèle « MCT », n analyses réalisées sur respectivement 20 et 39 AIP) (**Figure 29 A et C**).

Nous montrons pour la première fois que l'expression du canal TRPV4 est impliquée dans le remodelage adventitial.

Au vu de ces résultats, le canal TRPV4 joue un rôle primordial dans le remodelage des AIP. Son absence est décisive sur le remodelage de la *media* et de l'adventice et ce dans les deux formes d'HTP étudiées.

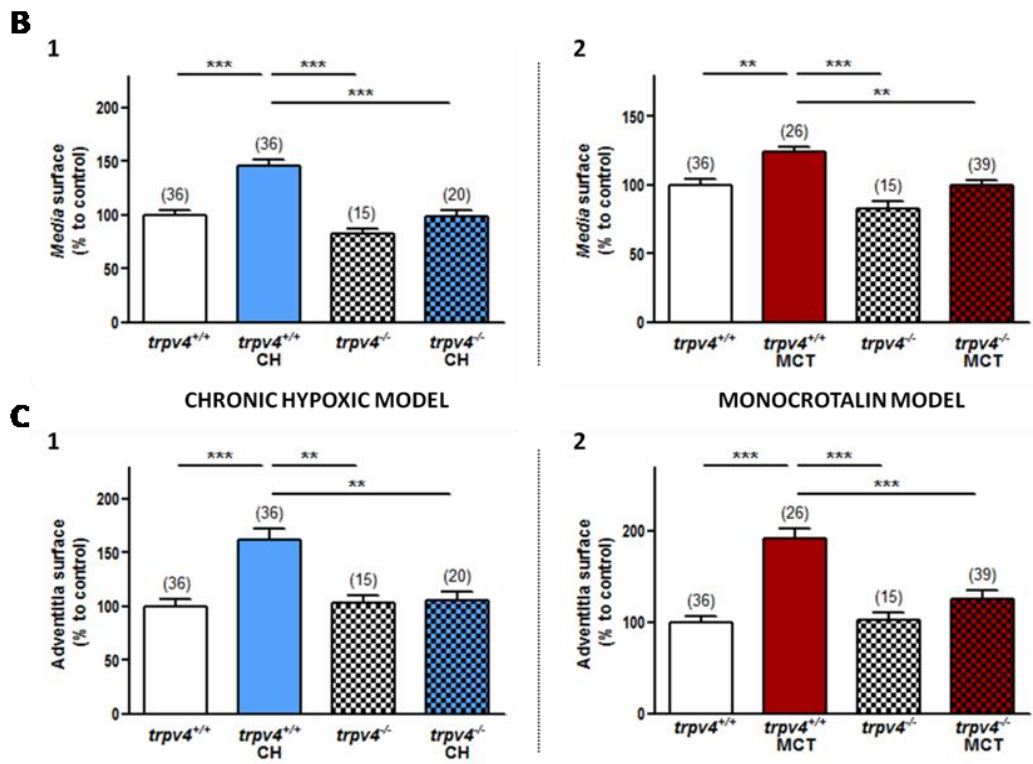
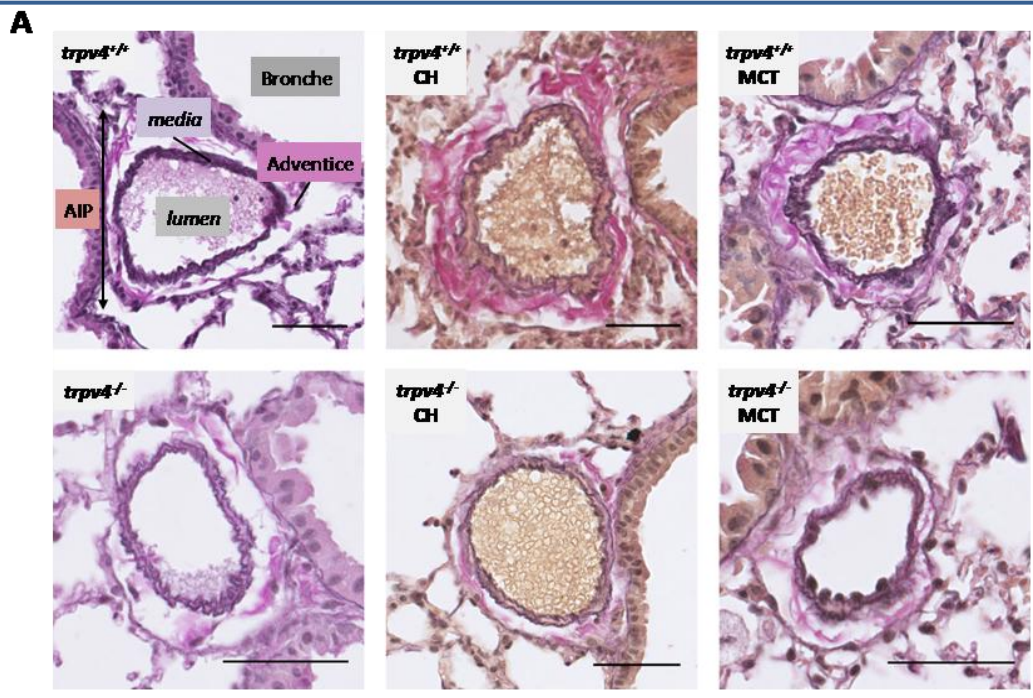


Figure 29 : Quantification du remodelage pulmonaire de souris chez les souris *trpv4*^{+/+} et *trpv4*^{-/-} issues de deux modèles d’HTP

(A) Images représentatives des AIP étudiées dans les différentes conditions étudiées, coloration Van Gieson elastica, échelle 50 µm. (B) Quantification du remodelage de la *media* chez la souris atteinte, (1) modèle « hypoxie chronique » (CH) (2) modèle « MonoCroTaline » (MCT), (C) Quantification du remodelage chez la souris, (1) modèle « hypoxie chronique » (CH) (2) modèle « MonoCroTaline » (MCT). * P < 0,05, ** P < 0,01, ***P < 0,001, (n) représentant le nombre d’AIP étudié.

3. Discussion générale

Les résultats présentés dans cette première partie indiquent une implication du canal TRPV4 dans le développement de l'HTP et plus précisément son rôle dans le remodelage artériel. Comme déjà discuté précédemment, jusqu'à présent, seule l'implication de TRPV4 dans le remodelage de la *media* et dans la muscularisation des petits vaisseaux avait été investiguée à l'aide du modèle « hypoxie chronique » et avait montré l'importance de ce canal dans ces phénomènes et dans l'instauration de la pathologie. Par cette étude, nous complétons ces résultats en montrant que ce canal est aussi impliqué dans le remodelage de l'adventice et ce, dans deux formes d'HTP distinctes : une induite par une exposition prolongée à un milieu hypoxique où les premières modifications observées sont la muscularisation des petites artères et l'épaississement de la *media* (HTP groupe 3) et une autre avec une plus forte composante inflammatoire mimant une HTAP (HTP groupe 1).

Ainsi, nous avons d'abord mis en évidence une augmentation de l'expression de la protéine TRPV4 dans le tissu adventiciel dans ces deux formes d'HTP. L'activité de ce canal pourrait donc jouer un rôle important dans l'instauration de la pathologie. L'influence de l'exposition à l'hypoxie chronique sur l'expression du canal était connue pour les CMLAP [150], [217]. Nous retrouvons cette surexpression dans le modèle inflammatoire. Ce résultat laisse supposer que le canal TRPV4 est impliqué de façon plus générale dans l'HTP. D'autres études ont par exemple montré que des médiateurs de l'inflammation comme le TNF- α ou le TGF β augmentent l'expression de TRPV4 dans différents types cellulaires comme les cellules synoviales [238] et les fibroblastes cardiaques [230]. L'implication du canal TRPV4 dans l'instauration de l'HTP pourrait donc être liée à un ensemble de facteurs présent dans la pathologie.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux conséquences de l'absence de la protéine dans l'instauration de la pathologie grâce à l'utilisation de souris délétées pour ce gène.

Lorsqu'on utilise des souris « knock-out » il faut prendre en considération le fait que la perte d'une protéine peut être compensée par la présence d'autres protéines afin d'assurer le développement physiologique de l'animal. Au vu du rôle du canal TRPV4 dans les mécanismes liés à l'homéostasie et de la redondance fonctionnelle entre différents canaux TRP, il serait légitime de suspecter une compensation par d'autres TRP afin d'assurer le bon

développement de l'animal. La délétion du gène *trpv4* n'est pas létale. Les premières études sur ce modèle [194], [198] ne montrent pas de problème de développement chez ces animaux. Les souris ressentent moins la soif et ont tendance à être hyperosmolaires. Il n'est pas observé de différence au niveau de leur température basale.

A l'aide de ces souris, nous avons montré pour la première fois l'importance du canal TRPV4 dans le développement de la pathologie au niveau du remodelage adventiciel, ainsi que dans le modèle « MCT ». La quantification du remodelage de la *media* et de l'adventice montre un remodelage largement amoindri chez les souris *trpv4*^{-/-} pour les deux formes d'HTP. Aussi, nous corroborons les résultats déjà existants publiés par Yang X.R. en 2012 qui concernaient seulement le remodelage de la *media* pour le modèle hypoxie chronique [217].

La combinaison de ces deux résultats est donc en faveur d'un rôle important de TRPV4 dans le remodelage adventiciel et plus généralement artériel.

Les deux modèles d'HTP étudiés sont consécutifs à deux origines distinctes de la pathologie. D'un point de vue histologique, nous observons dans ces deux modèles un remodelage vasculaire et un rétrécissement de la lumière des vaisseaux. Ces deux modèles partagent aussi une composante inflammatoire bien que plus faible pour le modèle hypoxique.

Au sein de la *media*, ce remodelage s'explique principalement par une prolifération cellulaire ou une hyperplasie des CMLAP, ainsi que la migration de CMLAP dans les artérioles. Le rôle de TRPV4 dans ces mécanismes a déjà été montré par des études menées, entre autres, au laboratoire [218], [218], [219]. Dans les CMLAP, l'activité du canal TRPV4 influence la migration cellulaire [218]. En condition hypoxique, le canal est surexprimé [150] et la migration cellulaire dépendante du canal augmentée [219]. Cette amplification de l'activité du canal pourrait être due en partie à l'amplification de la réponse calcique de TRPV4 et par l'activation du récepteur à la ryanodyne RyR2 surexprimé dans les AIP de rats « hypoxie chronique » [150].

Concernant l'aspect inflammatoire de la pathologie, au laboratoire il a déjà été révélé le lien entre l'acide arachidonique et ses dérivés, produits dans des situations d'inflammation, plus particulièrement le 5,6-EET, et TRPV4. En effet, le 5,6-EET est capable de déclencher l'activité du canal dans les CMLAP (cf. page 56) [71].

Une récente étude conduite par l'équipe de Shimoda a démontré dans le modèle SUGEN (cf. page 36) que l'augmentation de l'influx de calcium induit par la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène passait par l'activation des canaux TRPV4. De plus, cette voie de signalisation serait impliquée dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales microvasculaires et la dysfonction endothéliale [239]. La surproduction d'espèces réactives de l'oxygène peut être le fruit de l'aspect inflammatoire de la pathologie.

Mises en parallèles, ces études suggèrent un lien important entre l'inflammation et l'activité du canal TRPV4.

Le remodelage de l'adventice s'explique en partie par une prolifération des fibroblastes, leur migration et leur invasion dans les différentes tuniques formant l'AIP, une surproduction de protéines de la Matrice ExtraCellulaire (MEC) (dont le collagène et la fibronectine) et leur différenciation en myofibroblastes (cf. page 30). Le rôle de TRPV4 dans ces phénomènes n'a pas été étudié dans le cadre de l'hypertension pulmonaire mais dans les fibroses. L'influence de ce canal dans l'ensemble de ces manifestations a d'ailleurs été observé dans les phénomènes de sclérodémie, de fibroses cardiaque et pulmonaires. Il a été prouvé que l'activité profibrotique des fibroblastes, ainsi que leur différenciation en myofibroblaste induite par la cytokine TGF β passaient en partie par l'activation du canal TRPV4 [228], [230], [232]. L'activité du canal TRPV4 dans les fibroblastes est aussi amplifiée dans les maladies respiratoires type asthme, où il est nécessaire au remodelage bronchique présent [227].

L'hypothèse d'un rôle majeur du canal TRPV4 des fibroblastes adventitiels dans le remodelage adventiciel paraît pertinente au vu du lien existant entre le canal TRPV4 et l'HTP, ainsi que les rôles de TRPV4 déjà décrits dans les CMLAP, les cellules endothéliales et les fibroblastes d'autres tissus. Il apparaît opportun de poursuivre l'étude de TRPV4 dans ces fibroblastes pour comprendre son implication dans les différents mécanismes cités précédemment : la prolifération, la migration, l'invasion et la production de MEC.

II. Rôle des canaux TRPV4 dans la physiologie cellulaire des fibroblastes

La culture de fibroblastes adventitiels d'AIP (FAP) n'étant pas utilisée au laboratoire, il a fallu dans un premier temps mettre au point ce type de culture. A partir de ces cellules, nous avons, à l'aide de différentes expériences, regardé l'implication de TRPV4 dans les différents mécanismes observés dans le remodelage adventiciel : la prolifération, la migration, l'invasion et la production de MEC. Ces expériences ont été réalisées à l'aide d'agents pharmacologiques activateurs et bloqueurs du canal, et, ont été confirmées par l'utilisation d'une approche siRNA permettant de diminuer l'expression du canal. Ainsi, nous nous assurons que les effets observés passent effectivement par l'activité du canal TRPV4.

1. Mise au point de l'obtention des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

a. Obtention des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

L'obtention des FAP se réalise à partir de tissu adventiciel isolé (**Figure 22**, page 109) de la façon décrite précédemment (cf. page 79). Deux jours sont nécessaires à la sortie des premières cellules des explants d'adventice. Ces cellules sont de formes fusiformes ou étoilées avec de longs et fins prolongements venant au contact des autres cellules (**Figure 30**), ce qui correspond bien à la description académique des fibroblastes.

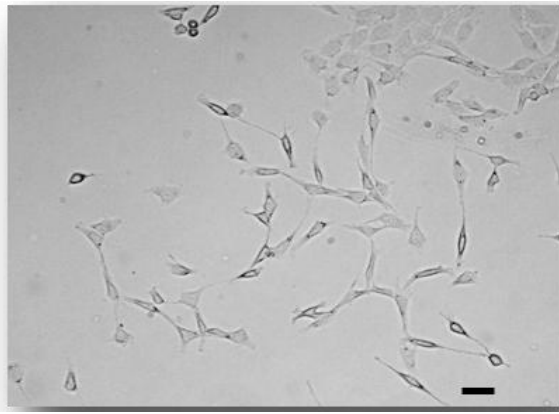


Figure 30 : Culture des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires à partir des explants d'adventice

Observation en lumière blanche des Fibroblastes Adventitiels d'AIP (FAP) après leur sortie des explants d'adventice.
Echelle 30 μm .

Afin d'attester du phénotype des cultures, un phénotypage a été réalisé dès les premiers repiquages (**Figure 31**).

Le risque de la culture par explants d'adventice d'AIP est sa contamination par la *media* et l'*intima*, ce qui pourrait entraîner la présence de CML ou de CE. Les coupes d'artères réalisées avant et après récupération de l'adventice (**Figure 22**, page 109) nous informent bien quant à la « nature » des explants utilisés, mais afin de garantir l'homogénéité des cultures, un marquage par immunofluorescence a été effectué. Il n'existe pas de marqueur spécifique des fibroblastes. Dans la littérature [232], les fibroblastes sont caractérisés par l'absence de protéines spécifiques des CML et des CE. Pour ces travaux, nous avons utilisé trois protéines : la vimentine, le Facteur de Von Willebrand (FVW) et l'actine alpha du muscle lisse (αSMA). La vimentine fait partie de la famille des filaments intermédiaires, elle est exprimée dans de nombreux types cellulaires dont les fibroblastes. Le FVW est un des éléments nécessaires à l'hémostase primaire et est spécifique des CE dans l'artère. Pour finir, l' αSMA , un des constituants majeurs de l'appareil contractile est communément employée comme marqueur des CML.

Ainsi, pour notre étude, sont définies comme fibroblastes, les cellules exprimant seulement la vimentine. Les cultures utilisées au laboratoire répondent bien à ces spécificités (**Figure 31**), les FAP sont positifs pour le marquage vimentine, et négatifs pour le FVW et l' αSMA .

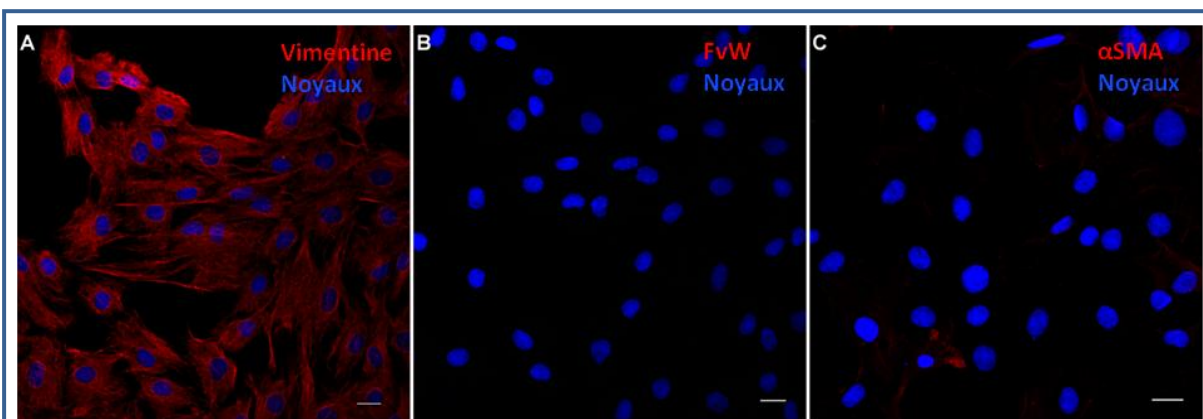


Figure 31 : Phénotypage de culture de fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

Immunomarquage de FAP au passage P2, (A) les cellules sont positives pour la vimentine (en rouge), (B) les cellules sont négatives pour le Facteur de von Willebrand (FvW) (en rouge), (C) les cellules sont négatives pour l' α SMA. Les noyaux sont révélés en bleu, grâce au DAPI. Echelle 20 μ m.

Nous avons procédé à un suivi de ce phénotype au cours des passages afin de nous assurer que les conditions de culture cellulaire n'influencent pas la nature des FAP (**Figure 32**). En effet, en particulier sur des cultures primaires, le risque de dégénération cellulaire ou dans notre cas de différenciation des cellules en myofibroblastes (fibroblastes ayant développé une propriété contractile), est accru. Ce gain de propriété contractile est conféré par l'expression de la protéine α SMA, son marquage permet alors de mettre en évidence la différenciation des fibroblastes.

L'immunomarquage de la protéine α SMA, **Figure 32 A**, montre clairement un changement d'expression de la protéine (ici au passage P4). L'expression de la protéine observée par western blot, **Figure 32 B**, confirme qu'à partir du passage P4, l' α SMA est plus présente au sein des FAP. Ces résultats indiquent une différenciation des FAP après le 3^{ème} passage, confirmant l'étude sur des fibroblastes cardiaques [230], qui observait leur différenciation en myofibroblastes à partir du 4^{ème} repiquage.

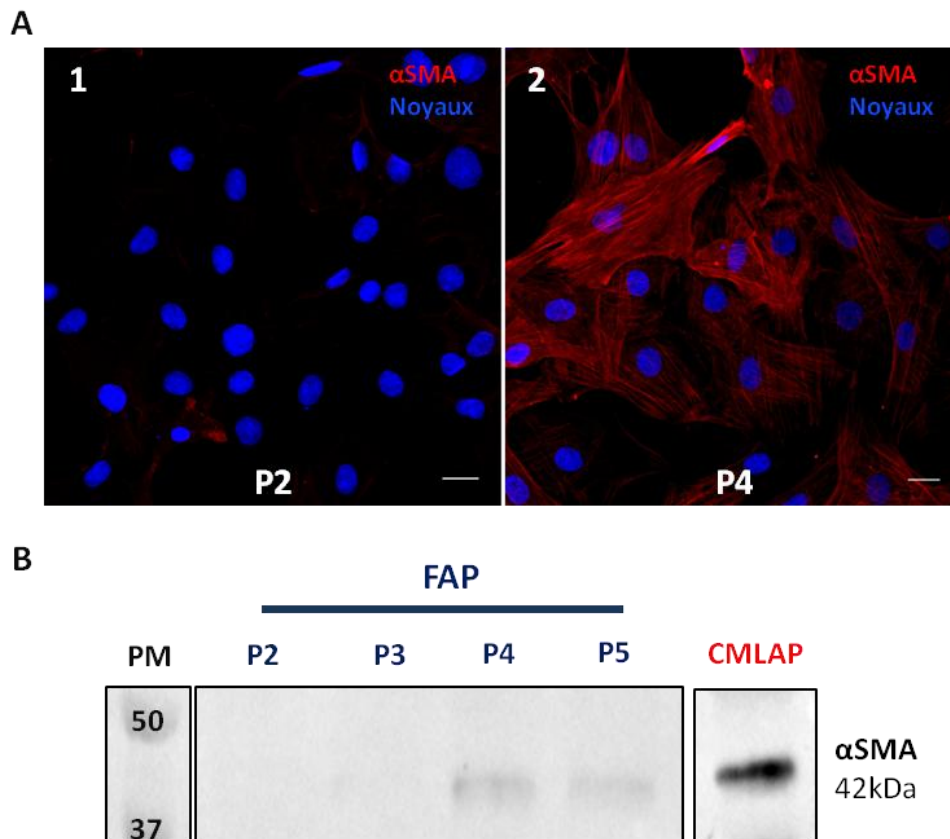


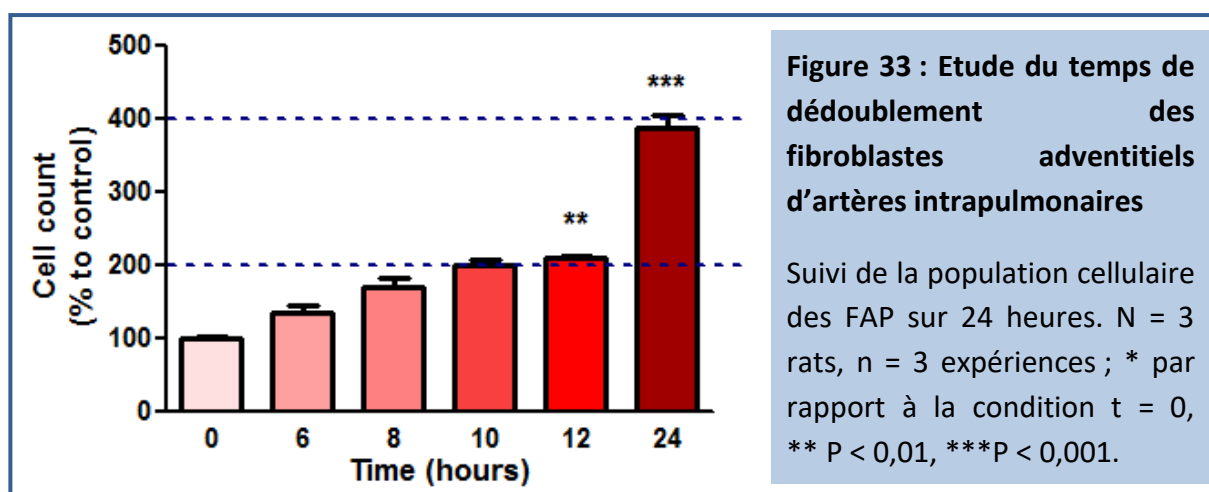
Figure 32 : Mise en évidence de la différenciation des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

Le suivi de l'expression de l' α SMA, marqueur de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes au cours des passages est réalisé par deux approches. (A) Immunomarquage de l' α SMA au (1) passage P2 et au (2) passage P4. Les noyaux sont révélés en bleu, grâce au DAPI. Echelle 20 μ m. (B) Suivi de l'expression de la protéine α SMA par Western blot en fonction des passages (P2 à P5). 30 μ g de protéine par puits sont déposés. Les CMLAP sont utilisées comme contrôle positif pour l'expression de l' α SMA. PM correspond au Poids Moléculaire en kDa.

b. Temps de dédoublement des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

Pour finir la caractérisation des cultures de FAP obtenues, nous nous sommes intéressés au temps de dédoublement cellulaire dans les conditions de culture utilisées, en présence de 10 % SVF. L'étude de ce paramètre permet l'optimisation et l'organisation des cultures pour les expériences réalisées et d'assurer du temps nécessaire à la synchronisation des cultures.

Les résultats (**Figure 33**) nous montrent un doublement complet de la population cellulaire entre 10 et 12 heures de culture. En effet la population cellulaire pour ces périodes augmente de $98,83 \pm 8,0 \%$ à $109,5 \pm 3,27 \%$ par rapport à la population initiale. Ainsi une déprivation des cellules en nutriments réalisée sur la nuit (temps supérieur à 12 heures) est suffisant pour synchroniser le cycle cellulaire des FAP.



2. Caractérisation du canal TRPV4 dans les FAP

a. Expression de la protéine

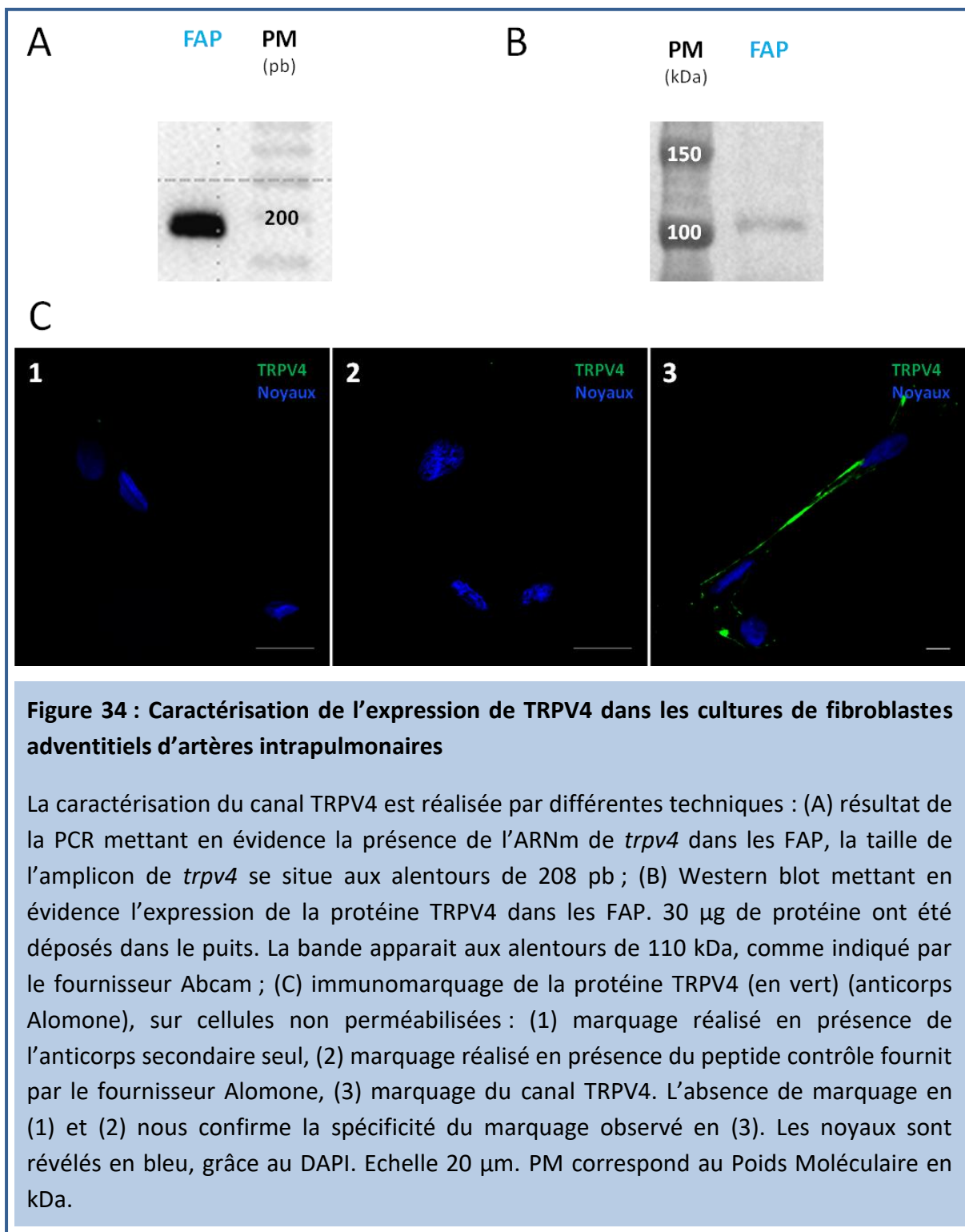
Afin d'attester de l'expression du canal TRPV4 dans les FAP nous avons mis en évidence l'expression de son ARNm par PCR (**Figure 34 A**), puis de la protéine par les techniques de Western blot (**Figure 34 B**) et de marquage immunofluorescent (**Figure 34 C**) à partir des cultures cellulaires.

Comme nous le montre la photo du gel d'agarose (**Figure 34 A**) présentant le résultat de l'amplification de l'amplicon à 208 pb, « designer » par notre équipe, spécifique du gène *trpv4*, l'ARNm du canal est bien présent dans les FAP.

L'étude des lysats cellulaires des cultures de FAP par la technique de Western blot, confirme l'expression de la protéine TRPV4 dans les FAP par la révélation d'une bande aux alentours de 110 KDa (**Figure 34 B**) (comme indiqué sur la fiche technique du fournisseur de l'anticorps anti-TRPV4 choisi (Abcam, #Ab191580, **Tableau 4**, page 100)).

Le marquage immunofluorescent, met en évidence la présence de canaux TRPV4 regroupés en cluster (**Figure 34 C3**). La comparaison en lumière blanche (non montré) confirme que ce marquage se situe au niveau de la membrane. De plus l'anticorps choisi lie la partie extracellulaire du canal et est utilisé sur cellules non perméabilisées. La sélectivité du marquage a été validée de deux façons : par utilisation de l'anticorps secondaire seul (**Figure 34 C1**) et du peptide contrôle fourni avec l'anticorps anti-TRPV4 (**Figure 34 C2**). L'absence de la révélation de l'expression du canal pour les champs concernés assure de la qualité du marquage observé.

Ces différentes expériences confirment la présence du canal TRPV4 dans les FAP cultivés.

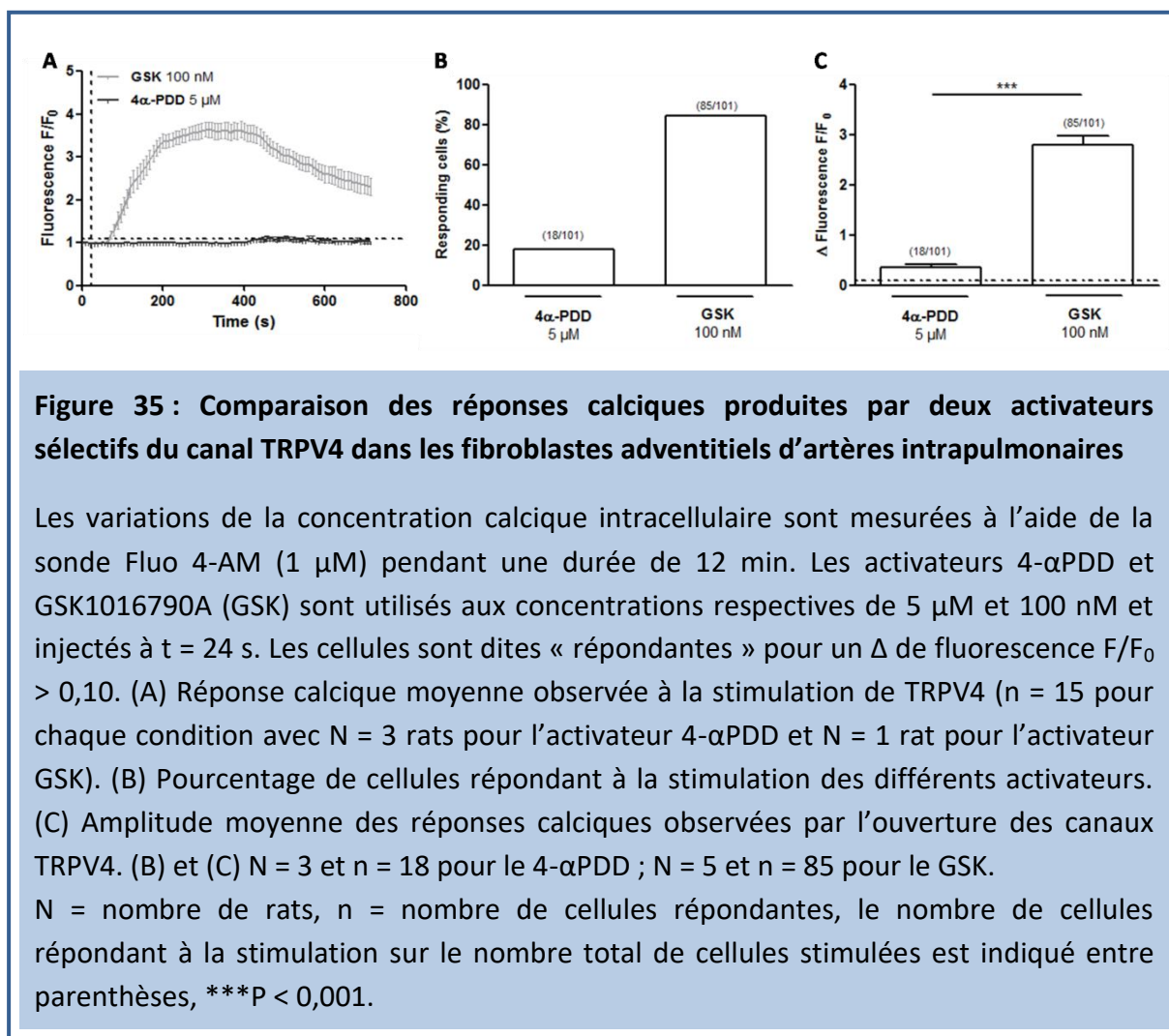


b. Fonctionnalité du canal

Le canal TRPV4 est un canal cationique non sélectif mais majoritairement perméable aux ions calcium (cf. page 55). C'est pourquoi, pour étudier la fonctionnalité de la protéine, nous avons regardé la réponse calcique médiée par TRPV4. La réponse calcique du canal a été mise en évidence par imagerie calcique à l'aide de la sonde calcique Fluo-4AM (cf. page 90) qui forme un complexe avec le calcium libre intracellulaire. L'intensité de fluorescence de la sonde est proportionnelle à la concentration en calcium intracellulaire permettant ainsi de suivre les variations de concentration de calcium en temps réel. Pour notre étude, nous considérons comme une réponse cellulaire une variation de l'amplitude « F/F_0 » supérieure à dix pourcents.

Deux activateurs décrits pour leur sélectivité pour le canal TRPV4 sont utilisés pour cette étude, afin de sélectionner le plus efficace : l'activateur empirique le 4-alpha-Phorbol 12,13-didecanoate (4 α -PDD) et le GSK1016790A (GSK).

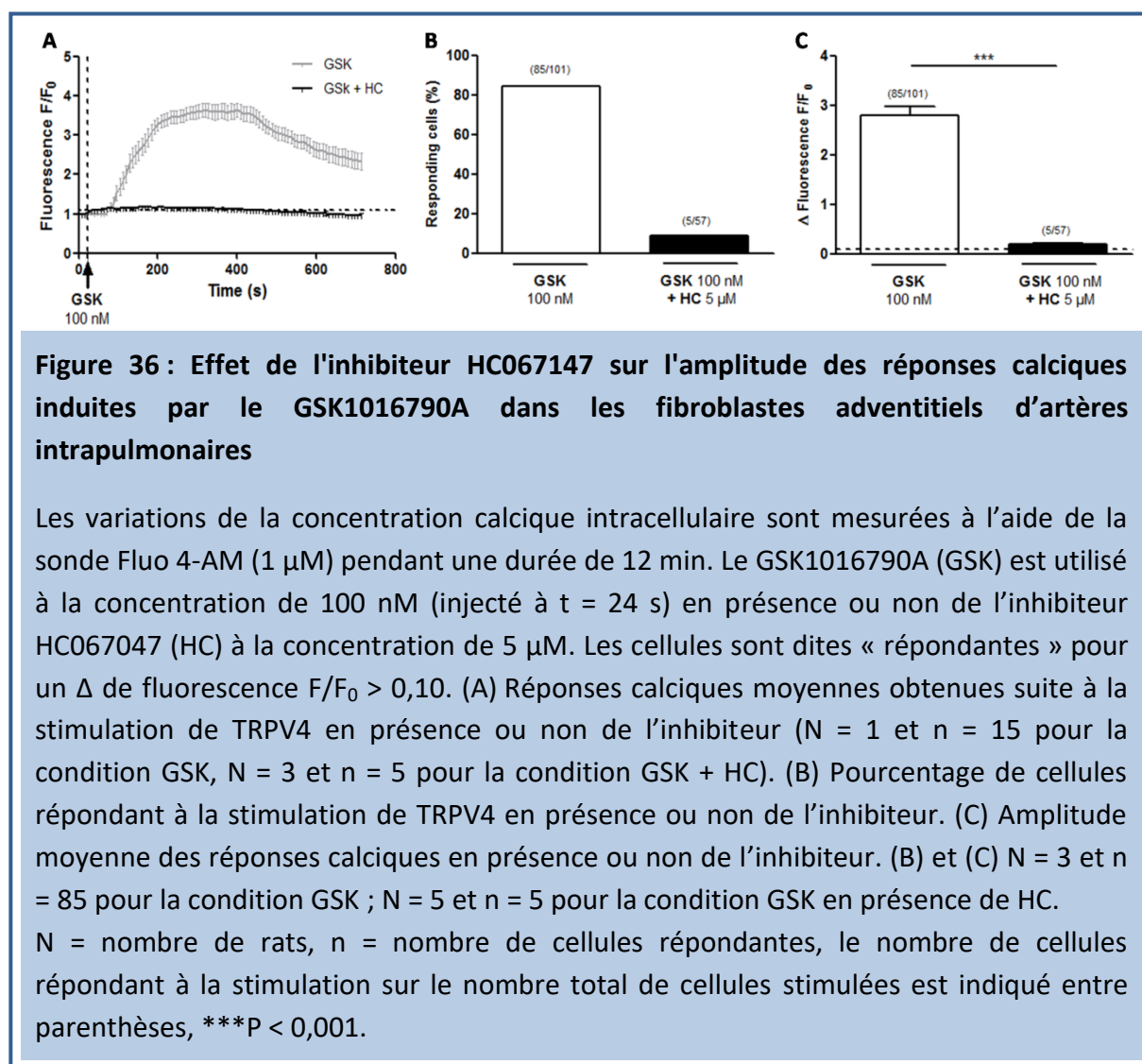
Environ 85 % des cellules testées (85 sur 101 cellules) répondent à la stimulation au GSK à 100 nM contre à peine 20 % (18 sur 101 cellules) pour l'activateur empirique le 4 α -PDD à 5 μ M (**Figure 35 B**). La réponse calcique observée pour le GSK a une amplitude de réponse moyenne plus importante que celle du 4 α -PDD (respectivement $2,80 \pm 0,18$ (n = 85 cellules) contre $0,35 \pm 0,07$ (n = 18 cellules) (**Figure 35 A et C**). La réponse au 4 α -PDD est aussi retardée par rapport au GSK (**Figure 35 A**).



A une concentration pourtant 50 fois supérieure, le 4 α -PDD révèle une efficacité et une puissance nettement inférieure au GSK. La faible puissance du 4 α -PDD par rapport au GSK a déjà été montrée par l'étude de [213]. Dans des conditions d'expérimentations similaires, ils ont montré, à l'aide d'expériences d'expression hétérologue du gène *trpv4* dans des cellules HEK, qu'une utilisation de l'activateur GSK à 10 nM suffit pour activer le canal TRPV4 contre 1 μ M pour l'activateur 4 α -PDD. De plus, le 4 α -PDD est couramment utilisé à 5 μ M alors que GSK l'est à 100 nM. Les concentrations efficaces 50 (CE50), qui correspondent à la puissance de la molécule sont généralement décrites comme aux alentours de 10 nM pour GSK contre de 0,3 μ M [240] à 1 μ M [213] pour le 4 α -PDD. Ces différences peuvent s'expliquer par le type cellulaire étudié.

En raison des réponses calciques observées pour les FAP, pour notre travail, nous utiliserons comme activateur du canal TRPV4 le GSK à 100nM.

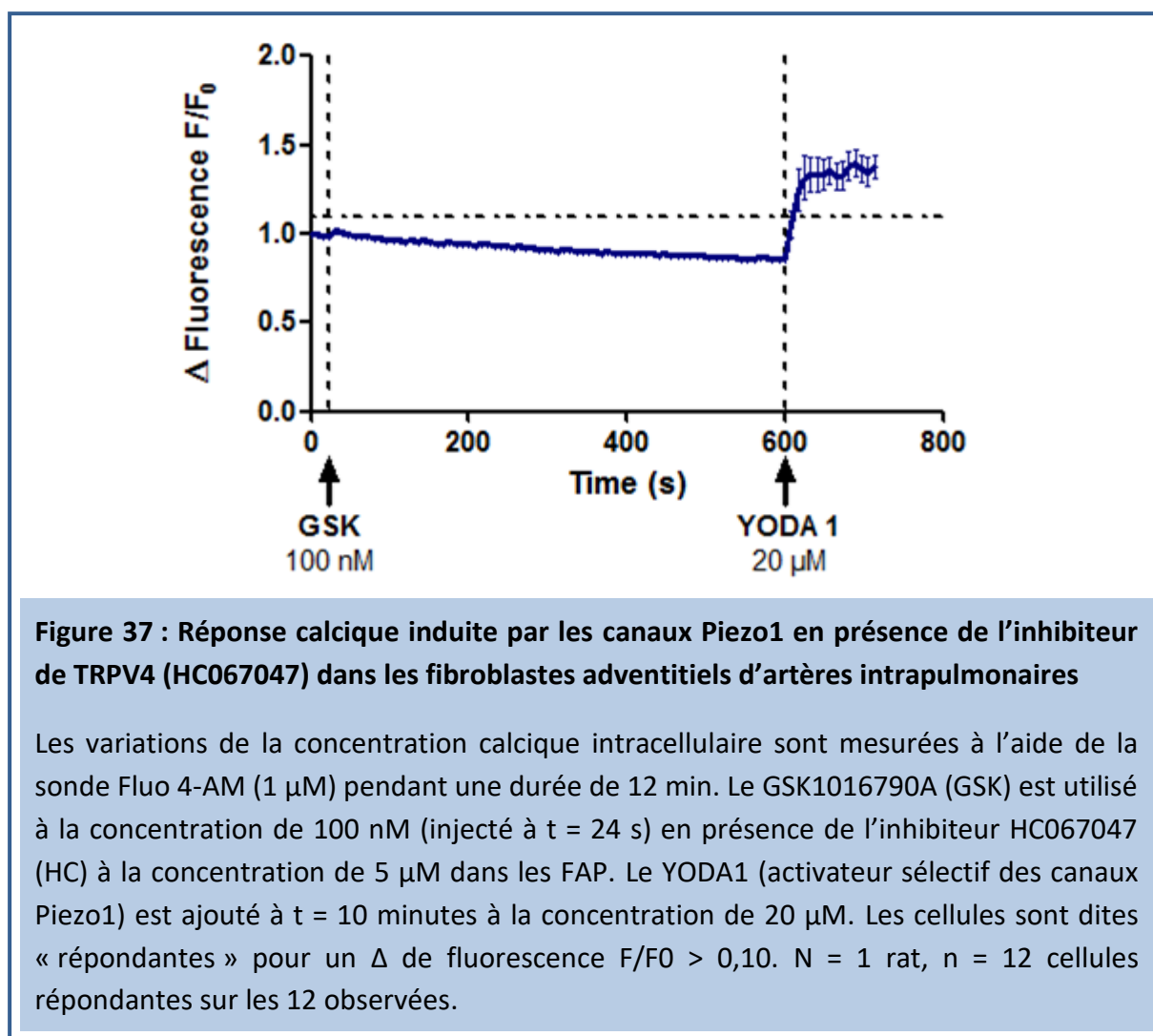
Afin de valider la sélectivité de GSK à 100 nM pour les cellules utilisées, ces expériences ont été reconduites en présence du bloqueur sélectif connu, le HC067047 à 5 μ M.



En présence du bloqueur, seules 5 cellules sur les 57 testées répondent à la stimulation par le GSK (**Figure 36 B**). Aussi, l'amplitude des quelques réponses calciques observées est particulièrement faible, proche de notre seuil limite de 0,1. En effet, elle passe de $2,8 \pm 0,18$ (n = 85) en présence de GSK à 100 nM seul à $0,19 \pm 0,01$ (n = 6) (**Figure 36 B et C**) en présence du HC à 5 μ M.

Afin de nous assurer de l'effet sélectif de l'inhibiteur sur ce canal SAC et de son innocuité cellulaire, nous avons vérifié que les cellules étaient toujours en capacité de

répondre par une augmentation de concentration calcique intracellulaire à un autre type d'activateur (**Figure 37**).



Les résultats présentés ci-dessous (**Figure 37**) montrent qu'après une incubation de 10 min avec le bloqueur HC, les cellules répondent à l'activateur, YODA1 (20 μ M), sélectif de Piezo1, un autre canal de type SAC.

L'absence de réponse du canal à l'activateur GSK à 100 nM en présence de HC à 5 μ M est bien dû au blocage du canal par celui-ci.

Le canal TRPV4 est bien fonctionnel dans les FAP, et afin de tester les conséquences de son activation, nous utiliserons pour notre travail, les agents pharmacologiques GSK et HC à respectivement 100 nM et 5 μ M.

c. Mise au point du siRNA

En complément de cette approche pharmacologique, nous avons choisi d'utiliser une approche de siRNA. La transfection de *trpv4-siRNA* permet, en inhibant l'expression du gène, de diminuer l'expression du canal à la surface des cellules et par ce fait, de limiter le déclenchement des voies de signalisation conséquentes à son ouverture.

i. Conditions expérimentales

Nous avons choisi d'utiliser un mélange de deux siRNA ciblant des régions non chevauchantes afin d'augmenter les chances d'extinction du gène. Le vecteur d'expression utilisé est un mélange de lipides cationiques et neutres qui permet une absorption efficace du siRNA et sa libération efficace dans les cellules. L'ensemble des produits utilisés provient de la société QIAGEN® (cf. page 83).

La détermination des meilleures conditions expérimentales a été réalisée en suivant les recommandations données par le fournisseur de l'ensemble des produits. Ainsi, des concentrations de 1 à 50 nM ont été testées et cela en présence d'une quantité de transfectant « Hi perfect » (QIAGEN®) allant de 1,5 à 6 % du volume total de solution de transfection. Pour des soucis de clarté, les résultats présentés, **Figure 38**, ne correspondent qu'à une partie de ces résultats, les points à 1 nM et 50 nM n'ayant pas montré de diminution de l'expression de l'ARNm au premier essai, ainsi que les points à 6 % pour le volume de transfectant, ils n'ont pas été reconduits.

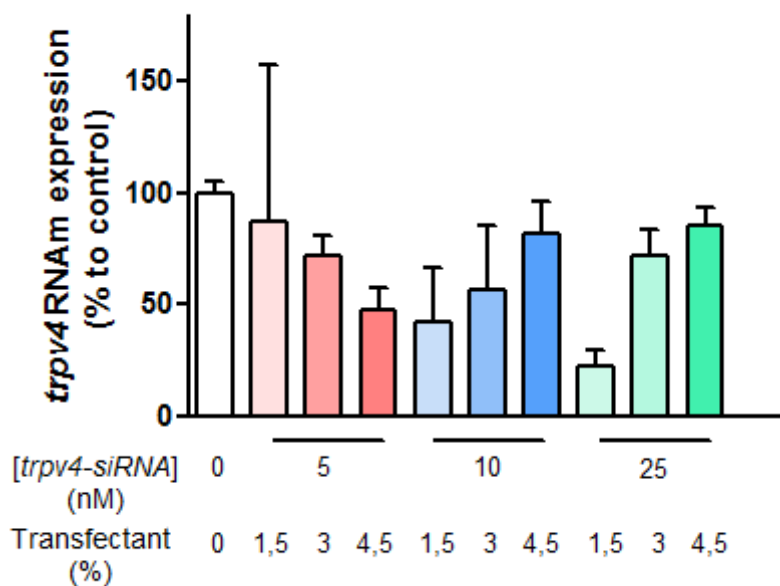


Figure 38 : Détermination des conditions optimales d’extinction de l’ARNm de *trpv4* dans les fibroblastes adventitiels d’artères intrapulmonaires

La diminution de l’expression de l’ARNm de *trpv4* est mesurée par qPCR. Le pourcentage d’expression de l’ARNm de *trpv4* est quantifié après 48 heures de transfection et rapporté à la condition contrôle sans solution de transfection après 48 heures de transfection. La quantité de transfectant est exprimée en % du volume total de la solution de transfection. N = 1 rat, expérience réalisée en triplicat.

A partir de ces résultats (**Figure 38**), nous avons sélectionné comme conditions optimales 25 nM de *trpv4-sirna* et 1,5 % de transfectant. Pour ces conditions, la diminution de l’expression de l’ARNm est de 78 ± 7 % (n = 4) par rapport au contrôle sans transfection (**Figure 39**).

Nous avons ensuite testé ces conditions avec le siRNA contrôle afin de vérifier l’effet de la solution de transfection sur les cultures (**Figure 39**). La réponse donnée atteste que les conditions expérimentales utilisées n’affectent pas l’expression basale de l’ARNm du canal TRPV4.

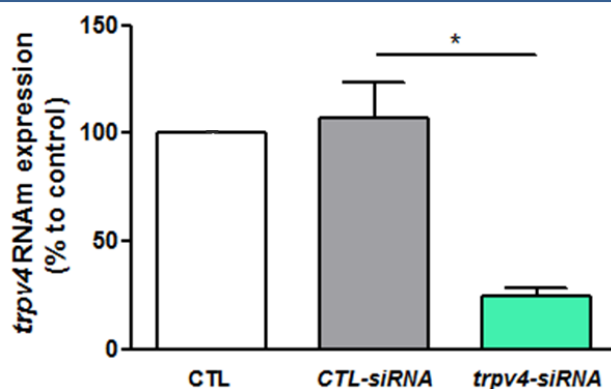


Figure 39 : Diminution de l'expression de l'ARNm de *trpv4* en présence des siRNA

La diminution de l'expression de l'ARNm de *trpv4* est mesurée par qPCR. Le pourcentage d'expression de l'ARNm de *trpv4* est quantifié après 48 h de transfection avec le siRNA contrôle (*CTL-siRNA*) et du siRNA ciblant le gène *trpv4* (*trpv4-siRNA*) et rapporté à la condition contrôle sans solution de transfection. La concentration en siRNA est de 25 nM et le volume de transfectant représente 1,5 % du volume de la solution de transfection. N = 2 rats, n = 4 expériences. *P < 0,05.

Aussi, bien que l'observation en microscopie optique des cultures de FAP ayant subi la transfection ne montrait pas un aspect pouvant laisser penser à une souffrance cellulaire (par la présence de vacuoles par exemple), nous avons réalisé un test de viabilité cellulaire afin d'accréditer cette appréciation (**Figure 40**).

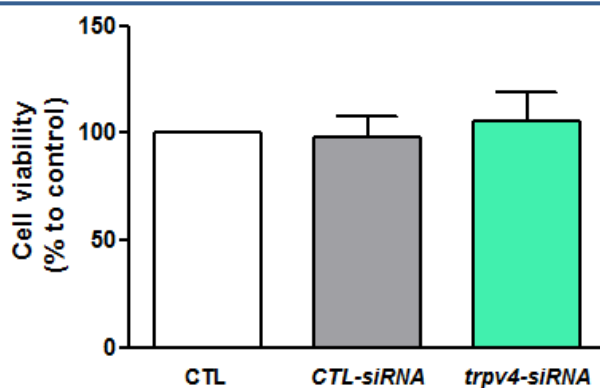


Figure 40 : Effet de la transfection avec les siRNA sur la viabilité des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

La viabilité cellulaire des FAP est évaluée par mesure de la bioréduction du sel de tétrazolium par la NAD(P)H (test WST1) pendant 2 h après 48 h de transfection. Les différentes conditions sont rapportées au contrôle sans transfection (CTL). La concentration en siRNA est de 25 nM et le volume de transfectant représente 1,5 % du volume de la solution de transfection. N = 2 rats, n = 5 expériences.

Le test de WST1 correspond à la mesure de la bioréduction du sel de tetrazolium. Cette réduction est largement dépendante de la production de NAD(P)H dans les cellules vivantes donc de l'activité métabolique des cellules. Les résultats présentés ci-dessus (**Figure 40**) nous confortent dans l'idée que la transfection des différents siRNA n'engendre pas de mortalité particulière. Les cellules transfectées avec le *CTL-siRNA* et le *trpv4-siRNA* ne présentent pas un taux de viabilité significativement différent des cellules en conditions contrôles (respectivement $98,2 \pm 9,82$ % et $105,2 \pm 12,82$ % par rapport aux cellules contrôles, n = 5) (**Figure 40**).

Nous pouvons conclure que dans les conditions déterminées, nous n'altérons pas la viabilité des cultures cellulaires de FAP, ni l'expression basale de l'ARNm de la protéine cible dans les conditions contrôles de transfection.

Nous avons ensuite confirmé que la diminution d'environ 75 % l'expression de l'ARNm *trpv4* se répercutait bien sur l'expression de la protéine. Pour cela, nous avons quantifié l'expression du canal par Western blot (**Figure 41**).

Sur 8 expériences menées, en présence du siRNA ciblant *trpv4*, l'expression de la protéine est diminuée en moyenne de $49,39 \pm 6,05$ % par rapport aux cellules contrôles non transfectées (**Figure 41**). Les cellules ayant subi la transfection par le siRNA contrôle ne montrent pas de différence d'expression de la protéine TRPV4 par rapport à ce même contrôle (**Figure 41**). Dans les conditions déterminées, l'expression du canal TRPV4 dans la cellule est bien altérée.

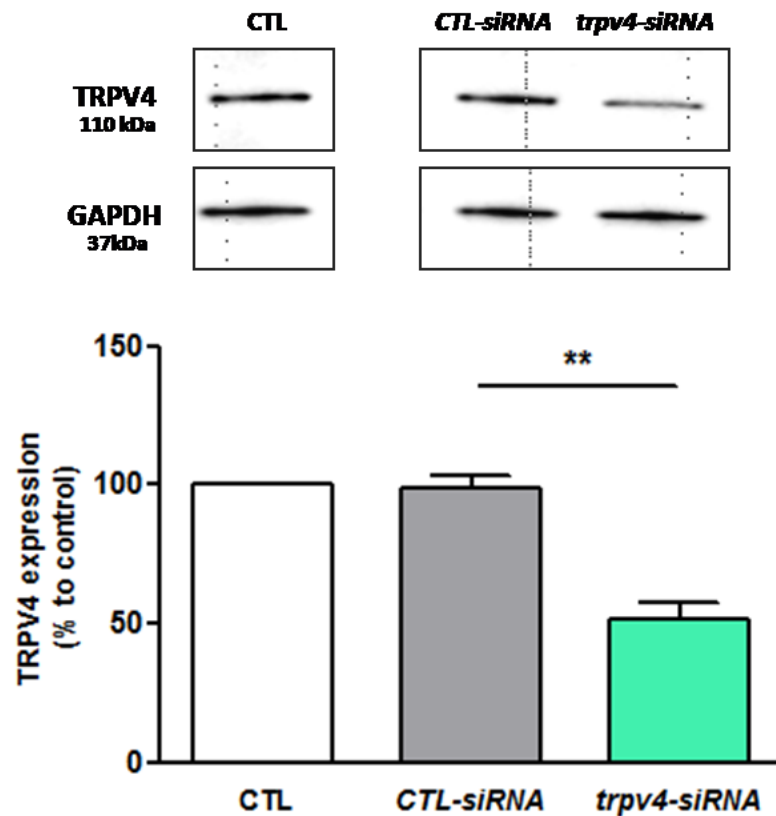


Figure 41 : Diminution de l'expression de la protéine TRPV4 dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapumonaires transfectées avec les siRNA

La quantification de l'expression de la protéine TRPV4 dans les FAP est réalisée par Western blot après 48 heures de transfection. La concentration en siRNA est de 25 nM et le volume de transfectant représente 1,5 % du volume de la solution de transfection. 30 µg de protéines par puits sont déposés. Pour chaque expérience, l'expression du canal est rapportée à la protéine contrôle GAPDH, et comparée au contrôle interne de l'expérience (FAP sans transfection, CTL). Partie supérieure, images représentatives du Western blot, la bande pour TRPV4 se situe aux alentours de 110 kDa comme indiqué par le fournisseur Abcam. Partie inférieure, quantification de l'intensité des bandes obtenues. N = 6 rats, n = 8 expériences. **P < 0,01.

ii. Fonctionnalité du canal pour les cellules transfectées

Par la suite, nous avons vérifié si cette diminution de 50 % de l'expression de la protéine était suffisante pour atténuer significativement son activité au niveau cellulaire.

En effet, pour former un canal fonctionnel, le canal TRPV4 doit s'assembler sous forme tétramérique. Ce canal peut être formé exclusivement de canaux TRPV4 (homo-tétramères) ou s'assembler avec d'autres canaux TRP (hétéro-tétramères) [166]. Une diminution de 50 % de leur expression pourrait tendre à favoriser la forme hétérotétramérique et ne pas affecter la réponse cellulaire aux stimuli du canal.

Nous avons donc réitéré les expériences d'imagerie calcique pour ces cellules dans les différentes conditions de transfection (**Figure 42**).

Les résultats présentés ci-dessus (**Figure 42**) révèlent que si la transfection de *trpv4-siRNA* ne diminue pas le pourcentage de cellules répondant au GSK (76,0 contre 74,1 % de cellules répondantes) (**Figure 42 B**) l'amplitude est significativement diminuée pour ces cellules. En effet, la variation de fluorescence passe de $2,19 \pm 0,16$ (n = 63) à $1,61 \pm 0,13$ (n = 80) (**Figure 42 A et C**). D'autre part, l'association de *trpv4-siRNA* et du bloqueur HC permet une inhibition quasi-totale des réponses calciques induites par le GSK (1 réponse cellulaire avec une amplitude de 0,15 sur 65 cellules testées) là où en présence de HC, 14 % de réponses au GSK (8 sur 57 cellules) sont obtenus avec une amplitude moyenne de $0,35 \pm 0,08$ (n = 8) (**Figure 42 A et C**).

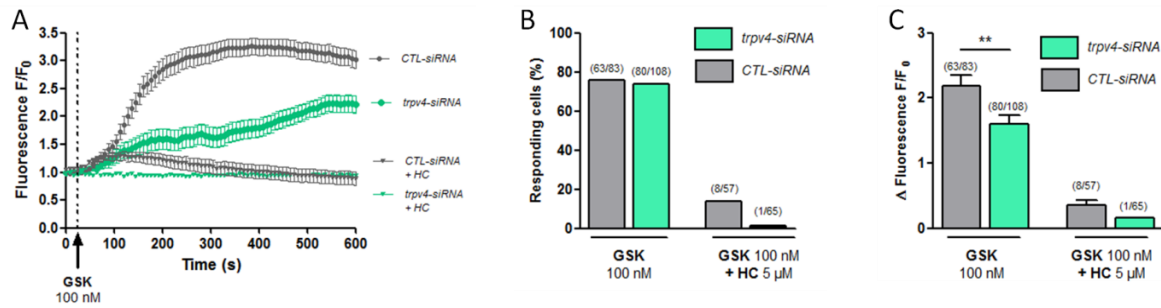


Figure 42 : Effet des siRNA sur l'amplitude des réponses calciques induites par le GSK1016790A dans les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

Les variations de la concentration calcique intracellulaire sont mesurées à l'aide de la sonde Fluo 4-AM (1 μM) pendant une durée de 12 min après 48 heures de transfection. Le GSK1016790A (GSK) est utilisé à la concentration de 100 nM (injecté à t = 24 s) en présence ou non de l'inhibiteur HC067047 (HC) à la concentration de 5 μM dans des FAP transfectés avec le *trpv4-siRNA* ou le *CTL-siRNA*. Les cellules sont dites « répondantes » pour un Δ de fluorescence F/F₀ > 0,10. (A) Réponses calciques moyennes obtenues à la stimulation de TRPV4 en présence ou non de l'inhibiteur. N = 3, n = 49 pour la condition GSK et *CTL-siRNA* ; N = 3, n = 52 pour la condition GSK et *trpv4-siRNA* ; N = 3, n = 8 pour la condition GSK en présence de HC et *CTL-siRNA* ; et N = 2, n = 1 pour la condition GSK en présence de HC et *trpv4-siRNA*. (B) Pourcentage de cellules répondant à la stimulation de TRPV4 en présence ou non de l'inhibiteur. (C) Amplitudes moyennes des réponses calciques en présence ou non de l'inhibiteur. (B) et (C) N = 3, n = 63 pour la condition GSK et *CTL-siRNA* ; N = 3, n = 80 pour la condition GSK et *trpv4-siRNA* ; N = 3, n = 8 pour la condition GSK en présence du HC et *CTL-siRNA* ; et N = 2, n = 1 pour la condition GSK en présence du HC et *trpv4-siRNA*.

N = nombre de rats, n = nombre de cellules répondantes, le nombre de cellules répondant à la stimulation sur le nombre total de cellules stimulées est indiqué entre parenthèses. **P < 0,01.

Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure quant à l'absence d'effet néfaste pour les cultures, des conditions de transfections déterminées. Nous pouvons aussi affirmer que la diminution de l'expression du canal TRPV4 liée à la transfection du *trpv4-siRNA* (diminution de 78 % de l'ARNm et de 50 % de l'expression de la protéine) est suffisante pour affecter l'activité du canal dans les FAP. Ainsi, l'approche siRNA nous permettra de confirmer le rôle de l'activité du canal dans les différents mécanismes étudiés. Pour la suite du projet, c'est une transfection de siRNA à 25 nM et 1,5 % de transfectant dans la solution de transfection finale qui sera réalisée.

3. Implication du canal TRPV4 dans les phénomènes cellulaires associés au remodelage adventitial

Le remodelage adventitial s'explique en partie par l'activation des fibroblastes, les cellules majoritairement présentes dans l'adventice. Cette activation a pour conséquence leur prolifération, leur invasion et leur migration vers les différentes tuniques qui forment l'AIP et vers les vaisseaux non muscularisés, et la surproduction de MEC qui rigidifie et augmente le volume de la MEC.

Par ce travail, nous allons évaluer le rôle du canal TRPV4 pour chacun de ces phénomènes dans la physiologie cellulaire des fibroblastes.

a. TRPV4 & prolifération

Dans l'HTP, les FAP sont les premières cellules du mur vasculaire à proliférer dans le modèle animal « hypoxie chronique » [75], [81]. Aussi, le conditionnement hypoxique des FAP active leur prolifération [9], [80], [94], [241]. Nous avons mis en évidence dans la partie 1 de ma thèse que l'expression du canal est augmentée et nécessaire au développement de l'HTP. C'est pourquoi nous avons regardé si la prolifération des FAP est médiée par l'activité du canal TRPV4 (**Figure 43**).

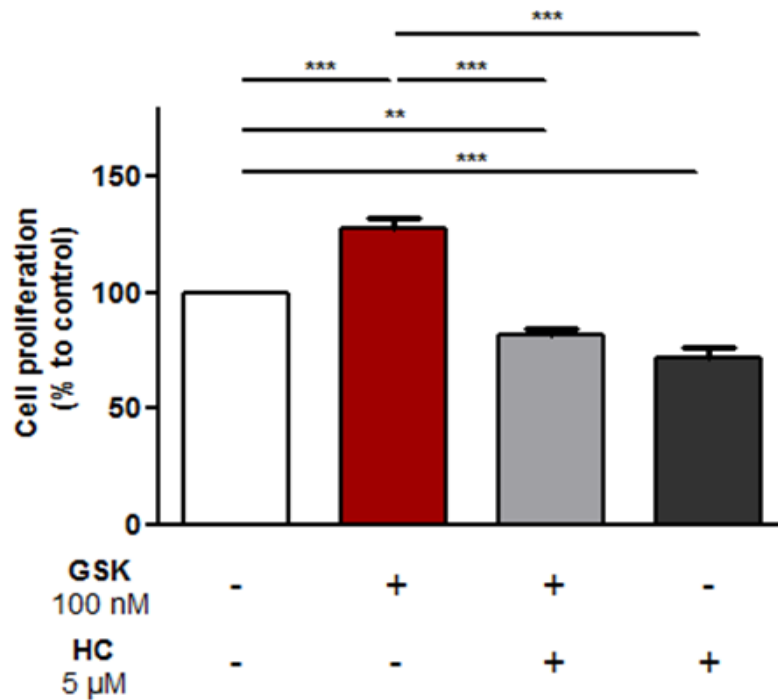


Figure 43 : Prolifération des fibroblastes adventitiels en réponse à la stimulation du canal TRPV4

La prolifération des FAP est déterminée par incorporation de BrdU au moment de la réplication de l'ADN sur une durée de 24 h. L'activateur GSK1016790A (GSK) est utilisé à la concentration de 100 nM en présence ou non de l'inhibiteur HC067047 (HC) à la concentration de 5 μM sur les FAP. N : 10 rats, n = 12 expériences, **P < 0,01 et ***P < 0,001.

Lors de l'activation du canal par le GSK à 100 nM, nous observons une augmentation de la prolifération des FAP de $27,5 \pm 2,09 \%$ (n = 12 expériences) par rapport à la condition contrôle, et ce, pour 24 heures de traitement. Cette élévation est abolie en présence du bloqueur sélectif HC à 5 μM (**Figure 43**). L'activation du canal TRPV4 permet donc la prolifération des FAP.

En présence de l'inhibiteur HC, nous constatons que la prolifération est diminuée par rapport aux conditions contrôles de $18,75 \pm 2,09 \%$ (n = 12 expériences) avec le GSK et de $28,25 \pm 4,02 \%$ (n = 12 expériences) lorsqu'il est seul (**Figure 43**). Nous avons alors vérifié que le HC n'a pas d'effet néfaste sur les cultures cellulaires.

Le test de viabilité (**Figure 44**) réalisé sur cellules en présence de l'inhibiteur ne dévoile pas de surmortalité après 24h de contact. La molécule HC bloque la prolifération basale des FAP en bloquant l'activité constitutive du canal.

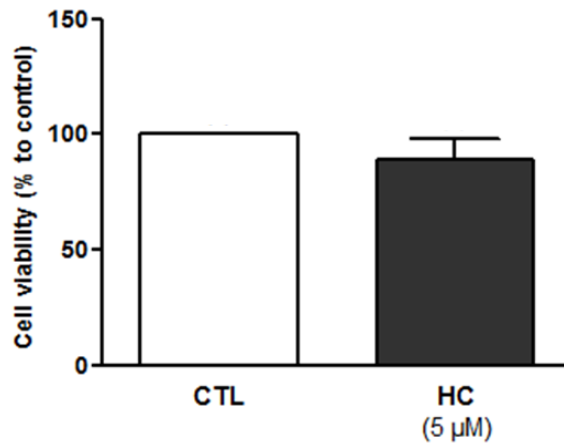


Figure 44 : Viabilité des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires en présence de l'inhibiteur HC67047

La viabilité cellulaire des FAP est évaluée par mesure de la bioréduction du sel de tétrazolium par la NAD(P)H sur une durée de 2 h après 24 h de contact avec l'inhibiteur HC67047 (HC) à la concentration de 5 μM sur les FAP, rapportée aux cellules en conditions contrôles (CTL). N : 3 rats, n = 4 expériences.

En complément de cette approche pharmacologique, nous avons eu recours à l'utilisation de siRNA ciblant le gène *trpv4*. Ainsi, nous souhaitons conforter l'idée que la prolifération cellulaire observée est bien régie par l'activation du canal TRPV4. Les conditions de transfection utilisées n'affectent pas la prolifération basale des FAP (**Figure 45**).

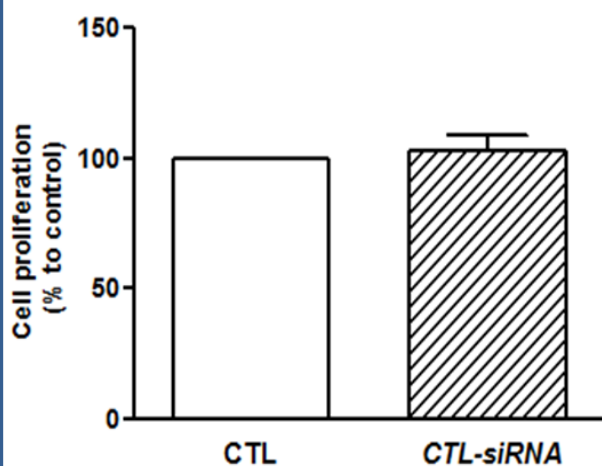
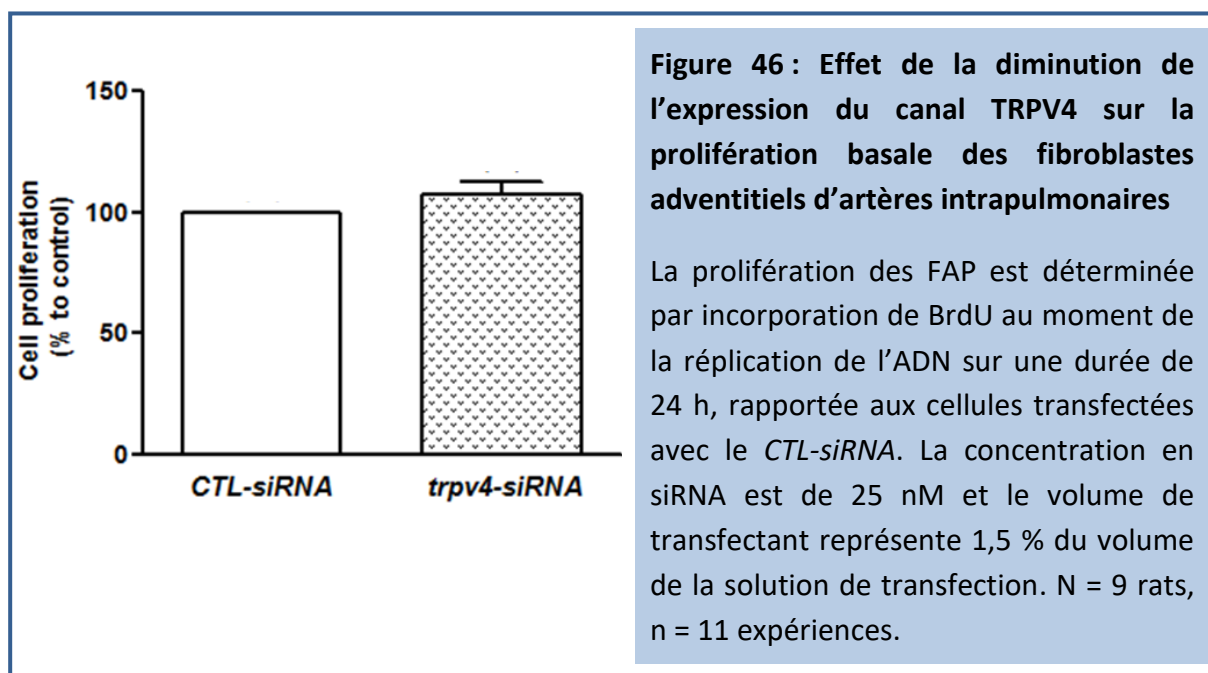


Figure 45 : Effet des conditions de transfection sur la prolifération basale des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

La prolifération des FAP est déterminée par incorporation de BrdU au moment de la réplication de l'ADN sur une durée de 24 h, rapportée aux cellules non transfectées. La concentration en siRNA est de 25 nM et le volume de transfectant représente 1,5 % du volume de la solution de transfection. N = 9 rats, n = 11 expériences.

Sur 11 expériences menées, on ne constate pas de différence significative entre les cellules non transfectées et les cellules transfectées avec le siRNA contrôle (**Figure 45**).

Aussi, la présence seule du *siRNA-trpv4*, entraînant une diminution de 50 % de l'expression du canal, n'est pas suffisante pour influencer la prolifération des fibroblastes en condition contrôle (**Figure 46**).



Comme déjà expliqué précédemment, il est possible que la diminution de l'expression du canal tend à favoriser sa forme hétérotétramérique n'affectant alors pas suffisamment la réponse du canal aux stimuli et rendant ainsi la diminution de l'expression du canal insuffisante pour l'observation d'un effet.

Cependant, lorsque TRPV4 est moins exprimé dans la cellule, la réponse proliférative des FAP à l'activateur GSK est diminuée (**Figure 47**). La prolifération cellulaire produite par GSK passe de $124,91 \pm 13,93$ % à $107,09 \pm 12,22$ % (n = 11 expériences) pour les FAP transfectées par le *trpv4-siRNA*. La prolifération n'est alors plus significativement différente du contrôle *CTL-siRNA* (**Figure 47**).

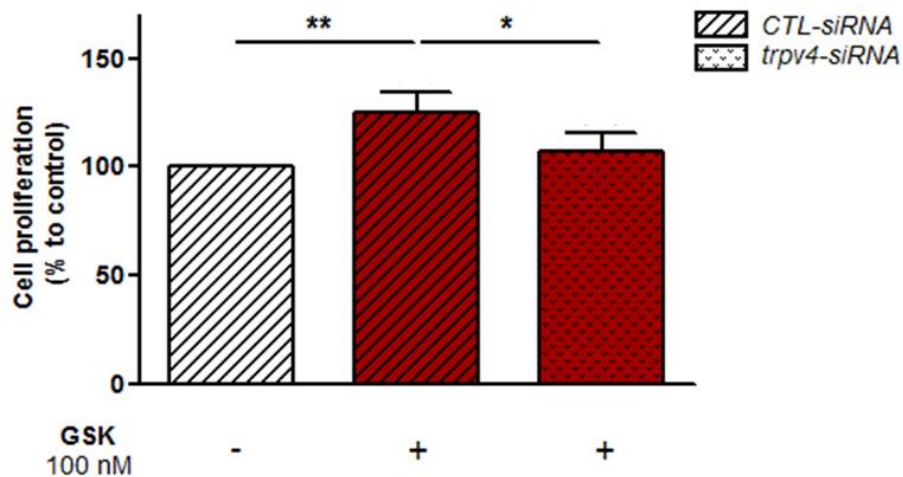


Figure 47 : Effet de la diminution de l'expression du canal TRPV4 sur la prolifération des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires induite par l'activateur GSK1016790A

La prolifération des FAP est déterminée par incorporation de BrdU au moment de la réplication de l'ADN sur une durée de 24 h, rapportée aux cellules transfectées avec le *CTL-siRNA*. L'activateur GSK1016790A (GSK) est utilisé à la concentration de 100 nM. La concentration en siRNA est de 25 nM et le volume de transfectant représente 1,5 % du volume de la solution de transfection. N = 9 rats, n = 11 expériences. *P < 0,05 et **P < 0,01.

Ainsi, nous confirmons que la réponse proliférative observée passe bien par l'activation du canal TRPV4. Le canal TRPV4 est donc impliqué dans la prolifération des FAP. L'étude de l'équipe de Chen de 2014 a montré que la sérotonine entraîne la prolifération des fibroblastes par la sécrétion de TGFβ et l'activation de sa voie canonique smad 2/3. Il est possible que le canal TRPV4 soit impliqué dans le phénomène de prolifération observé. En effet dans d'autres pathologies qui présentent un remodelage dû à l'activité des fibroblastes, il est montré que les effets de TGFβ passent en partie par l'activité du canal [227], [228], [230], [232], plus précisément, certaines de ces études suggèrent que ces effets passent par une voie non canonique de TGFβ, la voie PI3K (Phospholinoside 3-Kinase)/Akt (ou protéine kinase B) [227], [232] et non la voie smad 2/3. Dans l'HTP, les FAP sont les premières cellules du mur vasculaire à proliférer dans le modèle animal « hypoxie chronique » [7], [75] et le canal TRPV4 pourrait être un acteur important de ce phénomène.

b. TRPV4 & migration et invasion cellulaires

La migration et l'invasion cellulaires sont des processus liés, pouvant être tous deux impliqués dans le remodelage de l'AIP et à la muscularisation des artérioles. Dans les maladies vasculaires systémiques, les fibroblastes adventitiels participent au remodelage de l'artère par leur colonisation de la *media* et la formation de la *neointima* [98], [242]. Dans l'HTP, il est plus difficile de mettre en exergue ces phénomènes mais il a été montré que la sérotonine, des cytokines comme TGF β et des ROS sont capables de déclencher la migration des FAP [7], [91], [243], [244]. Le conditionnement à l'hypoxie est aussi déclencheur de la migration des FAP [241]. La migration est la capacité pour la cellule à se mouvoir sur un plan en deux dimensions. Elle nécessite un remodelage du cytosquelette d'actine, notamment via la polymérisation d'actine qui permet de créer différentes protrusions cellulaires au niveau du front de migration appelées filopodes et lamellipodes. Elle fait intervenir des facteurs chimiotactiques pouvant provenir de produits de la dégradation de la MEC, de cytokines et de facteurs de croissance. L'invasion cellulaire est liée à la migration cellulaire mais aussi à la capacité à se mouvoir à travers la MEC dans les tissus voisins. La cellule se meut alors sur un plan en 3 dimensions. L'invasion nécessite, en plus d'un mouvement cellulaire, la dégradation de l'environnement cellulaire. C'est par cette capacité de dégradation que nous allons distinguer ces deux phénomènes et y regarder l'impact du canal TRPV4.

i. La migration cellulaire

L'implication du canal TRPV4 dans la migration des CMLAP a déjà été décrite dans des conditions normoxiques comme hypoxiques [218], [219]. Son activité dans les CMLAP placées en conditions hypoxiques est amplifiée [219] montrant ainsi que ce canal peut être impliqué dans la muscularisation des artérioles au cours de l'HTP. Des études similaires n'ont jamais été réalisées pour les fibroblastes d'AIP. Afin d'explorer ce phénomène dans les FAP, nous avons réalisé une « brèche » sur un tapis cellulaire à confluence afin de créer une zone acellulaire, puis nous avons compté le nombre de cellules migrant dans cette zone (**Figure 48**).

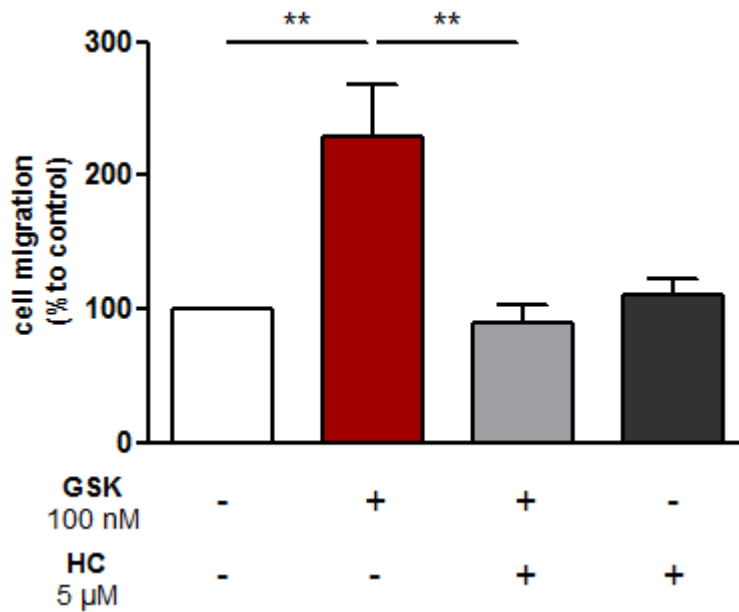


Figure 48 : Migration des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires en réponse à la stimulation du canal TRPV4

La migration des FAP est mesurée par comptage du nombre de cellules ayant migré dans la zone acellulaire après 6 h de stimulation. L'activateur GSK1016790A (GSK) est utilisé à la concentration de 100 nM en présence ou non de l'inhibiteur HC067047 (HC) à la concentration de 5 μM sur les FAP. N : 4 rats, n = 8 expériences, **P < 0,01.

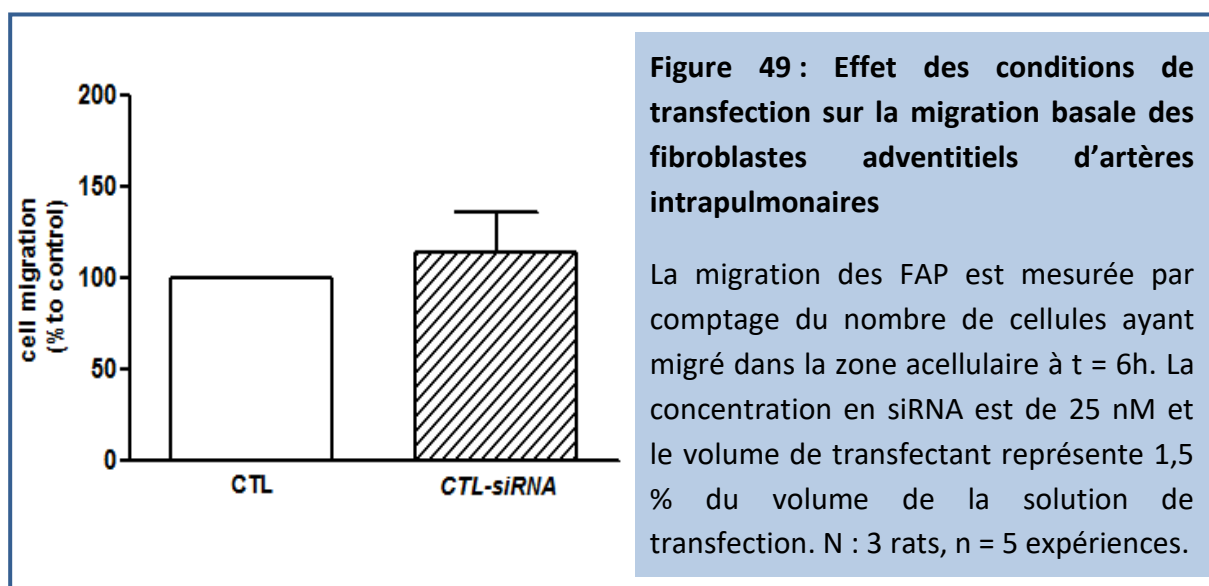
Lors de l'activation du canal par l'activateur sélectif GSK, nous observons une augmentation de la capacité à migrer des FAP de $129,68 \pm 38,31$ % (n = 8 expériences) par rapport à la condition contrôle (**Figure 48**). Cet effet est bien aboli en présence du bloqueur sélectif HC (**Figure 48**).

Afin de nous affranchir d'un éventuel effet de prolifération, la quantification du nombre de cellules ayant migré dans la zone acellulaire a été réalisée à t = 6 heures. En nous plaçant à t = 6 heures, nous confirmons que la migration observée n'est pas due à la prolifération cellulaire liée à la stimulation GSK (cf. page 133). Cette expérience a aussi été quantifiée à t = 24h et les résultats sont identiques à ceux présentés ici (données non montrées).

Le canal TRPV4 est donc impliqué dans les phénomènes migratoires des FAP.

Pour compléter cette approche pharmacologique et confirmer que le phénomène étudié est régi par l'activation du canal TRPV4, nous avons répété l'expérience sur des FAP transfectées avec le *trpv4-siRNA*.

Les conditions de transfection utilisées ne modifient pas la migration basale (CTL) (**Figure 49**) : sur 5 expériences menées, il n'est pas observé de différence significative entre les cellules non transfectées et les cellules transfectées avec le *CTL-siRNA* (**Figure 49**).



En présence de *trpv4-siRNA* (**Figure 50**), l'augmentation du nombre de cellules ayant migré dans la zone acellulaire lors de la stimulation du canal TRPV4 par l'activateur GSK passe de $119 \pm 46,69 \%$ à $46 \pm 38,98 \%$ (n = 10 expériences) (**Figure 50**).

Les FAP transfectés, qui expriment donc moins de canaux à leur surface, voient leur migration provoquée par l'activateur GSK atténuée par rapport à la condition *CTL-siRNA* (**Figure 50**). L'effet observé n'est d'ailleurs, plus significativement différent de la migration basale (*CTL-siRNA* seul).

Cette expérience nous confirme que la migration des FAP en réponse à GSK est bien provoquée par l'activation des canaux TRPV4.

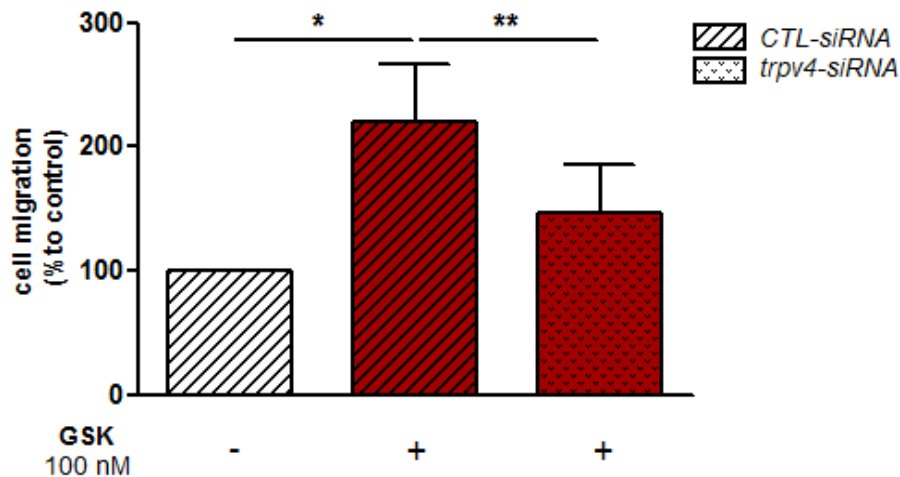


Figure 50 : Effet de la diminution de l'expression du canal TRPV4 sur la migration des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires induite par l'activateur GSK1016790A

La migration des FAP est mesurée par comptage du nombre de cellules ayant migré dans la zone acellulaire après 6 h de stimulation. L'activateur GSK1016790A (GSK) est utilisé à la concentration de 100 nM. La concentration en siRNA est de 25 nM et le volume de transfectant représente 1,5 % du volume de la solution de transfection. N = 5 rats, n = 10 expériences. *P < 0,05 et **P < 0,01.

Le canal TRPV4 est donc impliqué dans la migration des FAP.

La migration cellulaire implique des modifications de l'organisation du cytosquelette dynamiques et coordonnées. Ainsi, elle nécessite la formation de protusions cellulaires (tels que les lamellipodes et les filopodes), la formation et le dé-assemblage de sites d'adhésions focales, et la contractibilité cellulaire [245]. Il est établi que le calcium joue un rôle important dans la régulation de ces mécanismes. TRPV4 est connu pour sa liaison avec des protéines du cytosquelette comme la tubuline et l'actine [202], [246], indépendamment de son activité calcique [202]. Par cette liaison, TRPV4 stabilise la formation de microtubules. Les agents stabilisant du cytosquelette inhibent, par ailleurs, l'activité mécanosensible des SAC [247]. Le canal TRPV4 a été décrit comme en nombre dans les zones riches en actine comme les lamellipodes, les filopodes et potentiellement dans les sites d'adhésions focales [202], [246]. Le travail, réalisé par l'équipe de Goswami en 2010 [202], a aussi montré dans différents types cellulaires, que la stimulation du canal TRPV4 jouait sur la dynamique et l'organisation

du cytosquelette, avec le désassemblage des microtubules, un changement des lamellipodes en filopodes et une élongation des filopodes. Une étude menée dans le laboratoire, publiée en 2012 [218], montre, par marquage immunofluorescent, que la stimulation du canal dans les CMLAP, qui entraîne la migration des cellules, augmente aussi la densité des filaments d'actine au niveau de la périphérie cellulaire. Le réseau de microtubules apparaît lui aussi plus intense. La migration cellulaire déclenchée par l'activation de TRPV4 pourrait passer par la réorganisation du cytosquelette qui en résulte. Aussi, le calcium est nécessaire à l'activité de protéines comme les calpaines qui permettent le dé-assemblage des liaisons focales et donc la migration. La migration médiée par le canal TRPV4 pourrait aussi être liée avec l'activité de la calpaïne comme le suggère l'étude de Mrkonjić publié en 2015 [248].

ii. L'invasion cellulaire

Le processus d'invasion cellulaire des FAP est mesuré par leur capacité à dégrader la MEC. Cette dégradation est en partie réalisée par des Métalloprotéinases Matricielles (MMP) (collagénases, gélatinases) dont les gélatinases MMP2 et 9. L'expression des MMP2 et MMP9 est augmentée chez le rat atteint d'HTP suite à une pneumoectomie combiné à l'injection de MCT (un autre modèle d'HTP) [249]. Aussi, les concentrations de MMP2 et MMP9 sont augmentées dans le sérum de patient atteint d'HTP [250]–[252]. Dans les coronaires, la tunique de l'artère où elles sont les plus activées est l'adventice [253]. Les travaux de Villalta et son équipe en 2014 ont montré un lien entre l'activité du canal TRPV4 MMP2, MMP9 et MMP14 (une métalloprotéinase membranaire, appelée aussi MT1-MMP) [254]. Ils expliquent que l'activation de TRPV4 favorise l'expression de MMP2 et MMP9 sous forme active dans un modèle de lésion pulmonaire, et augmenterait ainsi la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire. Ces travaux montrent aussi que l'activation de TRPV4 dans ce modèle de lésion pulmonaire diminue l'expression de la MMP14. L'implication du canal TRPV4 dans la capacité d'invasion des FAP n'a pas encore été étudiée à ce jour. C'est pourquoi nous avons exploré son rôle sur la dégradation de gélatine.

Pour étudier ce phénomène, les FAP sontensemencées sur des lamelles « coatées » avec de la gélatine couplée à un fluorophore. Les aires de dégradation sont quantifiées après 24 heures d'incubation avec les différents agents pharmacologiques (**Figure 51**).

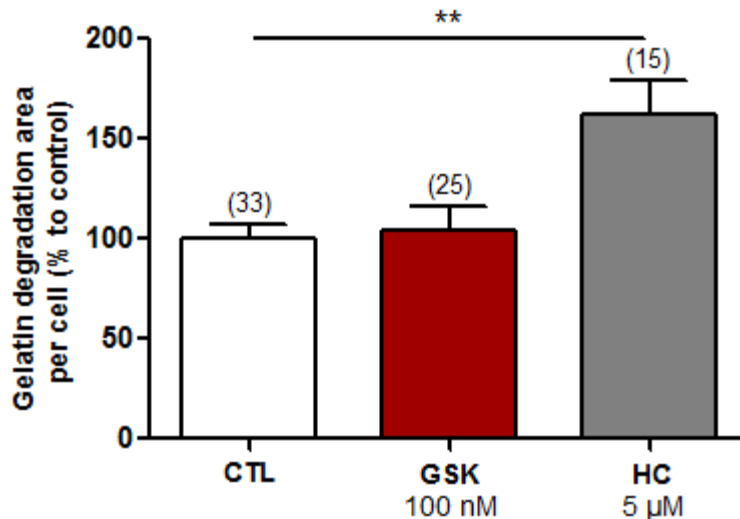
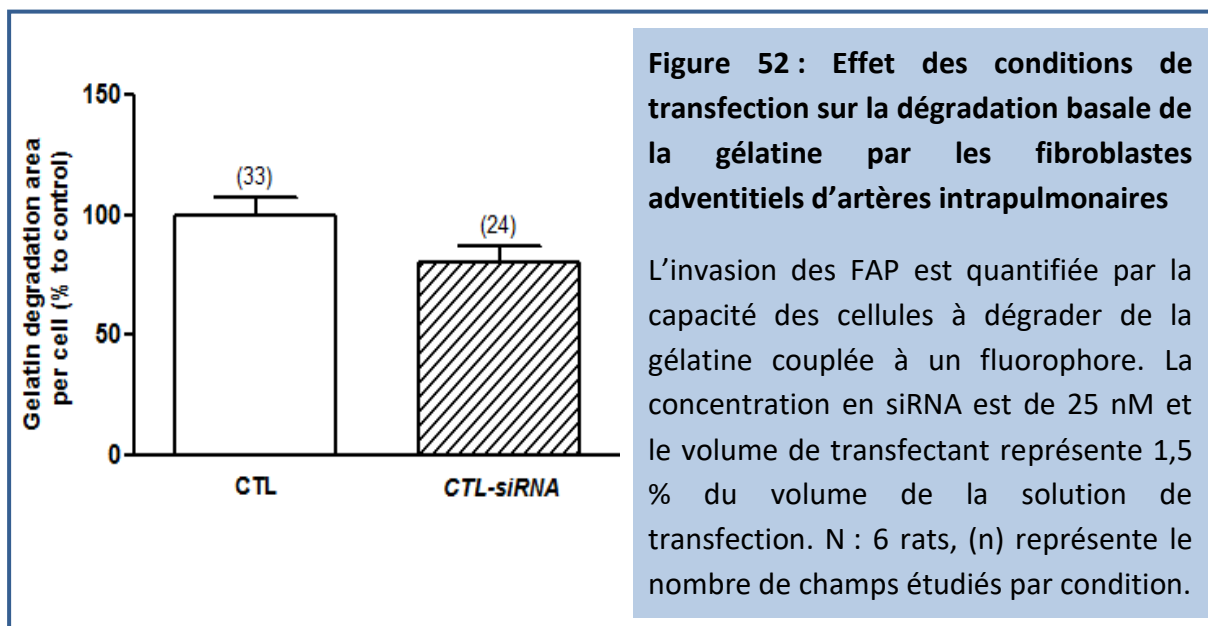


Figure 51 : Dégradation de la gélatine par les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires en réponse à la stimulation du canal TRPV4

L'invasion des FAP est quantifiée par la capacité des cellules à dégrader de la gélatine couplée à un fluorophore après 24 h d'incubation avec les différents agents pharmacologiques. L'activateur GSK1016790A (GSK) est utilisé à la concentration de 100 nM, l'inhibiteur HC067047 (HC) à la concentration de 5 μM sur les FAP. N : 6 rats, (n) représente le nombre de champs étudiés par condition, **P < 0,01.

L'activation du canal TRPV4 n'augmente pas la dégradation basale observée pour les cellules non stimulées (**Figure 51**) (pour un contrôle à $100 \pm 7 \%$, en présence de GSK le pourcentage est de 104 ± 12 (respectivement $n = 33$ et 25 champs analysés). Toutefois, lorsque le canal est bloqué par l'inhibiteur, nous observons une augmentation de $67 \pm 16 \%$ ($n=15$ champs) de la surface de dégradation de la gélatine rapportée au nombre de cellules, comparativement à la condition contrôle. Il apparaît donc qu'inhiber le canal TRPV4 amplifie « l'invasion basale » des FAP.

Afin de confirmer que l'amplification de la dégradation basale de la gélatine est bien modulée par le blocage de TRPV4, nous avons réitéré l'expérience en présence de siRNA. En premier lieu, nous vérifions que les conditions de transfection n'affectent pas la dégradation basale observée (**Figure 52**).



Les analyses des différents champs, présentées, **Figure 52**, ne montrent pas de différence significative de la dégradation de la gélatine.

En présence du *trpv4-siRNA* (**Figure 53**), la surface de gélatine dégradée par cellule augmentent de $27 \pm 9 \%$ (n = 45 champs) par rapport à la condition basale. Cette observation indique que la diminution de l'expression de la protéine TRPV4 dans les FAP amplifie elle aussi la dégradation basale de la gélatine par les FAP. Cette augmentation n'est pas significativement différente de celle observée pour les FAP en présence de l'inhibiteur HC et du *CTL-siRNA* ($45 \pm 12 \%$, n = 25 champs) (**Figure 53**). La combinaison de l'inhibiteur et du *trpv4-siRNA* amplifie davantage le phénomène, comparativement aux conditions *trpv4-siRNA* et *CTL-siRNA* en présence d'HC. La surface de dégradation observée est en effet doublée : 100 ± 17 par rapport aux FAP en conditions contrôles (**Figure 53**).

Nous confirmons donc par cette étude que le blocage du canal TRPV4 et la diminution de son expression amplifient la capacité des FAP à dégrader la gélatine et par extrapolation la MEC.

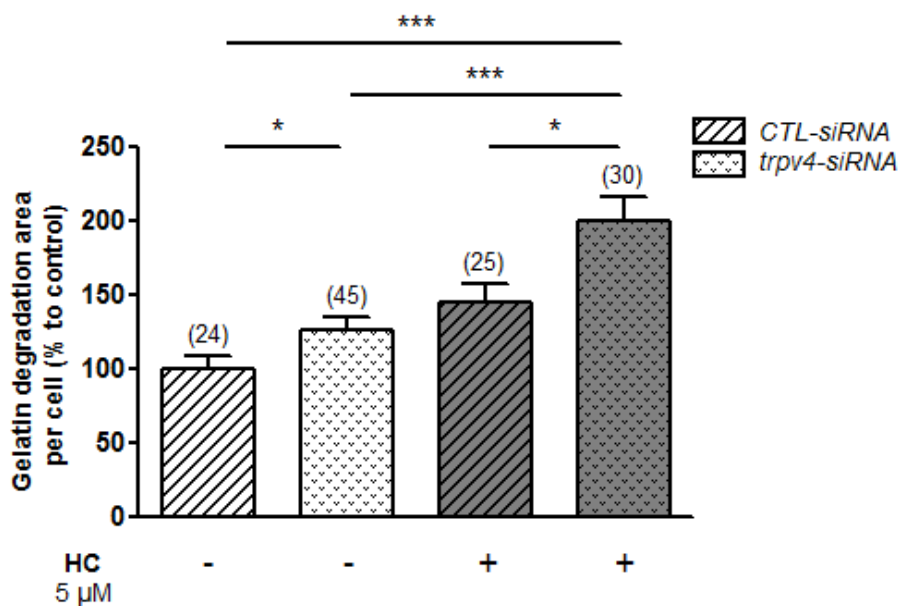


Figure 53 : Effet de la diminution de l'expression du canal TRPV4 et du blocage de l'activité du canal TRPV4 sur dégradation basale de la gélatine par les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires

L'invasion des FAP est quantifiée par la capacité des cellules à dégrader de la gélatine couplée à un fluorophore après 24 h d'incubation (ou non) avec l'inhibiteur HC067047 (HC) à la concentration de 5 μM. La concentration en siRNA est de 25 nM et le volume de transfectant représente 1,5 % du volume de la solution de transfection. N : 6 rats, (n) représente le nombre de champs étudiés par condition.

Par ce travail nous montrons que dans les FAP, l'inhibition de TRPV4 accentue la dégradation de la MEC.

Ce résultat semble en contradiction avec l'étude de l'équipe de Villalta, publiée en 2014, qui liait l'augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire à l'expression de MMP2 et 9 « actives » médiée par l'activation de TRPV4. Il existe de nombreuses MMP différentes, la famille des MMP peut être divisée en 6 sous-groupes en fonction de leur substrat protéique et de leur structure primaire. L'activité de ces MMP dans la pathologie est sujette à débat. Elle a tantôt été décrite comme protectrice [255] ou comme étant un facteur à charge [99], [100] dans le développement de l'HTP. En effet, dans le modèle « MCT » (chez le rat), il a été montré qu'inhiber l'activité des MMP limite le remodelage vasculaire [255]. Dans le modèle « hypoxie chronique » (toujours sur le rat), les

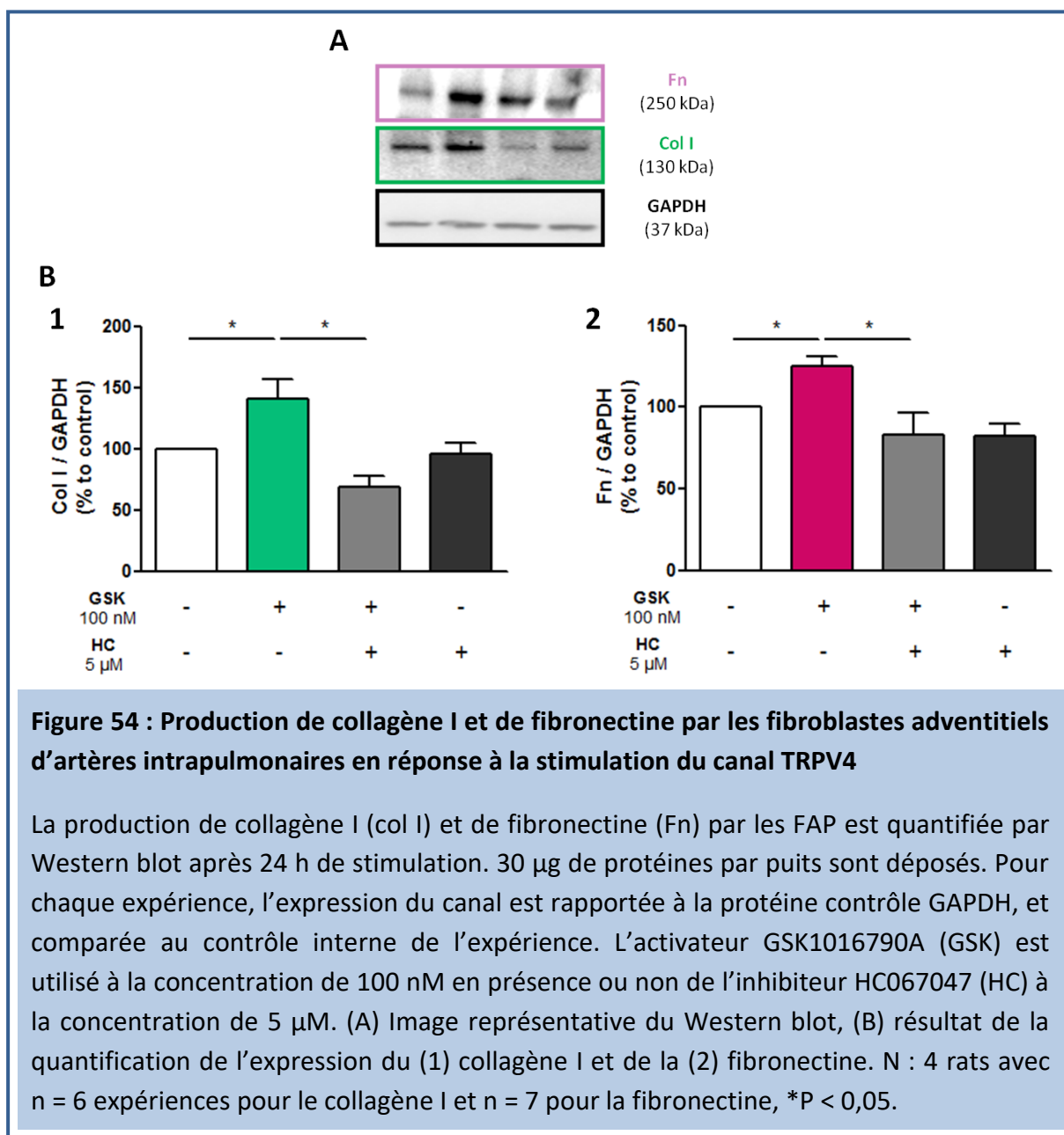
deux phénomènes ont été observés : la publication de Vieillard-Baron de 2003 a décrit une aggravation de l'HTA suite à l'inhibition des MMP alors que celle d'Herget publiée aussi en 2003 a démontré le phénomène inverse [99], [100]. Il est probable qu'il doive exister un équilibre particulier à préserver entre l'activité des différentes MMP afin d'assurer le maintien de l'intégrité vasculaire. Il n'existe que très peu d'études sur les canaux TRPV4 et les MMP. TRPV4 joue un rôle important dans l'organisation du cytosquelette. L'activation des MMP2 et 9 peut être mise en lien avec la présence à la membrane cellulaire de la MMP14. En effet, la MMP14 apparaît être un des principaux activateurs de la MMP2 [256] et un activateur de la MMP9 [257], [258]. Or, il est reconnu que le remodelage du cytosquelette d'actine est un régulateur critique de la relocalisation de cette MMP. La perturbation du cytosquelette d'actine affecte d'ailleurs l'accumulation à la surface cellulaire de la MMP14 [259], [260]. Nous pouvons donc porter l'hypothèse qu'au vu du rôle de TRPV4 sur le remodelage du cytosquelette, le blocage du canal TRPV4 pourrait moduler la localisation de la MMP14 et favoriser ainsi la dégradation de la gélatine par les gélatinases MMP2 et MMP9. Il serait intéressant de quantifier et d'étudier la localisation de la MMP14 à la membrane des FAP lors de la stimulation ou de l'inhibition du canal et d'étudier en parallèle quelle(s) MMP pourrai(en)t être responsable(s) de la dégradation observée.

c. TRPV4 & production de matrice extracellulaire

Lors de l'HTP, l'adventice s'épaissit et se rigidifie à cause notamment de l'augmentation de l'expression de protéines comme le collagène I et la fibronectine. Le collagène I est le collagène le plus abondant du corps humain. Il s'agit d'une protéine de structure inextensible. La fibronectine est une glycoprotéine de structure qui joue un rôle clé dans l'adhésion des cellules à la MEC et l'organisation du cytosquelette. Ces protéines sont synthétisées par les cellules du tissu conjonctif comme les fibroblastes, et les fibroblastes différenciés les myofibroblastes (cf. page 9). Il a déjà été montré que dans différentes fibroses et dans le remodelage bronchique, la différenciation des fibroblastes induite par TGF β et la surproduction de MEC qui en découle passent par l'activation du canal TRPV4 [227], [228], [232]. Le rôle de TRPV4 dans la production de MEC dans l'adventice n'a pas encore été étudié à ce jour. Nous avons donc par Western blot quantifié l'expression de ces deux protéines lors de la stimulation du canal TRPV4.

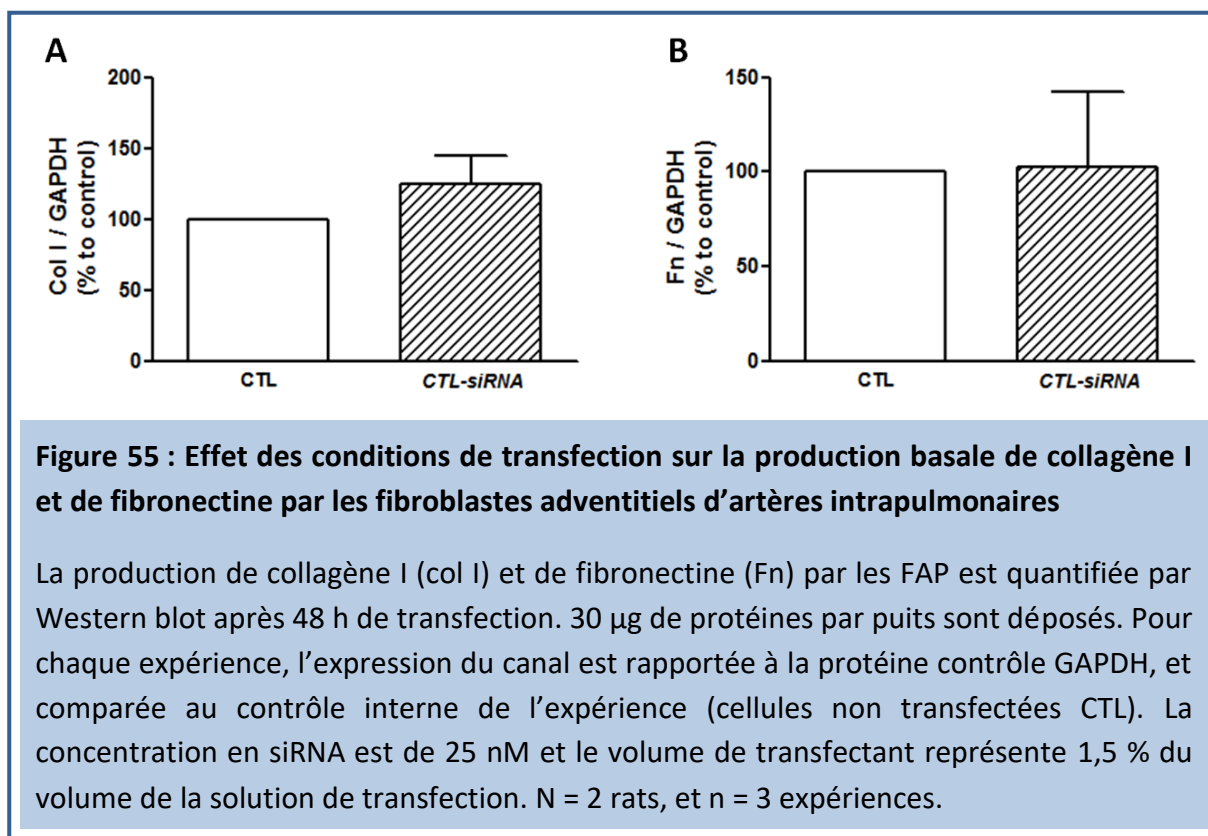
La quantification de l'expression du collagène I (**Figure 54 A et B1**) après activation du canal TRPV4 montre une augmentation d'expression de presque la moitié ($41,2 \pm 15,8$ % (n = 6)) par rapport au contrôle. Cette production stimulée par GSK est bien abolie en présence de l'inhibiteur HC dont la quantification ne révèle pas de différence d'expression par rapport au contrôle (**Figure 54 A et B1**).

De même l'expression de fibronectine (**Figure 54 A et B2**) est, elle aussi, augmentée de $25,0 \pm 5,8$ % (n=7) par l'activation du canal, et cet effet est supprimé en présence du bloqueur (pas de différence significative par rapport au contrôle).

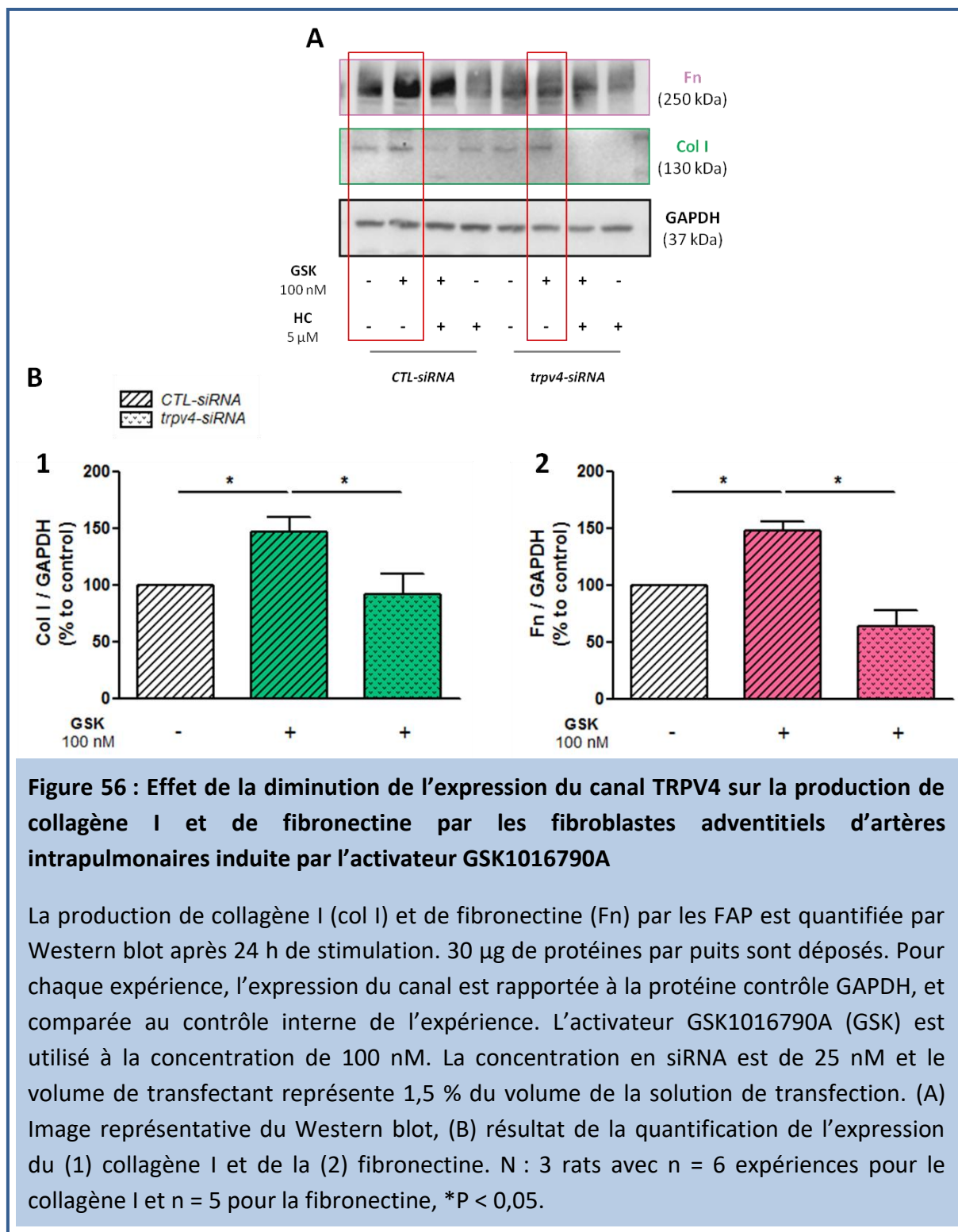


Ainsi la stimulation du canal TRPV4 dans les FAP entraîne la production de ces protéines qui composent la MEC.

Pour compléter cette approche pharmacologique, nous avons répété l'expérience sur des FAP transfectés par le *trpv4-siRNA*. Les conditions de transfection utilisées ne modifient pas la production de collagène I et de fibronectine produite par les FAP en conditions contrôles (**Figure 55**) : sur 4 expériences menées, il n'est pas observé de différence significative des quantifications réalisés sur les cellules non transfectées et les cellules transfectées avec le *CTL-siRNA*.



En revanche, l'inhibition de l'expression du canal TRPV4 dans les FAP anile la production de collagène I et de fibronectine induite par l'activateur GSK (**Figure 56**). En effet, les cellules transfectées par le *trpv4-siRNA* et stimulées par le GSK, ne surexpriment plus ces deux protéines de la MEC, contrairement aux conditions *CTL-siRNA* où nous observons une production supplémentaire de $46,2 \pm 13,0$ % (n = 6) de collagène 1 et $47,9 \pm 7,8$ % de fibronectine (n = 5) (**Figure 56**). En présence du *trpv4-siRNA*, il n'est d'ailleurs plus observé de différence par rapport à l'expression basale des FAP.



Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure quant à l'implication de TRPV4 dans la production de MEC.

En produisant le collagène I, les fibroblastes participent à l'augmentation de la rigidité de la membrane. Hors, l'augmentation de la rigidité de l'environnement cellulaire des fibroblastes influence fortement l'activité du canal TRPV4 de par leur caractère mécanosensible, et amplifie les processus cellulaires induits par TGF β telles leur différenciation en myofibroblastes et la production de protéines de la MEC [227], [228], [230], [232]. Des études montrent aussi que la fibronectine module cette différenciation cellulaire induite par TGF β [261]. Ce rôle de la fibronectine passerait en partie par son domaine EDA (Extra type III Domain A) et les interaction avec différentes intégrines et stimulerait ainsi la prolifération et la migration des fibroblastes [261]–[266]. Au vu de l'effet « positif » qu'exercent ces éléments de la MEC sur l'activité des fibroblastes et le canal TRPV4, nous pouvons suggérer que ce canal à un rôle clé dans l'entretien de la pathologie.

4. Discussion générale

Dans cette seconde partie, nous nous sommes focalisés sur les différents mécanismes cellulaires conséquents à l'activation des FAP dans l'HTP (la prolifération, la migration et l'invasion, et pour finir la production de MEC) et nous avons regardé si le canal TRPV4 était impliqué dans ces phénomènes. Le but de ce travail était de recenser par une première approche le rôle de TRPV4 dans les mécanismes cellulaires des fibroblastes. Pour ce faire, nous avons mis en place au laboratoire l'obtention des FAP. Puis nous avons vérifié qu'elles expriment bien un canal TRPV4 fonctionnel. Ensuite, nous avons mis au point une approche d'extinction de la protéine par l'utilisation de siRNA ciblant le gène *trpv4* afin de confirmer les résultats par deux démarches : une pharmacologique et une autre génétique. Une fois ces éléments mis en place, nous avons procédé aux différentes expériences permettant de mettre en exergue les fonctions de TRPV4.

Nous avons montré pour la première fois dans les FAP, que l'activation du canal TRPV4 déclenche leur prolifération et leur migration ainsi que la surproduction de fibronectine et de collagène I (des éléments de la MEC). Aussi, nous avons pu constater que l'inhibition de ce canal amplifie la dégradation basale de la MEC.

Dans l'HTP, le microenvironnement cellulaire varie. Il est observé une augmentation de facteurs de croissance, de cytokines et de ROS responsables en grande partie de l'activation des fibroblastes. De nombreuses études ont mis en évidence l'influence de TGF β , de TNF α et de ROS sur la surexpression du canal TRPV4 [238]–[240] et la potentialisation des effets de ces molécules à travers l'activité du canal. Une des cytokines particulièrement étudiées dans le contexte fibroblastes/TRPV4 est le TGF β . Le TGF β est une des principales cytokines reconnues pour sa capacité à activer les fibroblastes et entraîner leur différenciation en myofibroblastes [81], [267]. La différenciation des fibroblastes est liée à l'activité du canal TRPV4 et ne résulte pas de l'activation de la voie canonique de TGF β , smad2/3 [232], mais de la voie PI3K/Akt [227]. Les travaux de Xiazoyu Chai, publiés en 2017 [241], montre que le conditionnement hypoxique des FAP entraîne leur activation (prolifération, migration, différenciation) et ce par la voie PI3K/Akt. La voie PI3K/Akt activée par TGF β pourrait donc moduler l'activité de TRPV4 et amplifier l'ensemble des mécanismes déjà médiés par l'activité de TRPV4.

Comme déjà décrit, l'activation des FAP entraîne la surproduction d'éléments de la MEC (collagène I et fibronectine), laquelle influence la rigidité de l'adventice et l'activité des FAP entraînant ainsi un entretien des phénomènes délétères. L'activité de TRPV4, qui est un canal SAC, pourrait donc être aussi amplifiée par une boucle d'autorégulation positive due entre autres à sa propriété mécanosensible. Il est intéressant de noter que de plus en plus d'études posent la question de la rigidité de l'artère comme origine de la pathologie et non comme la conséquence [268]. Dans cette hypothèse, le rôle de TRPV4 n'en serait que plus pertinent.

Nous avons aussi constaté que bloquer l'activité du canal TRPV4 amplifie la dégradation de la gélatine. Nous avons posé l'hypothèse que cette dégradation passait par l'influence que pourrait avoir TRPV4 sur la localisation de la métalloprotéinase membranaire MMP14 de par son implication dans le remodelage du cytosquelette. La MMP14 peut aussi dégrader le collagène 1 et ainsi diminuer sa quantité dans l'adventice. Cette fonction peut être l'une des raisons de l'atténuation de la pathologie chez les animaux « knock-down ».

L'hypothèse du rôle de TRPV4 dans la migration cellulaire est aussi liée à sa capacité à réguler le cytosquelette. L'interaction TRPV4 et cytosquelette semble donc être importante pour justifier les phénomènes observés. Il serait alors très intéressant d'étudier la réponse des Rho GTPases lors de l'activation du canal. En effet, les RhoGTPases sont connues pour leur implication dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Dans le contexte de notre étude, les Rho semblant être les plus pertinentes sont la RhoA (Ras homolog gene family, member A), la cdc42 (Cell Division Control protein 42 homolog) et la Rac1 (RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1). RhoA, via l'effecteur ROCK1 (Rho-associated protein kinase), est associée à la formation des fibres de stress et au gain de contractilité des cellules. Il a déjà été montré que cette voie était impliquée dans la différenciation des fibroblastes [269], [270]. La cdc42 est connue pour son rôle dans la formation des filopodes, et la Rac 1 dans les lamellipodes. De plus, des travaux ont montré que l'activation de la voie de RhoA impactait la régulation de la MT1-MMP à la surface en augmentant son expression dans les fibroblastes cardiaques et les cellules endothéliales microvasculaires [271], [272].

Les résultats présentés dans cette seconde partie indiquent un rôle de TRPV4 dans les FAP dans l'ensemble des phénomènes retrouvés entre autres dans le remodelage adventitial présent dans l'HTP. Dans la première partie de notre travail, nous avons mis en évidence l'augmentation de l'expression du canal dans l'adventice lors de l'HTP. Pris conjointement ces résultats suggèrent que les phénomènes de remodelage observés dans l'HTP sont modulés par l'activité du canal TRPV4.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse apporte de nouveaux éléments sur le rôle et l'implication des canaux TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) dans la circulation pulmonaire, et notamment leur importance dans l'hypertension pulmonaire, une des principales pathologies de la circulation pulmonaire. L'activité de TRPV4 avait déjà été décrite dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses qui composent respectivement l'*intima* et la *media*. Pour la première fois, nous exposons le rôle de ce canal dans les fibroblastes de l'adventice d'artères intrapulmonaires et son implication dans le remodelage de cette dernière. Nous avons dans un premier temps montré que son expression dans l'adventice est augmentée dans la pathologie et que son absence impacte sur le degré de sévérité de l'atteinte, et ce, dans deux modèles animaux d'hypertension pulmonaire (« monocrotaline » et « hypoxie chronique ») correspondant aux groupes 1 et 3. Dans un second temps, l'étude du rôle de TRPV4 dans les mécanismes cellulaires des fibroblastes a montré que ce canal est impliqué dans la prolifération, la migration et l'invasion, et la production d'éléments de la matrice extracellulaire. Ces mécanismes induits lors de l'activation des fibroblastes lors de l'hypertension pulmonaire, entraînent le remodelage du tissu adventiciel et participent ainsi au développement et l'entretien de la pathologie. Selon l'hypothèse « outside-in », qui suggère que l'hypertension pulmonaire débute par une inflammation précoce et persistante au niveau de l'adventice entraînant la cascade d'événements relatifs à la pathologie dont l'atteinte des autres tuniques, le canal TRPV4 pourrait être un élément clé de ce processus.

Améliorer la compréhension de l'implication du canal TRPV4 dans le développement de la pathologie permettrait de confirmer l'hypothèse d'un rôle clé du canal dans l'hypertension pulmonaire.

Jusqu'à présent, il a été montré que TRPV4 était surexprimé dans l'artère intrapulmonaire dépourvue endothélium (mais sans distinguer la *media* de l'adventice) dès quarante-huit heures d'hypoxie chez les rats [217]. Il serait dès lors intéressant d'étudier et comparer la cinétique de son expression dans chacune de ces tuniques et ce, dans les deux modèles animaux d'hypertension pulmonaire présentés dans cette thèse. Nous pourrions ainsi apporter des arguments à l'hypothèse « outside-in » et au rôle clé du canal dans l'instauration de la pathologie.

Il serait aussi intéressant de mettre en place un « modèle cellulaire d'hypertension pulmonaire » en mimant *in vitro* les conditions pathologiques. Nous pourrions ainsi placer les fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires dans un environnement hypoxique et/ou en les soumettant à un étirement chronique (par l'utilisation du système STREX STX-140-10 (B-bridge international), disponible au laboratoire), et d'évaluer les conséquences sur le canal et ses actions cellulaires.

Il serait aussi judicieux d'apporter des éléments de réponses sur les voies de signalisation mises en jeu dans ces phénomènes. Nous avons démontré précédemment qu'il y avait un intérêt à porter plus particulièrement nos études sur l'implication de la voie PI3K/Akt, qui serait suractivée dans la pathologie (potentiellement par la surexpression de la cytokine TGF β , surexprimée dans l'hypertension pulmonaire).

Nous avons aussi montré qu'il serait intéressant de regarder si un lien existe entre le canal TRPV4 et les métalloprotéinases et plus précisément sur l'adressage à la membrane de la métalloprotéinase MMP14. Aussi, au vu de l'effet du canal sur les processus de migration et d'invasion, il faudrait regarder l'effet de l'activation du canal sur les voies de signalisation activées dans la formation des lamellipodes, des filopodes et dans la contractibilité de la cellule. La petite protéine G RhoA semble être, dans un premier temps, un candidat idéal pour débiter ces recherches. En effet, en plus d'avoir un rôle déjà connu sur la contractibilité cellulaire, des études ont montré qu'elle pourrait aussi avoir un lien avec l'adressage à la membrane de la MMP14.

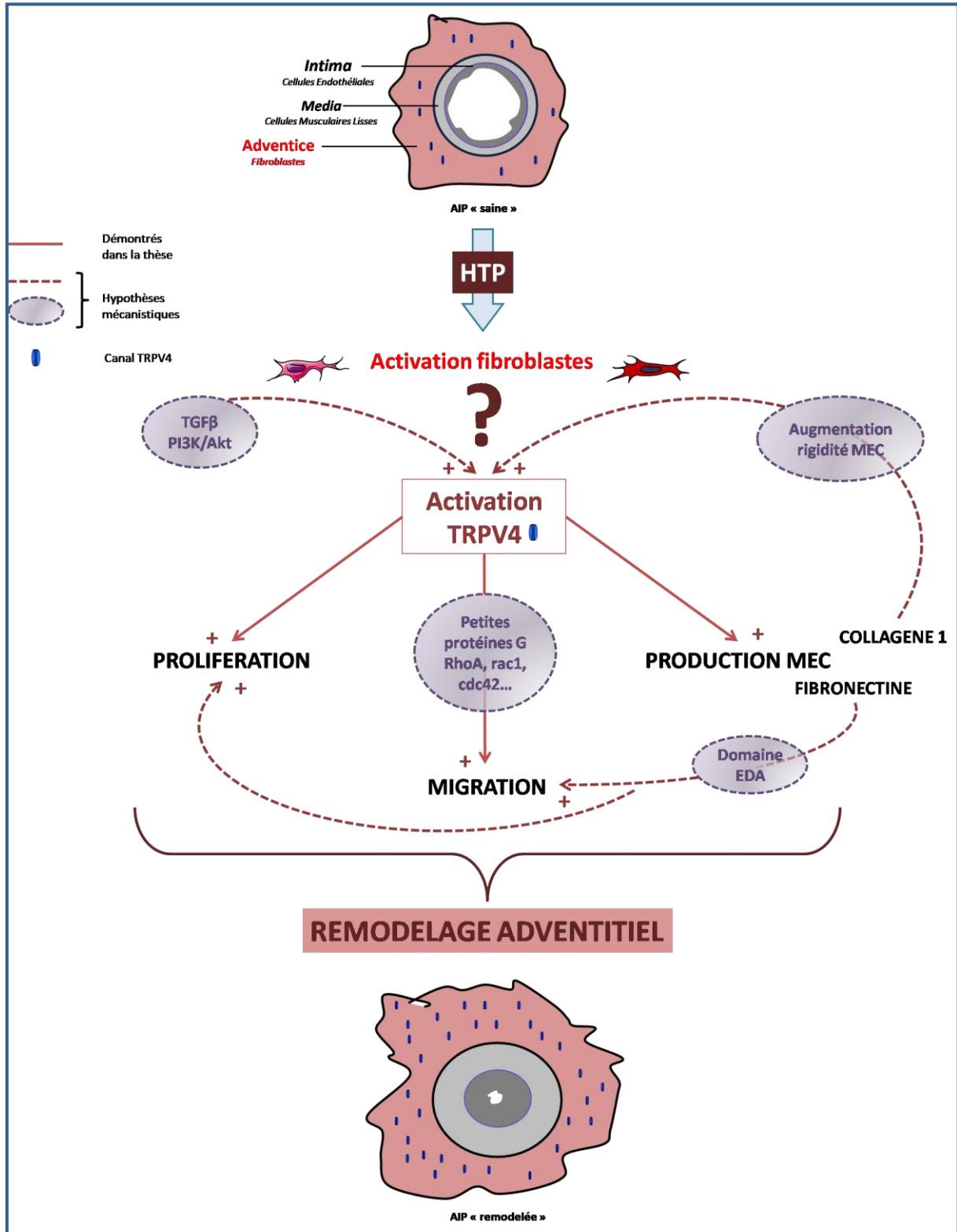
Ces dernières études pourraient être réalisées sur le modèle cellulaire d'hypertension pulmonaire explicité précédemment.

En conclusion, bien qu'il existe encore de nombreuses inconnues sur la manière de TRPV4 à jouer un rôle dans le développement de l'hypertension pulmonaire, de nombreux éléments arguent en faveur d'une grande importance de cette protéine. Nous savons aujourd'hui qu'il est impliqué au niveau du remodelage de la *media* et, grâce à ce travail, au niveau de l'adventice et des fibroblastes adventitiels d'artères intrapulmonaires.

A l'heure actuelle, il n'existe que des traitements symptomatiques pour cette pathologie, le seul traitement curatif étant la transplantation du bloc / cœur-poumons. Ces médicaments sont à prendre à vie et ont pour objectifs d'éviter l'évolution de la maladie et d'améliorer au mieux le confort des patients. L'activité du canal TRPV4 a un rôle important dans la pathologie, et ce, au niveau de la media et de l'adventice. Apporter une compréhension plus approfondie du canal pourrait donc nous apporter un nouvel axe de compréhension sur les mécanismes responsables de l'hypertension pulmonaire, et permettre ainsi le développement de nouvelles cibles thérapeutiques directes ou partenaires de l'activité du canal.

Vous retrouverez à la page suivante un schéma récapitulatif des résultats obtenus et des hypothèses posées.

Schéma bilan



BIBLIOGRAPHIE

- [1] É. Larousse, « Encyclopédie Larousse en ligne - circulation sanguine ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/circulation_sanguine/34108. [Consulté le: 10-nov-2017].
- [2] J. E. Deanfield, J. P. Halcox, et T. J. Rabelink, « Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance », *Circulation*, vol. 115, n° 10, p. 1285-1295, mars 2007.
- [3] J. Plutzky, « The vascular biology of atherosclerosis », *Am. J. Med.*, vol. 115, n° 8, Supplement 1, p. 55-61, déc. 2003.
- [4] R. F. Furchgott et P. M. Vanhoutte, « Endothelium-derived relaxing and contracting factors. », *FASEB J.*, vol. 3, n° 9, p. 2007-2018, janv. 1989.
- [5] M. Elbaz, et J.-F. ARNAL, « Dysfonction endothéliale et athérosclérose », *Réalités Cardiológicas*, mars-2006.
- [6] J. W. Han *et al.*, « Vessel Wall–Embedded Dendritic Cells Induce T-Cell Autoreactivity and Initiate Vascular Inflammation », *Circ. Res.*, vol. 102, n° 5, p. 546-553, mars 2008.
- [7] K. R. Stenmark *et al.*, « The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function », *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, p. 23-47, 2013.
- [8] F. Numano, « Vasa vasorum, vasculitis and atherosclerosis », *Int. J. Cardiol.*, vol. 75, n° Supplement 1, p. S1-S8, août 2000.
- [9] K. R. Stenmark, E. Gerasimovskaya, R. A. Nemenoff, et M. Das, « Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling », *Chest*, vol. 122, n° 6 Suppl, p. 326S-334S, déc. 2002.
- [10] J. M. Sorrell et A. I. Caplan, « Fibroblasts—a diverse population at the center of it all », *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 276, p. 161-214, 2009.
- [11] R. S. Smith, T. J. Smith, T. M. Blieden, et R. P. Phipps, « Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. », *Am. J. Pathol.*, vol. 151, n° 2, p. 317-322, août 1997.
- [12] E. Arciniegas, M. G. Frid, I. S. Douglas, et K. R. Stenmark, « Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension », *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 293, n° 1, p. L1-L8, juill. 2007.
- [13] S. Potenta, E. Zeisberg, et R. Kalluri, « The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression », *Br. J. Cancer*, vol. 99, n° 9, p. 1375-1379, nov. 2008.
- [14] D. J. Prockop, « Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues », *Science*, vol. 276, n° 5309, p. 71-74, avr. 1997.
- [15] M. Ogawa, A. C. LaRue, et C. J. Drake, « Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: its pathophysiologic implications », *Blood*, vol. 108, n° 9, p. 2893-2896, nov. 2006.
- [16] A. J. Friedenstein *et al.*, « Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method », *Exp. Hematol.*, vol. 2, n° 2, p. 83-92, 1974.
- [17] H. W. Farber et J. Loscalzo, « Pulmonary Arterial Hypertension », *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, n° 16, p. 1655-1665, oct. 2004.
- [18] N. Galiè *et al.*, « 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), Intern... », *Eur. Respir. J.*, p. ERJ-01032-2015, août 2015.
- [19] S. Miyamoto *et al.*, « Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 161, n° 2 Pt 1, p. 487-492, févr. 2000.
- [20] N. Galiè *et al.*, « Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) », *Eur. Heart J.*, vol. 30, n° 20, p. 2493-2537, oct. 2009.

- [21] G. Simonneau *et al.*, « Updated clinical classification of pulmonary hypertension », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, n° 25 Suppl, p. D34-41, déc. 2013.
- [22] M. D. McGoon *et al.*, « Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, n° 25 Suppl, p. D51-59, déc. 2013.
- [23] M. Humbert *et al.*, « Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 173, n° 9, p. 1023-1030, mai 2006.
- [24] F. Perros, M. Humbert, et S. Cohen-Kaminsky, « Hypertension artérielle pulmonaire - Un parfum d'auto-immunité », *médecine/sciences*, vol. 29, n° 6-7, p. 607-616.
- [25] M. R. Nicolls, L. Taraseviciene-Stewart, P. R. Rai, D. B. Badesch, et N. F. Voelkel, « Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective », *Eur. Respir. J.*, vol. 26, n° 6, p. 1110-1118, déc. 2005.
- [26] R. Savai *et al.*, « Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 186, n° 9, p. 897-908, nov. 2012.
- [27] M. L. Ormiston *et al.*, « Impaired natural killer cell phenotype and function in idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension », *Circulation*, vol. 126, n° 9, p. 1099-1109, août 2012.
- [28] M. Humbert *et al.*, « Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 151, n° 5, p. 1628-1631, mai 1995.
- [29] E. Soon *et al.*, « Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension », *Circulation*, vol. 122, n° 9, p. 920-927, août 2010.
- [30] T. Itoh *et al.*, « Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension », *Respirol. Carlton Vic*, vol. 11, n° 2, p. 158-163, mars 2006.
- [31] J.-L. Cracowski *et al.*, « Proinflammatory cytokine levels are linked to death in pulmonary arterial hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 43, n° 3, p. 915-917, mars 2014.
- [32] M. K. Steiner, O. L. Syrkina, N. Kolliputi, E. J. Mark, C. A. Hales, et A. B. Waxman, « Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension », *Circ. Res.*, vol. 104, n° 2, p. 236-244, 28p following 244, janv. 2009.
- [33] S. M. Golembeski, J. West, Y. Tada, et K. A. Fagan, « Interleukin-6 causes mild pulmonary hypertension and augments hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice », *Chest*, vol. 128, n° 6 Suppl, p. 572S-573S, déc. 2005.
- [34] M. Miyata, F. Sakuma, A. Yoshimura, H. Ishikawa, T. Nishimaki, et R. Kasukawa, « Pulmonary hypertension in rats. 2. Role of interleukin-6 », *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 108, n° 3, p. 287-291, nov. 1995.
- [35] L. Savale *et al.*, « Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice », *Respir. Res.*, vol. 10, n° 1, p. 6, 2009.
- [36] S. S. Sobin et P. C. Chen, « Ultrastructural changes in the pulmonary arterioles in acute hypoxic pulmonary hypertension in the rat », *High Alt. Med. Biol.*, vol. 1, n° 4, p. 311-322, 2000.
- [37] P. Dorfmueller *et al.*, « Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 165, n° 4, p. 534-539, févr. 2002.
- [38] K. Balabanian *et al.*, « CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 165, n° 10, p. 1419-1425, mai 2002.
- [39] P. Fraticelli *et al.*, « Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses », *J. Clin. Invest.*, vol. 107, n° 9, p. 1173-1181, mai 2001.
- [40] C. A. Haskell, M. D. Cleary, et I. F. Charo, « Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 15, p. 10053-10058, avr. 1999.
- [41] D. Moatti *et al.*, « Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease », *Blood*, vol. 97, n° 7, p. 1925-1928, avr. 2001.

- [42] D. H. McDermott *et al.*, « Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis », *Circ. Res.*, vol. 89, n° 5, p. 401-407, août 2001.
- [43] F. Perros *et al.*, « Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 29, n° 5, p. 937-943, mai 2007.
- [44] R. M. Tuder *et al.*, « Relevant Issues in the Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, n° 25, Supplement, p. D4-D12, déc. 2013.
- [45] K. R. Stenmark, N. J. Davie, J. T. Reeves, et M. G. Frid, « Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation », *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 98, n° 2, p. 715-721, févr. 2005.
- [46] E. Okamoto *et al.*, « Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries », *Circulation*, vol. 104, n° 18, p. 2228-2235, oct. 2001.
- [47] M. G. Frid *et al.*, « Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage », *Am. J. Pathol.*, vol. 168, n° 2, p. 659-669, févr. 2006.
- [48] M. Li *et al.*, « Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 187, n° 5, p. 2711-2722, sept. 2011.
- [49] J.-H. Wang *et al.*, « Hypoxia-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 promotes myocardial fibrosis via the TGF- β 1 signaling pathway », *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 96, n° 9, p. 1035, sept. 2016.
- [50] D. R. Dantzker et J. S. Bower, « Pulmonary vascular tone improves VA/Q matching in obliterative pulmonary hypertension », *J. Appl. Physiol.*, vol. 51, n° 3, p. 607-613, sept. 1981.
- [51] S. Duong-Quy *et al.*, « Hypertension pulmonaire : de la physiopathologie moléculaire aux anomalies hémodynamiques », *Rev. Mal. Respir.*, vol. 29, n° 8, p. 956-970, oct. 2012.
- [52] U. S. v. Euler et G. Liljestrand, « Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat », *Acta Physiol. Scand.*, vol. 12, n° 4, p. 301-320, août 1946.
- [53] M. Ozaki, C. Marshall, Y. Amaki, et B. E. Marshall, « Role of wall tension in hypoxic responses of isolated rat pulmonary arteries », *Am. J. Physiol.*, vol. 275, n° 6 Pt 1, p. L1069-1077, déc. 1998.
- [54] T. K. Jeffery et N. W. Morrell, « Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension », *Prog. Cardiovasc. Dis.*, vol. 45, n° 3, p. 173-202, déc. 2002.
- [55] P. Hervé *et al.*, « Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension », *Am. J. Med.*, vol. 99, n° 3, p. 249-254, sept. 1995.
- [56] S. Eddahibi *et al.*, « Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia », *Circulation*, vol. 113, n° 15, p. 1857-1864, avr. 2006.
- [57] M. Izikki *et al.*, « Tryptophan hydroxylase 1 knockout and tryptophan hydroxylase 2 polymorphism: effects on hypoxic pulmonary hypertension in mice », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 293, n° 4, p. L1045-1052, oct. 2007.
- [58] M. R. MacLean, G. Sweeney, M. Baird, K. M. McCulloch, M. Houslay, et I. Morecroft, « 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 119, n° 5, p. 917-930, nov. 1996.
- [59] E. D. Willers *et al.*, « Serotonin transporter polymorphisms in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 173, n° 7, p. 798-802, avr. 2006.
- [60] L. Rodat-Despoix, H. Crevel, R. Marthan, J.-P. Savineau, et C. Guibert, « Heterogeneity in 5-HT-induced contractile and proliferative responses in rat pulmonary arterial bed », *J. Vasc. Res.*, vol. 45, n° 3, p. 181-192, 2008.
- [61] L. Rodat-Despoix *et al.*, « Signalling pathways involved in the contractile response to 5-HT in the human pulmonary artery », *Eur. Respir. J.*, vol. 34, n° 6, p. 1338-1347, déc. 2009.

- [62] D. N. Cornfield, T. Stevens, I. F. McMurtry, S. H. Abman, et D. M. Rodman, « Acute hypoxia increases cytosolic calcium in fetal pulmonary artery smooth muscle cells », *Am. J. Physiol.*, vol. 265, n° 1 Pt 1, p. L53-56, juill. 1993.
- [63] L. A. Shimoda, J. S. Sham, et J. T. Sylvester, « Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung », *Physiol. Res.*, vol. 49, n° 5, p. 549-560, 2000.
- [64] L. A. Shimoda, J. T. Sylvester, et J. S. Sham, « Mobilization of intracellular Ca²⁺ by endothelin-1 in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 278, n° 1, p. L157-164, janv. 2000.
- [65] S. Bonnet, A. Belus, J. M. Hyvelin, E. Roux, R. Marthan, et J. P. Savineau, « Effect of chronic hypoxia on agonist-induced tone and calcium signaling in rat pulmonary artery », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 281, n° 1, p. L193-201, juill. 2001.
- [66] J. Wang, M. Juhaszova, L. J. Rubin, et X. J. Yuan, « Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K⁺ channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells », *J. Clin. Invest.*, vol. 100, n° 9, p. 2347-2353, nov. 1997.
- [67] X. J. Yuan, « Voltage-gated K⁺ currents regulate resting membrane potential and [Ca²⁺]_i in pulmonary arterial myocytes », *Circ. Res.*, vol. 77, n° 2, p. 370-378, août 1995.
- [68] X. J. Yuan, M. L. Tod, L. J. Rubin, et M. P. Blaustein, « Hypoxic and metabolic regulation of voltage-gated K⁺ channels in rat pulmonary artery smooth muscle cells », *Exp. Physiol.*, vol. 80, n° 5, p. 803-813, sept. 1995.
- [69] C. Guibert, R. Marthan, et J.-P. Savineau, « 5-HT induces an arachidonic acid-sensitive calcium influx in rat small intrapulmonary artery », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 286, n° 6, p. L1228-1236, juin 2004.
- [70] L. Rodat, J.-P. Savineau, R. Marthan, et C. Guibert, « Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries », *Pflugers Arch.*, vol. 454, n° 1, p. 41-51, avr. 2007.
- [71] T. Ducret, C. Guibert, R. Marthan, et J.-P. Savineau, « Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells », *Cell Calcium*, vol. 43, n° 4, p. 315-323, avr. 2008.
- [72] B. R. S. Broughton, B. R. Walker, et T. C. Resta, « Chronic hypoxia induces Rho kinase-dependent myogenic tone in small pulmonary arteries », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 294, n° 4, p. L797-806, avr. 2008.
- [73] T. Ducret, J. El Arrouchi, A. Courtois, J.-F. Quignard, R. Marthan, et J.-P. Savineau, « Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats », *Cell Calcium*, vol. 48, n° 5, p. 251-259, nov. 2010.
- [74] D. Montani *et al.*, « Pulmonary arterial hypertension », *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 8, p. 97, juill. 2013.
- [75] B. Meyrick et L. Reid, « Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall. », *Am. J. Pathol.*, vol. 96, n° 1, p. 51-70, juill. 1979.
- [76] B. O. Meyrick et L. M. Reid, « Crotalaria-induced pulmonary hypertension. Uptake of 3H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls », *Am. J. Pathol.*, vol. 106, n° 1, p. 84-94, janv. 1982.
- [77] D. Langleben, J. L. Szarek, J. T. Coflesky, R. C. Jones, L. M. Reid, et J. N. Evans, « Altered artery mechanics and structure in monocrotaline pulmonary hypertension », *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 65, n° 5, p. 2326-2331, nov. 1988.
- [78] E. C. Orton, S. M. LaRue, B. Ensley, et K. Stenmark, « Bromodeoxyuridine labeling and DNA content of pulmonary arterial medial cells from hypoxia-exposed and nonexposed healthy calves », *Am. J. Vet. Res.*, vol. 53, n° 10, p. 1925-1930, oct. 1992.
- [79] I. Chazova, J. E. Loyd, V. S. Zhdanov, J. H. Newman, Y. Belenkov, et B. Meyrick, « Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension », *Am. J. Pathol.*, vol. 146, n° 2, p. 389-397, févr. 1995.

- [80] J. K. Belknap, E. C. Orton, B. Ensley, A. Tucker, et K. R. Stenmark, « Hypoxia increases bromodeoxyuridine labeling indices in bovine neonatal pulmonary arteries », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 16, n° 4, p. 366-371, avr. 1997.
- [81] K. R. Stenmark, N. Davie, M. Frid, E. Gerasimovskaya, et M. Das, « Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling », *Physiol. Bethesda Md*, vol. 21, p. 134-145, avr. 2006.
- [82] V. V. McLaughlin, S. J. Shah, R. Souza, et M. Humbert, « Management of pulmonary arterial hypertension », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 65, n° 18, p. 1976-1997, mai 2015.
- [83] S. D. Lee, K. R. Shroyer, N. E. Markham, C. D. Cool, N. F. Voelkel, et R. M. Tuder, « Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension », *J. Clin. Invest.*, vol. 101, n° 5, p. 927-934, mars 1998.
- [84] E. Weitzenblum, A. Chaouat, et R. Kessler, « Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease », *Pneumonol. Alergol. Pol.*, vol. 81, n° 4, p. 390-398, 2013.
- [85] B. Meyrick et L. Reid, « The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study », *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 38, n° 2, p. 188-200, févr. 1978.
- [86] A. Q. Sheikh, J. K. Lighthouse, et D. M. Greif, « Recapitulation of developing artery muscularization in pulmonary hypertension », *Cell Rep.*, vol. 6, n° 5, p. 809-817, mars 2014.
- [87] F. Perros *et al.*, « Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 178, n° 1, p. 81-88, juill. 2008.
- [88] S. L. Lee, W. W. Wang, J. J. Lanzillo, et B. L. Fanburg, « Serotonin produces both hyperplasia and hypertrophy of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture », *Am. J. Physiol.*, vol. 266, n° 1 Pt 1, p. L46-52, janv. 1994.
- [89] Y. Liu, Y. J. Suzuki, R. M. Day, et B. L. Fanburg, « Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin », *Circ. Res.*, vol. 95, n° 6, p. 579-586, sept. 2004.
- [90] S. L. Lee, W. W. Wang, G. A. Finlay, et B. L. Fanburg, « Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion », *Am. J. Physiol.*, vol. 277, n° 2 Pt 1, p. L282-291, août 1999.
- [91] C. Chen *et al.*, « Serotonin drives the activation of pulmonary artery adventitial fibroblasts and TGF- β 1/Smad3-mediated fibrotic responses through 5-HT(2A) receptors », *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 397, n° 1-2, p. 267-276, déc. 2014.
- [92] M. Das, E. C. Dempsey, D. Bouchey, M. E. Reyland, et K. R. Stenmark, « Chronic hypoxia induces exaggerated growth responses in pulmonary artery adventitial fibroblasts: potential contribution of specific protein kinase c isozymes », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 22, n° 1, p. 15-25, janv. 2000.
- [93] M. Das, D. M. Bouchey, M. J. Moore, D. C. Hopkins, R. A. Nemenoff, et K. R. Stenmark, « Hypoxia-induced proliferative response of vascular adventitial fibroblasts is dependent on g protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinases », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 19, p. 15631-15640, mai 2001.
- [94] M. Das, E. C. Dempsey, J. T. Reeves, et K. R. Stenmark, « Selective expansion of fibroblast subpopulations from pulmonary artery adventitia in response to hypoxia », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 282, n° 5, p. L976-986, mai 2002.
- [95] J. M. Goffin, P. Pittet, G. Csucs, J. W. Lussi, J.-J. Meister, et B. Hinz, « Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers », *J. Cell Biol.*, vol. 172, n° 2, p. 259-268, janv. 2006.
- [96] B. S. Brooke, S. K. Karnik, et D. Y. Li, « Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal », *Trends Cell Biol.*, vol. 13, n° 1, p. 51-56, janv. 2003.
- [97] A. G. Durmowicz, E. C. Orton, et K. R. Stenmark, « Progressive loss of vasodilator responsive component of pulmonary hypertension in neonatal calves exposed to 4,570 m », *Am. J. Physiol.*, vol. 265, n° 6 Pt 2, p. H2175-2183, déc. 1993.

- [98] S. Sartore *et al.*, « Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant », *Circ. Res.*, vol. 89, n° 12, p. 1111-1121, déc. 2001.
- [99] J. Herget, J. Novotna, J. Bibova, V. Povysilova, M. Vankova, et V. Hampl, « Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 285, n° 1, p. L199-208, juill. 2003.
- [100] A. Vieillard-Baron *et al.*, « Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer limits monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling in rats », *Hum. Gene Ther.*, vol. 14, n° 9, p. 861-869, juin 2003.
- [101] P. R. Brauer, « MMPs--role in cardiovascular development and disease », *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 11, p. 447-478, janv. 2006.
- [102] W. Mitzner et E. M. Wagner, « Vascular remodeling in the circulations of the lung », *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 97, n° 5, p. 1999-2004, nov. 2004.
- [103] D. Montani *et al.*, « C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 184, n° 1, p. 116-123, juill. 2011.
- [104] N. J. Davie *et al.*, « Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 286, n° 4, p. L668-678, avr. 2004.
- [105] N. J. Davie *et al.*, « Pulmonary artery adventitial fibroblasts cooperate with vasa vasorum endothelial cells to regulate vasa vasorum neovascularization: a process mediated by hypoxia and endothelin-1 », *Am. J. Pathol.*, vol. 168, n° 6, p. 1793-1807, juin 2006.
- [106] R. Adams et E. F. Rogers, « The Structure of Monocrotaline, the Alkaloid in *Crotalaria Spectabilis* and *Crotalaria Retusa*. I », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 61, n° 10, p. 2815-2819, oct. 1939.
- [107] J. E. Estep, M. W. Lamé, D. Morin, A. D. Jones, D. W. Wilson, et H. J. Segall, « [14C]monocrotaline kinetics and metabolism in the rat », *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, vol. 19, n° 1, p. 135-139, févr. 1991.
- [108] R. Schoental et M. A. Head, « Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline », *Br. J. Cancer*, vol. 9, n° 1, p. 229-237, mars 1955.
- [109] K. S. Hilliker, T. G. Bell, et R. A. Roth, « Pneumotoxicity and thrombocytopenia after single injection of monocrotaline », *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.*, vol. 242, n° 4, p. H573-H579, avr. 1982.
- [110] B. L. Copple, P. E. Ganey, et R. A. Roth, « Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity », *Toxicology*, vol. 190, n° 3, p. 155-169, août 2003.
- [111] M. A. Hammad, M. S. Abdel-Bakky, L. A. Walker, et M. K. Ashfaq, « Oxidized low-density lipoprotein and tissue factor are involved in monocrotaline/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity », *Arch. Toxicol.*, vol. 85, n° 9, p. 1079-1089, sept. 2011.
- [112] J. M. Kay, P. Harris, et D. Heath, « Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds », *Thorax*, vol. 22, n° 2, p. 176-179, mars 1967.
- [113] J. G. Gomez-Arroyo *et al.*, « The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 302, n° 4, p. L363-369, févr. 2012.
- [114] G. Maarman, S. Lecour, G. Butrous, F. Thienemann, et K. Sliwa, « A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? », *Pulm. Circ.*, vol. 3, n° 4, p. 739-756, déc. 2013.
- [115] R. C. Baybutt *et al.*, « Effects on cytokines and histology by treatment with the ACE inhibitor captopril and the antioxidant retinoic acid in the monocrotaline model of experimentally induced lung fibrosis », *Curr. Pharm. Des.*, vol. 13, n° 13, p. 1327-1333, 2007.
- [116] F. Seta, M. Rahmani, P. V. Turner, et C. D. Funk, « Pulmonary oxidative stress is increased in cyclooxygenase-2 knockdown mice with mild pulmonary hypertension induced by monocrotaline », *PLoS One*, vol. 6, n° 8, p. e23439, 2011.

- [117] J. M. Aliotta *et al.*, « Induction of pulmonary hypertensive changes by extracellular vesicles from monocrotaline-treated mice », *Cardiovasc. Res.*, vol. 100, n° 3, p. 354-362, déc. 2013.
- [118] L. Li, C. Wei, I.-K. Kim, Y. Janssen-Heininger, et S. Gupta, « Inhibition of nuclear factor- κ B in the lungs prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice », *Hypertens. Dallas Tex 1979*, vol. 63, n° 6, p. 1260-1269, juin 2014.
- [119] B. O. Meyrick et E. A. Perkett, « The sequence of cellular and hemodynamic changes of chronic pulmonary hypertension induced by hypoxia and other stimuli », *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 140, n° 5, p. 1486-1489, nov. 1989.
- [120] D. L. Burke *et al.*, « Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 297, n° 2, p. L238-250, août 2009.
- [121] D. Heath, « The rat is a poor animal model for the study of human pulmonary hypertension », *Cardioscience*, vol. 3, n° 1, p. 1-6, mars 1992.
- [122] N. F. Voelkel et R. M. Tuder, « Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? », *J. Clin. Invest.*, vol. 106, n° 6, p. 733-738, sept. 2000.
- [123] A. Tucker, K. J. Greenlees, M. L. Wright, et N. Migally, « Altered vascular responsiveness in isolated perfused lungs from aging rats », *Exp. Lung Res.*, vol. 3, n° 1, p. 29-35, févr. 1982.
- [124] T. Sugita *et al.*, « Abnormal alveolar cells in monocrotaline induced pulmonary hypertension », *Exp. Lung Res.*, vol. 5, n° 3, p. 201-215, nov. 1983.
- [125] P. S. Tofovic, X. Zhang, et G. Petrusavska, « Progesterone inhibits vascular remodeling and attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in estrogen-deficient rats », *Prilozi*, vol. 30, n° 1, p. 25-44, juill. 2009.
- [126] Y. N. Martin et C. M. Pabelick, « Sex differences in the pulmonary circulation: implications for pulmonary hypertension », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 306, n° 9, p. H1253-1264, mai 2014.
- [127] Y. Morimatsu *et al.*, « Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension », *J. Vasc. Res.*, vol. 49, n° 1, p. 33-42, 2012.
- [128] F. Coste *et al.*, « Chronic hypoxia aggravates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: a rodent relevant model to the human severe form of the disease », *Respir. Res.*, vol. 18, n° 1, p. 47, mars 2017.
- [129] L. Taraseviciene-Stewart *et al.*, « Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 15, n° 2, p. 427-438, févr. 2001.
- [130] K. R. Stenmark, B. Meyrick, N. Galie, W. J. Mooi, et I. F. McMurtry, « Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 297, n° 6, p. L1013-1032, déc. 2009.
- [131] M. R. Nicolls *et al.*, « New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis », *Pulm. Circ.*, vol. 2, n° 4, p. 434-442, oct. 2012.
- [132] S. H. Vitali *et al.*, « The Sugén 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up », *Pulm. Circ.*, vol. 4, n° 4, p. 619-629, déc. 2014.
- [133] D. Chu *et al.*, « A new animal model for pulmonary hypertension based on the overexpression of a single gene, angiopoietin-1 », *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 77, n° 2, p. 449-456; discussion 456-457, févr. 2004.
- [134] C. Guignabert *et al.*, « Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension », *Circ. Res.*, vol. 98, n° 10, p. 1323-1330, mai 2006.
- [135] K. Sato *et al.*, « Factors influencing the idiopathic development of pulmonary hypertension in the fawn hooded rat », *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 145, n° 4 Pt 1, p. 793-797, avr. 1992.
- [136] M. R. MacLean et Y. Dempsey, « Serotonin and pulmonary hypertension—from bench to bedside? », *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 9, n° 3, p. 281-286, juin 2009.

- [137] F. C. Morin, « Ligating the ductus arteriosus before birth causes persistent pulmonary hypertension in the newborn lamb », *Pediatr. Res.*, vol. 25, n° 3, p. 245-250, mars 1989.
- [138] J. A. McQueston, J. P. Kinsella, D. D. Ivy, I. F. McMurtry, et S. H. Abman, « Chronic pulmonary hypertension in utero impairs endothelium-dependent vasodilation », *Am. J. Physiol.*, vol. 268, n° 1 Pt 2, p. H288-294, janv. 1995.
- [139] D. A. Jones, C. W. Benjamin, et D. A. Linseman, « Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades », *Mol. Pharmacol.*, vol. 48, n° 5, p. 890-896, nov. 1995.
- [140] T. Pulido *et al.*, « Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension », *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, n° 9, p. 809-818, août 2013.
- [141] O. Pauvert, C. Lugnier, T. Keravis, R. Marthan, E. Rousseau, et J. P. Savineau, « Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 139, n° 3, p. 513-522, juin 2003.
- [142] H.-A. Ghofrani, G. Simonneau, L. J. Rubin, et Authors of CHEST-1 and PATENT-1, « Riociguat for pulmonary hypertension », *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, n° 23, p. 2268, déc. 2013.
- [143] S. Eddahibi *et al.*, « Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension », *J. Clin. Invest.*, vol. 108, n° 8, p. 1141-1150, oct. 2001.
- [144] E. Marcos *et al.*, « Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia in Various Forms of Human Pulmonary Hypertension », *Circ. Res.*, vol. 94, n° 9, p. 1263-1270, mai 2004.
- [145] S. Eddahibi et S. Adnot, « [Serotonin and pulmonary arterial hypertension] », *Rev. Mal. Respir.*, vol. 23 Suppl 2, p. 4S45-4S51, avr. 2006.
- [146] J. Hu, Q. Xu, C. McTiernan, Y.-C. Lai, D. Osei-Hwedie, et M. Gladwin, « Novel Targets of Drug Treatment for Pulmonary Hypertension », *Am. J. Cardiovasc. Drugs Drugs Devices Interv.*, vol. 15, n° 4, p. 225-234, août 2015.
- [147] M. Humbert *et al.*, « Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era », *Circulation*, vol. 122, n° 2, p. 156-163, juill. 2010.
- [148] S. S. Smali *et al.*, « The role of calcium stores in apoptosis and autophagy », *Curr. Mol. Med.*, vol. 13, n° 2, p. 252-265, févr. 2013.
- [149] S. Györke et D. Terentyev, « Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease », *Cardiovasc. Res.*, vol. 77, n° 2, p. 245-255, janv. 2008.
- [150] D. Dahan, T. Ducret, J.-F. Quignard, R. Marthan, J.-P. Savineau, et E. Estève, « 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.*, vol. 303, n° 9, p. L824-833, nov. 2012.
- [151] M. Falcke, J. L. Hudson, P. Camacho, et J. D. Lechleiter, « Impact of mitochondrial Ca²⁺ cycling on pattern formation and stability », *Biophys. J.*, vol. 77, n° 1, p. 37-44, juill. 1999.
- [152] T. E. Gunter et D. R. Pfeiffer, « Mechanisms by which mitochondria transport calcium », *Am. J. Physiol.*, vol. 258, n° 5 Pt 1, p. C755-786, mai 1990.
- [153] A. Menteyne, « LE NAADP, UN MESSAGER LIBERANT DU CALCIUM: ETUDE DE L'IMPLICATION DES RESERVES ACIDES ET ROLE DE CD38 DANS LA VOIE DE SYNTHÈSE », p. 136.
- [154] D. A. Eisner et W. J. Lederer, « Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity », *Am. J. Physiol.*, vol. 248, n° 3 Pt 1, p. C189-202, mars 1985.
- [155] H.-S. Hsu *et al.*, « Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis », *Sci. Rep.*, vol. 7, oct. 2017.
- [156] F. J. Ramires, Y. Sun, et K. T. Weber, « Myocardial fibrosis associated with aldosterone or angiotensin II administration: attenuation by calcium channel blockade », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 30, n° 3, p. 475-483, mars 1998.

- [157] C. Ji, B. Yang, S.-Y. Huang, J.-W. Huang, et B. Cheng, « Salubrinal protects human skin fibroblasts against UVB-induced cell death by blocking endoplasmic reticulum (ER) stress and regulating calcium homeostasis », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 493, n° 4, p. 1371-1376, déc. 2017.
- [158] C. L. Bowman, P. A. Gottlieb, T. M. Suchyna, Y. K. Murphy, et F. Sachs, « Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: history, properties, mechanisms and pharmacology », *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicology*, vol. 49, n° 2, p. 249-270, févr. 2007.
- [159] C. Guibert, T. Ducret, et J.-P. Savineau, « Voltage-independent calcium influx in smooth muscle », *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 98, n° 1, p. 10-23, sept. 2008.
- [160] J. Kim *et al.*, « A TRPV family ion channel required for hearing in *Drosophila* », *Nature*, vol. 424, n° 6944, p. 81-84, juill. 2003.
- [161] D. P. Corey, « New TRP channels in hearing and mechanosensation », *Neuron*, vol. 39, n° 4, p. 585-588, août 2003.
- [162] B. Coste *et al.*, « Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels », *Science*, vol. 330, n° 6000, p. 55-60, oct. 2010.
- [163] L. Volkens, Y. Mechioukhi, et B. Coste, « Piezo channels: from structure to function », *Pflugers Arch.*, vol. 467, n° 1, p. 95-99, janv. 2015.
- [164] S. N. Bagriantsev, E. O. Gracheva, et P. G. Gallagher, « Piezo Proteins: Regulators of Mechanosensation and Other Cellular Processes », *J. Biol. Chem.*, vol. 289, n° 46, p. 31673-31681, nov. 2014.
- [165] D. J. Cosens et A. Manning, « Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant », *Nature*, vol. 224, n° 5216, p. 285-287, oct. 1969.
- [166] S. F. Pedersen, G. Owsianik, et B. Nilius, « TRP channels: an overview », *Cell Calcium*, vol. 38, n° 3-4, p. 233-252, oct. 2005.
- [167] C.-L. Huang, « The transient receptor potential superfamily of ion channels », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 15, n° 7, p. 1690-1699, juill. 2004.
- [168] G. Owsianik, K. Talavera, T. Voets, et B. Nilius, « Permeation and selectivity of TRP channels », *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 68, p. 685-717, 2006.
- [169] T. Voets, A. Janssens, G. Droogmans, et B. Nilius, « Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 15, p. 15223-15230, avr. 2004.
- [170] M. Mulier, J. Vriens, et T. Voets, « TRP channel pores and local calcium signals », *Cell Calcium*, vol. 66, p. 19-24, sept. 2017.
- [171] D. E. Clapham, « TRP channels as cellular sensors », *Nature*, vol. 426, n° 6966, p. 517-524, déc. 2003.
- [172] C. Ferrandiz-Huertas, S. Mathivanan, C. J. Wolf, I. Devesa, et A. Ferrer-Montiel, « Trafficking of ThermoTRP Channels », *Membranes*, vol. 4, n° 3, p. 525-564, août 2014.
- [173] A. Dietrich, M. Mederos y Schnitzler, J. Emmel, H. Kalwa, T. Hofmann, et T. Gudermann, « N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 48, p. 47842-47852, nov. 2003.
- [174] D. G. Welsh, A. D. Morielli, M. T. Nelson, et J. E. Brayden, « Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries », *Circ. Res.*, vol. 90, n° 3, p. 248-250, févr. 2002.
- [175] R. G. O'Neil et S. Heller, « The mechanosensitive nature of TRPV channels », *Pflugers Arch.*, vol. 451, n° 1, p. 193-203, oct. 2005.
- [176] K. S. Kindt *et al.*, « *Caenorhabditis elegans* TRPA-1 functions in mechanosensation », *Nat. Neurosci.*, vol. 10, n° 5, p. 568-577, mai 2007.
- [177] R. Sharif-Naeini *et al.*, « TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial myogenic response », *Pflugers Arch.*, vol. 456, n° 3, p. 529-540, juin 2008.
- [178] R. Inoue, Z. Jian, et Y. Kawarabayashi, « Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology », *Pharmacol. Ther.*, vol. 123, n° 3, p. 371-385, sept. 2009.

- [179] J. Du, X. Ma, B. Shen, Y. Huang, L. Birnbaumer, et X. Yao, « TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 28, n° 11, p. 4677-4685, nov. 2014.
- [180] W. Liedtke et J. M. Friedman, « Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 23, p. 13698-13703, nov. 2003.
- [181] M. Arniges, J. M. Fernández-Fernández, N. Albrecht, M. Schaefer, et M. A. Valverde, « Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 3, p. 1580-1586, janv. 2006.
- [182] W. Everaerts, B. Nilius, et G. Owsianik, « The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease », *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 103, n° 1, p. 2-17, sept. 2010.
- [183] I. M. Lorenzo, W. Liedtke, M. J. Sanderson, et M. A. Valverde, « TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, n° 34, p. 12611-12616, août 2008.
- [184] W. Tian *et al.*, « Renal expression of osmotically responsive cation channel TRPV4 is restricted to water-impermeant nephron segments », *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 287, n° 1, p. F17-24, juill. 2004.
- [185] B. Nilius, J. Vriens, J. Prenen, G. Droogmans, et T. Voets, « TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity », *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 286, n° 2, p. C195-205, févr. 2004.
- [186] W. Liedtke *et al.*, « Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor », *Cell*, vol. 103, n° 3, p. 525-535, oct. 2000.
- [187] N. Hellwig, N. Albrecht, C. Harteneck, G. Schultz, et M. Schaefer, « Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits », *J Cell Sci*, vol. 118, n° 5, p. 917-928, mars 2005.
- [188] R. Strotmann, G. Schultz, et T. D. Plant, « Ca²⁺-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal calmodulin binding site », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 29, p. 26541-26549, juill. 2003.
- [189] N. García-Sanz *et al.*, « Identification of a Tetramerization Domain in the C Terminus of the Vanilloid Receptor », *J. Neurosci.*, vol. 24, n° 23, p. 5307-5314, juin 2004.
- [190] J. Vriens, H. Watanabe, A. Janssens, G. Droogmans, T. Voets, et B. Nilius, « Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, n° 1, p. 396-401, janv. 2004.
- [191] P. K. Randhawa et A. S. Jaggi, « TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 110, n° 6, p. 54, nov. 2015.
- [192] R. Strotmann, C. Harteneck, K. Nunnenmacher, G. Schultz, et T. D. Plant, « OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity », *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, n° 10, p. 695-702, oct. 2000.
- [193] T. D. Plant et R. Strotmann, « TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation », in *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, W. B. Liedtke et S. Heller, Éd. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2007.
- [194] A. Mizuno, N. Matsumoto, M. Imai, et M. Suzuki, « Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4 », *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 285, n° 1, p. C96-101, juill. 2003.
- [195] J. Vriens *et al.*, « Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium », *Circ. Res.*, vol. 97, n° 9, p. 908-915, oct. 2005.
- [196] E. K. Hoffmann, I. H. Lambert, et S. F. Pedersen, « Physiology of cell volume regulation in vertebrates », *Physiol. Rev.*, vol. 89, n° 1, p. 193-277, janv. 2009.
- [197] W. G. Darby, M. S. Grace, S. Baratchi, et P. McIntyre, « Modulation of TRPV4 by diverse mechanisms », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 78, p. 217-228, sept. 2016.
- [198] W. Liedtke, D. M. Tobin, C. I. Bargmann, et J. M. Friedman, « Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans* », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100 Suppl 2, p. 14531-14536, nov. 2003.

- [199] S. Baratchi *et al.*, « Examination of the role of transient receptor potential vanilloid type 4 in endothelial responses to shear forces », *Biomicrofluidics*, vol. 8, n° 4, p. 044117, juill. 2014.
- [200] S. Baratchi, J. G. Almazi, W. Darby, F. J. Tovar-Lopez, A. Mitchell, et P. McIntyre, « Shear stress mediates exocytosis of functional TRPV4 channels in endothelial cells », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 73, n° 3, p. 649-666, févr. 2016.
- [201] V. Hartmannsgruber *et al.*, « Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression », *PLoS One*, vol. 2, n° 9, p. e827, sept. 2007.
- [202] C. Goswami, J. Kuhn, P. A. Heppenstall, et T. Hucho, « Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells », *PLoS One*, vol. 5, n° 7, p. e11654, juill. 2010.
- [203] N. M. Goldenberg, L. Wang, H. Ranke, W. Liedtke, A. Tabuchi, et W. M. Kuebler, « TRPV4 Is Required for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction », *Anesthesiology*, vol. 122, n° 6, p. 1338-1348, juin 2015.
- [204] S. Goedicke-Fritz *et al.*, « Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/K(Ca) in caveolae of endothelial cells », *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 94, n° 7-9, p. 391-400, sept. 2015.
- [205] D. W. Haack, J. H. Abel, et R. S. Jaenke, « Effects of hypoxia on the distribution of calcium in arterial smooth muscle cells of rats and swine », *Cell Tissue Res.*, vol. 157, n° 1, p. 125-140, 1975.
- [206] N. L. Boyd *et al.*, « Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 285, n° 3, p. H1113-1122, sept. 2003.
- [207] V. Rizzo, C. Morton, N. DePaola, J. E. Schnitzer, et P. F. Davies, « Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 285, n° 4, p. H1720-1729, oct. 2003.
- [208] J. Yu *et al.*, « Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels », *J. Clin. Invest.*, vol. 116, n° 5, p. 1284-1291, mai 2006.
- [209] L. Kozera, E. White, et S. Calaghan, « Caveolae act as membrane reserves which limit mechanosensitive I(Cl,swell) channel activation during swelling in the rat ventricular myocyte », *PLoS One*, vol. 4, n° 12, p. e8312, déc. 2009.
- [210] R. G. Parton et M. A. del Pozo, « Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, n° 2, p. 98-112, févr. 2013.
- [211] A. D. Güler, H. Lee, T. Iida, I. Shimizu, M. Tominaga, et M. Caterina, « Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4 », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 22, n° 15, p. 6408-6414, août 2002.
- [212] H. Watanabe, J. Vriens, S. H. Suh, C. D. Benham, G. Droogmans, et B. Nilius, « Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 49, p. 47044-47051, déc. 2002.
- [213] K. S. Thorneloe *et al.*, « N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[2,4-Dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxypropanoyl]-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a Novel and Potent Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel Agonist Induces Urinary Bladder Contraction and Hyperactivity: Part I », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 326, n° 2, p. 432-442, août 2008.
- [214] H. Watanabe, J. Vriens, A. Janssens, R. Wondergem, G. Droogmans, et B. Nilius, « Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca²⁺ », *Cell Calcium*, vol. 33, n° 5-6, p. 489-495, juin 2003.
- [215] X.-R. Yang, M.-J. Lin, L. S. McIntosh, et J. S. K. Sham, « 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.*, vol. 290, n° 6, p. L1267-1276, juin 2006.

- [216] S. V. Sukumaran *et al.*, « TRPV4 channel activation leads to endothelium-dependent relaxation mediated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat pulmonary artery », *Pharmacol. Res.*, vol. 78, p. 18-27, déc. 2013.
- [217] X.-R. Yang *et al.*, « Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 302, n° 6, p. L555-568, mars 2012.
- [218] E. Martin *et al.*, « Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells », *Pflugers Arch.*, vol. 464, n° 3, p. 261-272, sept. 2012.
- [219] T. Parpaite *et al.*, « Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells », *Pflugers Arch.*, vol. 468, n° 1, p. 111-130, janv. 2016.
- [220] Y. Xia *et al.*, « TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension », *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 305, n° 7, p. C704-715, oct. 2013.
- [221] S. A. Mendoza *et al.*, « TRPV4-mediated endothelial Ca²⁺ influx and vasodilation in response to shear stress », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 298, n° 2, p. H466-476, févr. 2010.
- [222] S. K. Sonkusare *et al.*, « Elementary Ca²⁺ signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function », *Science*, vol. 336, n° 6081, p. 597-601, mai 2012.
- [223] P. Bagher, T. Beleznai, Y. Kansui, R. Mitchell, C. J. Garland, et K. A. Dora, « Low intravascular pressure activates endothelial cell TRPV4 channels, local Ca²⁺ events, and IKCa channels, reducing arteriolar tone », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, n° 44, p. 18174-18179, oct. 2012.
- [224] C. Marziano, K. Hong, E. L. Cope, M. I. Kotlikoff, B. E. Isakson, et S. K. Sonkusare, « Nitric Oxide-Dependent Feedback Loop Regulates Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Channel Cooperativity and Endothelial Function in Small Pulmonary Arteries », *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 6, n° 12, déc. 2017.
- [225] N. Hatano, Y. Itoh, et K. Muraki, « Cardiac fibroblasts have functional TRPV4 activated by 4 α -phorbol 12,13-didecanoate », *Life Sci.*, vol. 85, n° 23-26, p. 808-814, déc. 2009.
- [226] M. Rahman, S. Mukherjee, W. Sheng, B. Nilius, et L. J. Janssen, « Electrophysiological characterization of voltage-dependent calcium currents and TRPV4 currents in human pulmonary fibroblasts », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 310, n° 7, p. L603-614, avr. 2016.
- [227] F. Gombedza *et al.*, « Mechanosensitive transient receptor potential vanilloid 4 regulates Dermatophagoides farinae-induced airway remodeling via 2 distinct pathways modulating matrix synthesis and degradation », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 31, n° 4, p. 1556-1570, avr. 2017.
- [228] S. Sharma *et al.*, « TRPV4 ion channel is a novel regulator of dermal myofibroblast differentiation », *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 312, n° 5, p. C562-C572, mai 2017.
- [229] L. Zhan et J. Li, « The role of TRPV4 in fibrosis », *Gene*, nov. 2017.
- [230] R. K. Adapala *et al.*, « TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 54, p. 45-52, janv. 2013.
- [231] C. K. Thodeti, S. Paruchuri, et J. G. Meszaros, « A TRP to cardiac fibroblast differentiation », *Channels Austin Tex*, vol. 7, n° 3, p. 211-214, juin 2013.
- [232] S. O. Rahaman *et al.*, « TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 124, n° 12, p. 5225-5238, déc. 2014.
- [233] G. Marsboom *et al.*, « Aberrant caveolin-1-mediated Smad signaling and proliferation identified by analysis of adenine 474 deletion mutation (c.474delA) in patient fibroblasts: a new perspective on the mechanism of pulmonary hypertension », *Mol. Biol. Cell*, vol. 28, n° 9, p. 1177-1185, mai 2017.
- [234] G. Gilbert, T. Ducret, J.-P. Savineau, R. Marthan, et J.-F. Quignard, « Caveolae are involved in mechanotransduction during pulmonary hypertension », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 310, n° 11, p. L1078-L1087, juin 2016.

- [235] M. Billaud, D. Dahan, R. Marthan, J.-P. Savineau, et C. Guibert, « Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension », *Respir. Res.*, vol. 12, p. 30, mars 2011.
- [236] S. Wu *et al.*, « Ca²⁺ entry via alpha1G and TRPV4 channels differentially regulates surface expression of P-selectin and barrier integrity in pulmonary capillary endothelium », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 297, n° 4, p. L650-657, oct. 2009.
- [237] L. Qin *et al.*, « Pulmonary hypertension is ameliorated in mice deficient in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 8, n° 4, p. 808-816, avr. 2010.
- [238] M. Y. Kochukov *et al.*, « Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) enhances functional thermal and chemical responses of TRP cation channels in human synoviocytes », *Mol. Pain*, vol. 5, p. 49, août 2009.
- [239] K. Suresh *et al.*, « Reactive oxygen species induced Ca²⁺ influx via TRPV4 and microvascular endothelial dysfunction in the SU5416/hypoxia model of pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 314, n° 5, p. L893-L907, mai 2018.
- [240] H. Watanabe *et al.*, « Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 16, p. 13569-13577, avr. 2002.
- [241] X. Chai, D. Sun, Q. Han, L. Yi, Y. Wu, et X. Liu, « Hypoxia induces pulmonary arterial fibroblast proliferation, migration, differentiation and vascular remodeling via the PI3K/Akt/p70S6K signaling pathway », *Int. J. Mol. Med.*, vol. 41, n° 5, p. 2461-2472, mai 2018.
- [242] G. Li, S. J. Chen, S. Oparil, Y. F. Chen, et J. A. Thompson, « Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries », *Circulation*, vol. 101, n° 12, p. 1362-1365, mars 2000.
- [243] S. A. Barman et D. Fulton, « Adventitial Fibroblast Nox4 Expression and ROS Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 967, p. 1-11, 2017.
- [244] D. J. R. Fulton *et al.*, « Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Development of Pulmonary Hypertension », *Antioxid. Basel Switz.*, vol. 6, n° 3, juill. 2017.
- [245] A. J. Ridley *et al.*, « Cell migration: integrating signals from front to back », *Science*, vol. 302, n° 5651, p. 1704-1709, déc. 2003.
- [246] R. Ramadass, D. Becker, M. Jendrach, et J. Bereiter-Hahn, « Spectrally and spatially resolved fluorescence lifetime imaging in living cells: TRPV4-microfilament interactions », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 463, n° 1, p. 27-36, juill. 2007.
- [247] L. Piao, W.-K. Ho, et Y. E. Earm, « Actin filaments regulate the stretch sensitivity of large-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary artery smooth muscle cells », *Pflugers Arch.*, vol. 446, n° 5, p. 523-528, août 2003.
- [248] S. Mrkonjić *et al.*, « TRPV4 participates in the establishment of trailing adhesions and directional persistence of migrating cells », *Pflugers Arch.*, vol. 467, n° 10, p. 2107-2119, oct. 2015.
- [249] X. M. Wang *et al.*, « Effects of angiotensin II intervention on MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and collagen expression in rats with pulmonary hypertension », *Genet. Mol. Res. GMR*, vol. 14, n° 1, p. 1707-1717, mars 2015.
- [250] C. Schumann *et al.*, « Circulating biomarkers of tissue remodelling in pulmonary hypertension », *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.*, vol. 15, n° 6, p. 523-532, sept. 2010.
- [251] Z. Safdar *et al.*, « Circulating collagen biomarkers as indicators of disease severity in pulmonary arterial hypertension », *JACC Heart Fail.*, vol. 2, n° 4, p. 412-421, août 2014.
- [252] V. Wetzl *et al.*, « Plasma MMP2/TIMP4 Ratio at Follow-up Assessment Predicts Disease Progression of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension », *Lung*, vol. 195, n° 4, p. 489-496, août 2017.
- [253] Y. Shi, S. Patel, R. Niculescu, W. Chung, P. Desrochers, et A. Zalewski, « Role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the regulation of coronary cell migration », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 19, n° 5, p. 1150-1155, mai 1999.

- [254] P. C. Villalta, P. Rocic, et M. I. Townsley, « Role of MMP2 and MMP9 in TRPV4-induced lung injury », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 307, n° 8, p. L652-659, oct. 2014.
- [255] A. Vieillard-Baron *et al.*, « Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rats », *Circ. Res.*, vol. 87, n° 5, p. 418-425, sept. 2000.
- [256] S. Zucker, D. Pei, J. Cao, et C. Lopez-Otin, « Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP) », *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 54, p. 1-74, 2003.
- [257] M. Toth, I. Chvyrkova, M. M. Bernardo, S. Hernandez-Barrantes, et R. Fridman, « Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 308, n° 2, p. 386-395, août 2003.
- [258] Y. Seomun, J.-T. Kim, et C.-K. Joo, « MMP-14 mediated MMP-9 expression is involved in TGF-beta1-induced keratinocyte migration », *J. Cell. Biochem.*, vol. 104, n° 3, p. 934-941, juin 2008.
- [259] E. S. Clark, A. S. Whigham, W. G. Yarbrough, et A. M. Weaver, « Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 9, p. 4227-4235, mai 2007.
- [260] N. Bilyug, « Matrix metalloproteinases: an emerging role in regulation of actin microfilament system », *Biomol. Concepts*, vol. 7, n° 5-6, p. 321-329, déc. 2016.
- [261] J. Wang, H. Chen, A. Seth, et C. A. McCulloch, « Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 285, n° 5, p. H1871-1881, nov. 2003.
- [262] G. Serini *et al.*, « The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1 », *J. Cell Biol.*, vol. 142, n° 3, p. 873-881, août 1998.
- [263] A. Desmoulière, C. Chaponnier, et G. Gabbiani, « Tissue repair, contraction, and the myofibroblast », *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.*, vol. 13, n° 1, p. 7-12, févr. 2005.
- [264] A. F. Muro *et al.*, « An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 177, n° 6, p. 638-645, mars 2008.
- [265] M. Leiss, K. Beckmann, A. Girós, M. Costell, et R. Fässler, « The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, n° 5, p. 502-507, oct. 2008.
- [266] M. Kohan, A. F. Muro, E. S. White, et N. Berkman, « EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to alpha4beta7 integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 24, n° 11, p. 4503-4512, nov. 2010.
- [267] J. Malmström *et al.*, « Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus », *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 3, n° 5, p. 466-477, mai 2004.
- [268] W. Tan, K. Madhavan, K. S. Hunter, D. Park, et K. R. Stenmark, « Vascular stiffening in pulmonary hypertension: cause or consequence? (2013 Grover Conference series) », *Pulm. Circ.*, vol. 4, n° 4, p. 560-580, déc. 2014.
- [269] Y.-L. Hu, Z. Liu, D.-K. Jiao, T. Ma, C.-Y. Wang, et C.-Y. Jia, « [The effect of RhoA/Rho kinase signal pathway on TGF-beta1-induced phenotypic differentiation of human dermal fibroblasts] », *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi Zhonghua Zhengxing Waiké Zazhi Chin. J. Plast. Surg.*, vol. 27, n° 5, p. 376-380, sept. 2011.
- [270] Y. Zhou *et al.*, « Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis », *J. Clin. Invest.*, vol. 123, n° 3, p. 1096-1108, mars 2013.
- [271] K. Schram, R. Ganguly, E. K. No, X. Fang, F. S. L. Thong, et G. Sweeney, « Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by leptin in cardiac fibroblasts involves Rho/ROCK-dependent actin cytoskeletal reorganization and leads to enhanced cell migration », *Endocrinology*, vol. 152, n° 5, p. 2037-2047, mai 2011.

- [272] E. Ispanovic, D. Serio, et T. L. Haas, « Cdc42 and RhoA have opposing roles in regulating membrane type 1-matrix metalloproteinase localization and matrix metalloproteinase-2 activation », *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 295, n^o 3, p. C600-610, sept. 2008.

ANNEXES

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

M. Reille-Seroussi, Gaucher JF., L-A Cussac, I. Broutin, M. Vidal, S. Broussy, **VEGFR1 domain 2 covalent labeling with horseradish peroxidase: development of a displacement assay on VEGF**, *Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Sciences*,. 2017 Aug 1;530:107-112. doi: 10.1016

G. Gilbert, A. Courtois., M. Dubois, L-A Cussac, T. Ducret, P. Lory, R. Marthan, J-P. Savineau, J-F. Quignard, **T-type voltage gated calcium channels are involved in endothelium-dependent relaxation of mice pulmonary artery**, *Biochemical Pharmacology*, 2017 Aug 15;138:61-72. doi: 10.1016

COMMUNICATIONS

CONGRES NATIONAUX

L-A. Cussac, J-F Quignard, P. Robillard, C. Guibert, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret, **Implication of TRPV4 channel in the adventitial structural changes of intrapulmonary artery during pulmonary hypertension**. Congrès des canaux ioniques, 10 -13 septembre 2017, Sètes (France). (Affichée).

L-A. Cussac, N. Tiruchellvam Pillai, P. Robillard, J-F. Quignard, C. Guibert, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret, **TRPV4-induced structural changes in the adventitia of intrapulmonary artery**. Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), 6 -7 avril 2017, Nantes (France). (Orale et affichée)

JOURNEES SCIENTIFIQUES

L-A. Cussac, J-F Quignard, P. Robillard, C. Guibert, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret, **Implication of TRPV4 channel in the adventitial structural changes of intrapulmonary artery during pulmonary hypertension**. . Journée scientifique de la FR Tecsan (Technologies pour la Santé), 15 mai 2018, Pessac (France). (Affichée)

L-A. Cussac, J-F Quignard, P. Robillard, C. Guibert, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret, **Implication of TRPV4 channel in the adventitial structural changes of intrapulmonary artery during pulmonary hypertension**. Journée scientifique de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé de Bordeaux, 18 avril 2018, Talence (France). (Affichée)

L-A. Cussac, N. Tiruchellvam Pillai, P. Robillard, J-F. Quignard, C. Guibert, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret, **TRPV4-induced structural changes in the adventitia of intrapulmonary artery**. Journée scientifique de la FR Tecsac (Technologies pour la Santé), 22 juin 2017, Pessac (France). (Affichée)

L-A. Cussac, N. Tiruchellvam Pillai, P. Robillard, J-F. Quignard, C. Guibert, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret, **TRPV4-induced structural changes in the adventitia of intrapulmonary artery**. Young Scientist Symposium (YSS), Pessac 33600, 18-19 mai 2017, Talence. (France) (Affichée)

L-A. Cussac, N. Tiruchellvam Pillai, P. Robillard, J-F. Quignard, C. Guibert, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret, **TRPV4-induced structural changes in the adventitia of intrapulmonary artery**. Journée scientifique de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé de Bordeaux, 12 avril 2017, Talence. (France) (Affichée)

L-A. Cussac, P. Robillard, T. Parpaite, J-P. Savineau, C. Guibert, R. Marthan and T. Ducret, **Characterization and functionality of TRPV4 channels in rat intrapulmonary artery adventitial fibroblasts**. Journée scientifique de la FR Tecsac (Technologies pour la Santé), 14 juin 2016, Pessac (France). (Orale et affichée)

L-A. Cussac, P. Robillard, T. Parpaite, J-P. Savineau, C. Guibert, R. Marthan and T. Ducret, **Characterization and functionality of TRPV4 channels in rat intrapulmonary artery adventitial fibroblasts**. Journée scientifique de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé de Bordeaux, 6 avril 2016, Arcachon (France). (Affichée)

ORGANISATION SYMPOSIUM

Young Scientist Symposium, YSS, Pessac 33600 (2014-2015)

Organisation de la journée des jeunes chercheurs à l'Institut européenne de Chimie Biologie (IECB).

FORMATIONS

Formation Image J Module 1

Traitement et Analyse d'image sous Image J

Réalisée au Bordeaux Imaging Center, (BIC), 3 jours, Janvier 2015

Centre Broca Nouvelle Aquitaine, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux

Formation expérimentation animale

Niveau concepteur rongeurs

Réalisée à Bordeaux-Carreire, du 20 au 29 juin 2017

Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux

EXPERIENCES D'ENSEIGNEMENT

Au cours de ma thèse j'ai pu exercer la fonction d'Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) en Pharmacologie (santé 86) à l'UFR de Pharmacie de l'Université de Bordeaux et Inserm 1045, de janvier à juin 2018.

Ainsi j'ai réalisé un service de 146 heures de Travaux Pratique (TP) en pharmacologie, pour les 2ème et 3ème années de Pharmacie, réparties de la façon suivantes :

« Système cholinergique » 30 heures

« Pharmacométrie » 33 heures

« Etude du système respiratoire » 39 heures

« Médicaments du système cardiovasculaire » 40 heures

Membre du jury pour l'examen oral de travaux pratiques intégrés (3ème année de pharmacie) 4 heures

Au cours de cet ATER, j'ai aussi participé à la mise en place du « système de cœur perfusé » (Langendorff) utilisé pour les TP « Médicaments du système cardiovasculaire ».

Au cours de ma deuxième année de Pharmacie, j'ai participé à la mise en place du tutorat de 1ère année de Pharmacie (2009-2010) à l'Université Paris-Descartes.

Les matières enseignées étaient les mathématiques, les sciences végétales, la galénique, les affaires réglementaires, la pharmacie clinique, ainsi que la biologie cellulaire. Au cours de ce tutorat, deux concours blancs ont été organisés.

IMPLICATION OF ADVENTITIAL INTRAPULMONARY ARTERY FIBROBLASTS IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF PULMONARY HYPERTENSION : ROLE OF THE TRPV4 CHANNEL

Pulmonary circulation is a low pressure system (between 10 and 15 mmHg at rest). Its first role is blood oxygenation which allows to carry dioxygen to the organs fonctionality. Pulmonary Hypertension (PH) is one of the main pulmonary diseases. It is a rare and potentially fatal disorder, defined by a high arterial pulmonary mean pressure (greater than or equal to 25 mmHg at rest). This high pressure can be explained by the elevation of pulmonary arterial resistance and related to narrowing of the lumen of the artery, induced, among other, by the arterial remodeling in this pathology.

Indeed, during the pathology implementation, the structure of the all three layers constituting the artery wall (*intima-media-adventitia*) is altered. The media and intima have received much attention from vascular biologists, however an increasing volume of experimental data indicates that this third compartment undergoes earlier and dramatic remodeling during PH. More specifically, the fibroblasts, the most abundant cells in adventitia, may act as key regulator of pulmonary vascular wall structure and function from the "outside-in". The fibroblasts may play the role of "sentinel cell" in the vessel wall. In responding to various stimuli, these cells are the first artery wall cells to show evidence of "activation" as proliferation, myofibroblast differentiation, migration and invasion in the other wall layer, and extracellular matrix production. That way, fibroblasts participate directly to the overall artery remodeling observed in PH.

Calcium is involved in numerous cellular signalling pathways such as those previously described. In the laboratory, we already proved that TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid) channel, a non-selective cationic channel calcium permeable, is involved in media remodeling. Moreover, several datas show that this channel play an important role in diseases in which we observe a negative role of fibroblast such as scleroderma, cardiac and pulmonary fibrosis.

Considering these results, we were interested in the role of TRPV4 in fibroblast during PH more precisely in the adventitial remodeling process observed in this pathology.

We first demonstrated the involment of TRPV4 in the adventitia remodeling regarding the tissue. Using two different animal models of PH, chronic hypoxia and monocrotalin models, we identified that this protein was up-regulated in sick rats and the mouse knock-down for this gene developed attenuated PH and adventitia remodeling compare to the control.

Then we studied the role of TRPV4 in the mechanism leading to the adventitia remodeling. Thanks to pharmacological molecule and siRNA we proved that activation of TRPV4 increased proliferation (BrdU assay), migration (wound assay) and fibrotic activity such as excessed production of extracellular matrix (using western blot analyse) of the fibroblasts.

With all these results, it would be interested to culture fibroblasts in hypoxic conditions and/or subjecting themselves to chronicle stretch to imitate HTP pathology and evaluate TRPV4 role in these conditions

Key words

Adventitial remodeling, fibroblast, intrapulmonary artery, pulmonary hypertension, TRPV4.

IMPLICATION DES FIBROBLASTES ADVENTITIELS D'ARTÈRES INTRAPULMONAIRES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE : RÔLE DES CANAUX TRPV4

La circulation pulmonaire est un système à faible pression (entre 10 et 15 mmHg au repos). Son principal rôle est la ré-oxygénation du sang qui permet l'apport aux organes du dioxygène nécessaire à leur fonctionnement. L'hyperTension Pulmonaire (HTP) est l'une de ses principales pathologies. Il s'agit d'une maladie rare engageant le pronostic vital du patient, définie par une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure ou égale à 25 mmHg au repos. Elle s'explique par une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires liée, entre autres, au remodelage artériel présent dans cette pathologie participant à la diminution de la lumière artérielle. En effet, chez les patients atteints d'HTP, les trois tuniques formant l'artère (*intima-media-adventice*) voient leur structure se modifier. La plupart des travaux portent sur le remodelage de la *media*, mais de plus en plus d'études montrent que les premières altérations observées se situent au niveau de l'*adventice*. Plus précisément, les fibroblastes, les cellules majoritaires de cette tunique, agiraient comme régulateur clé de la fonction vasculaire pulmonaire. En réponse à un stress extérieur tel que l'hypoxie (à l'origine de certaines formes d'HTP), elles seraient les premières cellules à s'activer d'où leur dénomination par certains de « cellules sentinelles ». Cette activation se manifeste entre autres par des changements phénotypiques (différenciation en myofibroblastes), leur prolifération, leur migration, et la surproduction de protéines de la matrice extracellulaire. Ainsi les fibroblastes participent directement au remodelage artériel global observé dans l'HTP.

Le calcium est connu pour réguler un grand nombre de voies de signalisation cellulaire impliquées dans les phénomènes précédemment cités. Au laboratoire, l'implication du canal TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4), un canal non sélectif perméable aux ions Ca^{2+} , a déjà été montré concernant le remodelage de la *media*. L'activation du canal, amplifiée en situations pathologiques, participe à la migration et à la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires. Aussi, des données de la littérature montrent que TRPV4 joue un rôle important dans l'activité délétère des fibroblastes dans les sclérodermies, les fibroses pulmonaire et cardiaque. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'implication des fibroblastes et du canal TRPV4 dans le remodelage adventiciel artériel lors de l'hypertension pulmonaire.

Pour ce faire, nous nous sommes intéressés, dans une première partie, à l'implication du canal TRPV4 dans ce remodelage au niveau tissulaire. Nous avons ainsi montré, à l'aide de deux modèles animaux hypertendus, un induit par l'injection de monocrotaline et l'autre induit par une exposition hypoxique chronique, que la protéine TRPV4 est surexprimée dans l'*adventice* alors que son remodelage est significativement atténué chez des souris invalidées pour le gène *trpv4*.

Dans un second temps, nous avons alors étudié le rôle de ce canal dans les réponses cellulaires impliquées dans le remodelage adventiciel. Pour cela nous avons mis au point la culture de fibroblastes d'*adventice* d'artères intrapulmonaires de rats. Puis par une approche pharmacologique (activateurs et bloqueurs du canal) et à l'aide de siRNA, nous avons montré que l'activation du canal TRPV4 favorise la prolifération (par incorporation de BrdU) et la migration (par test de brèche) des fibroblastes, ainsi que leur activité profibrotique avec la surproduction de matrice extracellulaire (MEC) (par quantification de l'expression protéique par Western blot).

Il serait désormais intéressant de cultiver les fibroblastes en mimant *in vitro* les conditions pathologiques, en les plaçant dans un environnement hypoxique et/ou en les soumettant à un étirement chronique, et d'évaluer l'impact de l'HTP sur le canal et ses actions cellulaires.

Mots clés

Artère intra-pulmonaire, fibroblaste, hypertension pulmonaire, remodelage adventiciel, TRPV4