

UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

École doctorale de Bordeaux

THÈSE 

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2 – VICTOR SEGALEN

Mention Sciences, Technologies, Santé

Option Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 25 Novembre 2009 à 14h30

Par

Marie BILLAUD

Née le 11 Février 1983 à Cholet (49)

**RÔLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA
PAROI ARTÉRIELLE PULMONAIRE :
IMPLICATIONS EN PHYSIOPATHOLOGIE**

Membres du Jury

Mme Joëlle AMÉDÉE	Directeur de recherche INSERM, Bordeaux	Président
Mme Chantal BOULANGER	Directeur de recherche INSERM, Paris V	Rapporteur
M. Laurent CRONIER	Maître de conférence, Poitiers	Rapporteur
Mme Elisabeth GENOT	Directeur de recherche INSERM, Bordeaux	Examineur
M. Anh-Tuan DINH-XUAN	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Paris V	Examineur
Melle Christelle GUIBERT	Chargée de recherche INSERM, Bordeaux	Directeur de Thèse

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
REMERCIEMENTS	8
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	13
LISTE DES FIGURES	16
LISTE DES TABLEAUX	20
ABREVIATIONS	22
AVANT-PROPOS	26
INTRODUCTION	30
LA CIRCULATION PULMONAIRE	31
1. Généralités	31
2. Organisation et anatomie.....	32
3. Morphologie	33
4. Mécanisme de contraction des cellules musculaires lisses.....	34
L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE	37
1. généralités	37
2. Classification.....	38
3. HTAP idiopathique, héréditaire et associée (groupe 1).....	40
3.1. Données cliniques	40
3.2. Modèle animal : le rat monocrotaline (MCT).....	41
4. HTAP hypoxique (groupe 3)	43
4.1. Données cliniques	43
4.2. Modèle animal : le rat hypoxique chronique (HC).....	44
SEROTONINE ET HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE	46
1. Sources de sérotonine.....	46
2. Les récepteurs à la sérotonine	47
3. Le transporteur de la sérotonine.....	49
4. Sérotonine et circulation pulmonaire	50
4.1. Sérotonine et circulation pulmonaire saine	51
4.2. 5-HT et HTAP idiopathique, héréditaire et associée (groupe 1)	52
4.3. 5-HT et HTAP hypoxique (groupe 3).....	52
LES JONCTIONS COMMUNICANTES	55
1. Structure des jonctions communicantes.....	55
1.1. Découverte des jonctions communicantes.....	55
1.2. Découverte de la protéine unitaire : la connexine	56

1.3. Connexines : sous-unité protéique.....	57
1.4. Cycle de vie des connexines.....	58
2. Propriétés physiologiques.....	61
3. Régulation de la communication intercellulaire.....	64
3.1. Les phosphorylations.....	64
3.2. Autres modes de régulation.....	65
4. Méthodes d'étude des jonctions communicantes.....	66
4.1. Outils pharmacologiques.....	66
4.2. Diffusion de traceurs.....	68
4.3. Electrophysiologie.....	70
4.4. Modèles animaux.....	71
5. Les jonctions communicantes dans le système cardiovasculaire.....	72
5.1. Les jonctions communicantes dans le coeur.....	72
5.2. Les jonctions communicantes dans les vaisseaux.....	73
5.3. Jonctions communicantes et pathologies cardiovasculaires.....	75
5.4. Jonctions communicantes et circulation pulmonaire.....	77
LES ESPECES REACTIVES DERIVEES DE L'OXYGENE (ROS).....	78
1. Définition.....	78
2. Sources de ROS.....	79
2.1. NADPH oxydase.....	80
2.2. Mitochondrie.....	81
2.3. NO synthase (NOS) découplée.....	83
2.4. Autres oxydases.....	84
3. Systèmes endogènes de défense contre les ROS.....	84
3.1. Le monoxyde d'azote.....	84
3.2. Tétrahydrobioptérine.....	85
3.3. L'acide ascorbique (Vitamine C) et l'α-tocophérol (Vitamine E).....	85
3.4. Les systèmes enzymatiques.....	85
4. Rôles physiologiques et physiopathologiques.....	87
4.1. Rôles physiologiques.....	87
4.2. Stress oxydant.....	88
4.3. ROS et pathologies vasculaires.....	89
5. ROS et circulation pulmonaire.....	90
5.1. ROS et HTAP idiopathique, familiale et associée (groupe 1).....	90
5.2. ROS et HTAP hypoxique (groupe 3).....	91
6. ROS, 5-HT et circulation pulmonaire.....	93
MATERIELS ET METHODES.....	94
MATERIEL BIOLOGIQUE.....	95

1. Animaux.....	95
1.1. Groupe contrôle.....	95
1.2. Modèles animaux d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).....	95
2. Artère pulmonaire de rat.....	98
3. Cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires.....	99
3.1. Dissociation cellulaire.....	99
3.2. Culture cellulaire.....	99
3.3. Vérification du phénotype musculaire lisse des cellules.....	100
MESURE SIMULTANEE DU CALCIUM ET DE LA CONTRACTION.....	102
1. Dispositif expérimental.....	102
1.1. La sonde calcique.....	102
1.2. Artériographie.....	104
1.3. Charge des vaisseaux.....	105
1.4. Vidéomicroscopie.....	106
1.5. Analyse des données.....	107
2. Protocole expérimental.....	107
2.1. Mesure simultanée du calcium et de la contraction en réponse à la 5-HT.....	107
2.2. Inhibition des jonctions communicantes.....	108
MESURE DE LA CONTRACTION ISOMETRIQUE.....	110
1. Dispositif expérimental.....	110
2. Protocole expérimental.....	111
RT-PCR.....	112
1. Extraction d'ARN.....	112
2. Reverse Transcription (RT).....	112
3. Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel.....	112
4. Analyse des résultats.....	114
WESTERN BLOT.....	115
1. Extraction des protéines.....	115
2. Western Blot.....	115
IMMUNOFLUORESCENCE.....	117
COMMUNICATION MYOENDOTHELIALE.....	118
RESONANCE PARAMAGNETIQUE DES ELECTRONS (RPE).....	119
1. Principe.....	119
1.1. Rappels de physique quantique.....	119
1.2. Effet Zeeman.....	119
1.3. Condition de résonance.....	120
2. Utilisation de piègeur de spin (spin trap).....	121

3. Utilisation de sonde (« spin probe »)	122
4. Dispositif expérimental.....	122
4.1. Appareil	122
4.2. Spectres d'absorption.....	124
5. Protocole.....	126
5.1. Mesure de l'anion superoxyde	126
5.2. Mesure du NO	126
6. Analyse des résultats.....	127
MESURE DU GMPC.....	129
ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	131
RESULTATS	132
ETUDES DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA CIRCULATION PULMONAIRE SAINNE.....	133
1. Étude chez le rat.....	133
2. Étude chez la souris	134
3. Etude sur des CML en culture	136
4. Conclusion	138
ETUDES DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA CIRCULATION PULMONAIRE	
PATHOLOGIQUE	139
1. Profil d'expression des connexines dans la circulation pulmonaire pathologique	139
1.1. Etude de l'expression des Cx 37, 40 et 43.....	139
1.2. Etude de la localisation des Cx 37, 40 et 43	141
2. Rôle des jonctions communicantes dans la réponse à la 5-HT	143
2.1. Réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT	143
2.2. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats	
contrôles, HC et MCT	144
3. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à l'endothéline-1	146
3.1. Réactivité à l'endothéline-1 des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.....	146
3.2. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles,	
HC et MCT	148
4. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à la phényléphrine.....	149
4.1. Réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.....	149
4.2. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats	
contrôles et HC	151
5. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à des solutions	
hyperpotassiques.....	152
5.1. Réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.....	152

5.2. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT	154
6. Conclusion	156
DISCUSSION - PERSPECTIVES.....	158
ETUDE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA CIRCULATION PULMONAIRE SAINNE.....	159
1. L'anion superoxyde dans la réponse à la 5-HT des AIP.....	159
2. Les jonctions communicantes dans la réponse à la 5-HT des AIP.....	162
3. Expression des connexines dans les CML d'AIP en culture.....	163
4. Etude chez la souris	164
ETUDE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA CIRCULATION PULMONAIRE PATHOLOGIQUE	165
1. Profil d'expression des connexines dans l'HTAP	165
2. Réactivité des AIP saines et pathologiques aux différents agonistes.....	166
2.1. Réactivité vasculaire à la 5-HT.....	166
2.2. Réactivité vasculaire à l'ET-1	166
2.3. Réactivité vasculaire à des solutions hyperpotassiques.....	166
2.4. Réactivité vasculaire à la phényléphrine.....	167
3. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité des AIP saines et pathologiques	167
3.1. Réactivité vasculaire à la 5-HT.....	167
3.2. Réactivité vasculaire à l'ET-1	168
3.3. Réactivité vasculaire à des solutions hyperpotassiques.....	168
3.4. Réactivité vasculaire à la phényléphrine.....	168
CONCLUSION GENERALE.....	170
BIBLIOGRAPHIE	173

REMERCIEMENTS

Mademoiselle le Docteur Christelle Guibert

Je te remercie sincèrement pour tes conseils, ta patience, et tous ces moments passés à travailler ensemble depuis 4 ans. Toujours disponible lorsque je frappais à ta porte, tu m'as encadrée et guidée tout au long de ce travail. Tu m'as permis de mener à bien cette thèse, et tu m'as donné l'opportunité de traverser l'Atlantique pour assurer mon avenir professionnel. Je te suis profondément reconnaissante pour ton soutien, et espère pouvoir poursuivre ce travail avec toi à l'avenir.

Monsieur le Professeur Roger Marthan

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire INSERM U885. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour vos conseils, votre disponibilité et votre confiance.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Savineau

Je tiens à vous remercier de m'avoir accueillie au sein de l'équipe vasculaire pulmonaire du laboratoire. Vos conseils et votre rigueur ont contribué à la réalisation de ce travail.

Aux Docteurs Chantal Boulanger et Laurent Cronier

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Madame le Docteur Joëlle Amédée

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je vous remercie également de m'avoir initiée au monde fabuleux des jonctions communicantes il y a plus de 4 ans !

Madame le Docteur Elisabeth Genot

Je te remercie d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je tiens également à te remercier pour tes précieux conseils et ton enthousiasme dans la recherche scientifique.

Monsieur le Professeur Anh-Tuan Dinh-Xuan

Je vous suis sincèrement reconnaissante d'avoir accepté d'être présent dans ce jury de thèse.

Aux Docteurs Carmen Martinez et Ramaroson Andriantsitohaina

Je vous remercie sincèrement de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire à Angers pour me former à la RPE. Vos précieux conseils lors du comité de suivi de thèse m'ont permis d'avancer dans mon projet.

Au Docteur Andrei Kleschyov

Je vous suis sincèrement reconnaissante pour vos précieux conseils en RPE.

Au Vascular Smooth Muscle Group (VSMG)

Merci aux Docteurs Thomas Ducret et Eric Dumas De La Roque, au Professeur Jean-François Quignard, à Madame Huguette Crevel, et à tous les étudiants passés, présents et à venir, pour les discussions scientifiques lors des VSMG meetings.

A toute l'équipe « pharma »

Merci au Professeur Bernard Muller, aux Docteurs Véronique Freund-Michel, Mathilde Dubois, Arnaud Courtois, Isabelle Baudrimont et à Madame Martine Lacayrerie pour votre attention, vos conseils, votre amitié et pour m'avoir aidée expérimentalement.

A Pierre Téchoueyres et Armelle Desveaux

Pour votre sourire, votre bonne humeur, et votre savoir faire !!

A Madame Vincendeau

Je vous remercie d'avoir relu attentivement mon manuscrit, et d'y avoir débusqué toutes les coquilles, tel Maitre Capello !

Merci à toute l'équipe de l'unité INSERM U885.

A ma grande, précieuse et indispensable famille !

Merci à tous d'avoir été si présents tout au long de cette période. Merci à mon petit Papou pour avoir « veillé au grain » car la vie est une dure lutte, merci à Marie-Madeleine pour ses si bons repas, merci à ma grande sœur Maude et mon grand frère Cyrille pour ce qu'ils sont tout simplement et pour tout ce qu'ils m'ont et vont m'apporter. Merci à Maxime et Julie pour votre sincère amitié. Je n'oublie pas les rapportés Laurent (le doyen des beaufs), Stéphanie, Tony et Cindy, les repas de famille passés et à venir sont toujours de très bons moments. Et merci à tous de nous faire plein de petits, tous aussi mignons les uns que les autres, par ordre d'apparition Esteban, Nina, Manuella et Blanche. Continuez à agrandir notre famille !!

Merci à tous pour votre soutien.

J'ai également une pensée émue pour tous ceux qui ne sont plus là, et tout particulièrement pour Maman.

A tous mes amis !!

A Laure (a.k.a. Petra), pour nos 5 ans d'amitié, de discussions sans fin, de rires, de pleurs... et à Eric qui supporte tout ça !

A Jérôme F. pour tous ces bons moments, ces concerts et autres festivals passés ensemble !

Aux Rodrigues (Aurélie et Jérôme), à notre amitié plus si naissante que ça maintenant !
Merci pour vos conseils et votre soutien !

A Hayssam, pour ton soutien inconditionnel, tes conseils si précieux, nos interminables discussions si enrichissantes... Merci de m'avoir « supportée » tous ces soirs où je rentrais après une journée de dur labeur !!

Une spéciale dédicace à toutes mes pouffes du labo : par ordre d'apparition Imane (et son français académique), Annaïg (a.k.a. Dr Oz et sa frite), Diana (pour ses « pfff ça m'saoule ») et Emilie (dernière recrue et Miss Folette). Ces années passées ensemble ont été vraiment super, nos fous rires resteront à jamais dans ma mémoire !! Merci merci merci les fiiiiilles !!!

A mes amies d'enfance, de notre petit village de Vendée : Edith, Pascaline, Carole et Vanessa. Même éparpillées aux 4 coins de France et du Monde (!) notre profonde amitié est toujours là !

A Céline A de Paris et Benjamin M. from London et tous ces bons moments passés ensemble à Laval (la vie), ces années d'IUT n'auraient pas été les mêmes sans vous...

A toutes les personnes qui connaissent les mêmes angoisses que moi en cette fin de thèse et plus particulièrement Jonathan C. et Lionel F.!!

A Lise (a.k.a. Mamie Poispois), ton petit padawan te remercie pour tes conseils et ton amitié !

A tous mes amis et toutes mes rencontres : Guillaume C. (Mac addict), Elodie R. (des deux chèvres), Jalila, Jennifer, Annick, Sebastien M., Isabelle H., François P, Guillaume S.

Je tiens également à remercier Facebook, qui nous permet chaque jour de garder contact avec tous nos amis !!! ;)

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles

Vascular Smooth Muscle Modulates Endothelial Control of Vasoreactivity via Reactive Oxygen Species Production through Myoendothelial Communications.

Billaud M., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C. (2009)

PLoS ONE, 4, 7 : e6432.

Communications (Posters)

Comparative study of the expression and function of pulmonary arterial gap junctions from two rat models of pulmonary arterial hypertension: chronic hypoxia and monocrotaline

Dahan D., Billaud M., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C. (2009)

Fundamental & Clinical Pharmacology, 23 (Suppl 1), 17 (Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique, Marseille, France)

Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via ROS production through myoendothelial communications

Billaud M., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C. (2009)

FASEB J. 2009 23:627.3 (Congrès Experimental Biology, New-Orleans, Louisiana, USA)

Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via ROS production through myoendothelial communications

Billaud M., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C. (2009)

Archives of Cardiovascular Diseases, 102, 0105 (Congrès du Groupe de Reflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Nancy, France)

Modulation of the serotonin-induced vasoreactivity by gap junctions in rat intrapulmonary arteries: role of the endothelium

Billaud M., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C. (2008)

Archives des maladies du cœur et des vaisseaux, 101, 0178 (congrès du Groupe de Reflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Montpellier, France)

Prix poster

Expression of gap junctions and their role in the serotonin-induced vasoreactivity in normoxic and chronic hypoxic rat pulmonary arteries

Billaud M., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C. (2007)

Archives des maladies du cœur et des vaisseaux, 100, 07-09 (congrès du Groupe de Reflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Tours, France)

Expression and role of gap junctions in chronic hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension.

Billaud M., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C. (2006)

Revue des maladies respiratoires, 23, 054, 539 (Journée de Recherche Respiratoire, Tours, France)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	schéma d'une coupe longitudinale de cœur.....	32
Figure 2 :	schéma de la circulation artérielle pulmonaire du rat.	33
Figure 3 :	schéma de la paroi d'une artère.	33
Figure 4 :	les protéines contractiles des CML.....	35
Figure 5 :	mécanisme moléculaire de la contraction des CML.	36
Figure 6 :	anatomopathologie de l'HTAP du groupe 1 chez l'homme.....	41
Figure 7 :	anatomopathologie de l'HTAP du groupe 1 chez le rat.	42
Figure 8 :	anatomopathologie de l'HTAP du groupe 2 chez le rat.	44
Figure 9 :	synthèse de la sérotonine.....	47
Figure 10 :	structure des jonctions communicantes.....	57
Figure 11 :	structure topologique d'une connexine.	58
Figure 12 :	assemblage des connexines.	59
Figure 13 :	cycle de vie des connexines.....	61
Figure 14 :	mode d'action supposé des peptides mimétiques.....	67
Figure 15 :	méthodes d'études de la communication intercellulaire via les jonctions communicantes.....	70
Figure 16 :	schéma de synthèse des ROS.....	79
Figure 17 :	la NADPH oxydase.....	81
Figure 18 :	représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale.	82
Figure 19 :	représentation schématique de la structure de la NO synthase.....	83
Figure 20 :	production d'anion superoxyde par la xanthine oxydase (XO).....	84
Figure 21 :	schéma récapitulatif de l'implication des ROS dans l'HTAP.....	92
Figure 22 :	validation du modèle de rat MCT.....	96
Figure 23 :	caisson hypobare.....	97
Figure 24 :	arbre artériel intrapulmonaire de poumon gauche de rat.....	98
Figure 25 :	vérification phénotypique des cellules utilisées.	101
Figure 26 :	structure de la sonde calcique Fura-PE3.....	103
Figure 27 :	variation de l'intensité de fluorescence du Fura-PE3 en fonction du spectre d'excitation.....	104

Figure 28 : artériographe utilisé pour pressuriser les artères intrapulmonaires de 3 ^{ème} ordre de rats.....	105
Figure 29 : artère intrapulmonaire de 3 ^{ème} ordre de rat montée sur les pipettes de verre de l'artériographe, et pressurisée à 10 mm Hg.....	105
Figure 30 : schéma de l'installation de vidéomicroscopie.....	106
Figure 31 : reproductibilité de deux réponses successives à la sérotonine sur une même AIP3 provenant de rats contrôles.	108
Figure 32 : localisation des peptides Gap 20, Gap 26 et Gap 27	109
Figure 33 : représentation schématique du montage permettant la mesure de la contraction isométrique des anneaux d'artère pulmonaire de premier ordre.	111
Figure 34 : principe général de la RPE.....	120
Figure 35 : réaction spontanée entre la sonde CMH et l'anion superoxyde aboutissant à la production de radical nitroxyde (CM).....	122
Figure 36 : Miniscope MS200 (Magnettech).....	123
Figure 37 : principe de la spectrométrie par RPE.....	124
Figure 38 : spectre d'absorption du radical nitroxyde obtenu sur un échantillon d'artère pulmonaire de rat.....	125
Figure 39 : spectre d'absorption du complexe NO-Fe(DETC) ₂ obtenu sur un échantillon d'artère pulmonaire de rat.....	125
Figure 40 : mesure de l'amplitude (unité arbitraire) des 3 pics correspondant au spectre du radical nitroxyde.....	127
Figure 41 : mesure de l'amplitude (unité arbitraire) du pic correspondant au NO-Fe(DETC) ₂ . .	127
Figure 42 : principe du kit de dosage du GMPc (Cayman chemical).....	130
Figure 43 : effet du ⁴³ Gap 26 sur la contraction à la 5-HT d'artères intrapulmonaires de souris contrôles.....	135
Figure 44 : effet du ⁴³ Gap 26 sur la contraction à la 5-HT d'artères intrapulmonaires de souris déficientes en eNOS.	135
Figure 45 : réactivité à la 5-HT d'artères intrapulmonaires de souris contrôles (carrés noirs) et déficientes en eNOS (carrés blancs).....	136
Figure 46 : expression des Cx 37, 40 et 43 au niveau de CML d'AIP3 de rat.	137

Figure 47 : expression des ARNm des Cx 37, 40 et 43 dans la circulation pulmonaire de rats sains, et de rats atteints d'HTAP.	140
Figure 48 : expression des Cx 37, 40 et 43 dans la circulation pulmonaire de rats sains, et de rats atteints d'HTAP.....	141
Figure 49 : localisation des Cx 37, 40 et 43 dans la paroi des AIP3 de rats contrôles, HC et MCT.....	142
Figure 50 : réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.	143
Figure 51 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la contraction à la 5-HT des AIP1 de rat contrôles, HC et MCT.	145
Figure 52 : réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles, MCT et HC.....	147
Figure 53 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la contraction à l'ET-1 des AIP1 de rat contrôles, HC et MCT.	148
Figure 54 : réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles, MCT et HC.....	150
Figure 55 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la contraction à la phényléphrine des AIP1 de rat contrôles, HC.....	151
Figure 56 : réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, MCT et HC.....	153
Figure 57 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la contraction en réponse à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rat contrôles, HC et MCT.	155

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	classification clinique des hypertensions pulmonaires.....	39
Tableau 2 :	classification des récepteurs à la sérotonine.	49
Tableau 3 :	maladies héréditaires associées à des mutations des connexines.....	64
Tableau 4 :	phénotype des souris déficientes en connexines (souris Knock-out).	72
Tableau 5 :	composition de la solution de Krebs-Hepes bicarbonate.	98
Tableau 6 :	composition de la solution de dissociation (SD).....	99
Tableau 7 :	composition de la solution de Kreb's-Henseleit dont le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH.	110
Tableau 8 :	récapitulatif des amorces utilisées pour la PCR en temps réel.....	113
Tableau 9 :	récapitulatif des anticorps utilisés pour le western blot.	116
Tableau 10 :	réactivité des AIP3 de rats contrôles, HC et MCT.....	144
Tableau 11 :	effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la réactivité à la 5-HT. ...	146
Tableau 12 :	réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.	147
Tableau 13 :	effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.....	149
Tableau 14 :	réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.	150
Tableau 15 :	effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles et HC.	152
Tableau 16 :	réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.	153
Tableau 17 :	effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.	156

ABBREVIATIONS

[Ca²⁺]_i : concentration calcique intracellulaire

•OH : radical hydroxyle

4-HNE : 4-hydroxynonéal

5-HT : 5-hydroxytryptamine - sérotonine

5-HTT : transporteur à la 5-HT

AChE : acétylcholine estérase

AIP : artère intrapulmonaire

AIP1 : artère intrapulmonaire de 1^{er} ordre

AIP3 : artère intrapulmonaire de 3^{ème} ordre

AMPC : adénosine-3,5-monophosphate cyclique

ATP : adénosine triphosphate

BH4 : tétrahydrobioptérine

BMP-R II : récepteur de la « Bone Morphogenetic Protein » de type 2

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive

BSA : albumine sérique de bovin

CCD : couple-charged device

CCRC : courbe en réponse à des concentrations cumulées

CE : cellules endothéliales

CFDA : carboxyfluoresceine diacétate

CMH : 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine

CML : cellule musculaire lisse

CML-AP : cellule musculaire lisse d'artère pulmonaire

CSR : contractions spontanées rythmiques

Cx : connexine

CYP450 : cytochrome P450

DAG : diacylglycérol

DETC : diéthylthiocarbamate

EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

ELISA : electroluminescent immunosorbent assay
eNOS : NO synthase endothéliale
ET-1 : endothéline-1
FRAP : retour de fluorescence après photoblanchiment
G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAPDH : glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
GMPc : guanosine-3,5-monophosphate cyclique
GPx : glutathion peroxydase
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HC : hypoxie chronique
HeM : hétéromérique
HeT : hétérotypique
HIF-1 : hypoxia inducible factor-1
HoM : homomérique
HoT : homotypique
HPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
IgG : immunoglobuline G
IP₃ : inositol-1,4,5-triphosphate
ITS : insuline-transferrine-sélénite
JME : jonction myoendothéliale
KHB : Krebs HEPES - bicarbonate
KO : knock - out
L• : lipide peroxydé
L-NAME : N^o-nitro-L-arginine-methyl ester
MAO : monoamine oxydase
MCT : monocrotaline
MDA : malondialdéhyde

NA : ouverture numérique

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO : monoxyde d'azote

Nox : NADPH oxydase

O_2^\bullet : anion superoxyde

$ONOO^-$: peroxydinitrite

PAPm : pression artérielle pulmonaire moyenne

PEG : polyéthylène glycol

PKC : protéine kinase C

PO : Ribosomal Phosphoprotein

RE : réticulum endoplasmique

ROO^\bullet : radical peroxyde

ROS : espèces réactives dérivées de l'oxygène

RPE : résonance paramagnétique des électrons

SHR : rats spontanément hypertendus

SOD : superoxyde dismutase

SVF : serum de veau foetal

VHP : vasoconstriction hypoxique

XD : xanthine déshydrogénase

XO : xanthine oxydase

YWHAZ : Tyrosine 3-monooxygenase/Tryptophan 5-monooxygenase Activation Protein,
Zeta polypeptide

ZO-1 : Zonula occludens

AVANT-PROPOS

La communication intercellulaire est primordiale dans tout organisme multicellulaire puisqu'elle permet d'uniformiser l'activité des cellules au sein d'un tissu. Elle assure ainsi le maintien de l'homéostasie et le bon fonctionnement des organes. La communication intercellulaire est assurée, entre autre, par les jonctions communicantes. Les **jonctions communicantes** sont des structures membranaires correspondant à un ensemble de canaux intercellulaires constitués d'une protéine : la connexine. Les jonctions communicantes assurent l'échange direct de cytoplasme à cytoplasme, d'ions et de petites molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1 kDa.

Dans les vaisseaux, les jonctions communicantes sont essentielles pour la régulation du tonus et des différentes fonctions vasculaires. Elles permettent la propagation des variations de potentiel de membrane, et l'échange de seconds messagers importants dans les fonctions vasculaires (AMPc, ATP, Ca²⁺ etc.). Ces échanges ont lieu grâce au couplage entre les cellules endothéliales, entre les cellules musculaires lisses et entre ces deux types cellulaires au niveau des **jonctions myoendothéliales**. Ces dernières ont fait l'objet de nombreuses études car elles participent au contrôle de l'état de contraction du muscle lisse par l'endothélium. En effet, de nombreuses études ont montré l'implication des jonctions myoendothéliales dans une voie de relaxation du muscle lisse dépendante de l'endothélium faisant intervenir un facteur hyperpolarisant produit par l'endothélium (EDHF). A l'inverse, peu d'études ont été menées sur le rôle des jonctions communicantes dans des phénomènes de vasoconstriction.

Au niveau vasculaire, 4 isoformes de connexines sont majoritairement exprimées : les connexines 37, 40, 43 et 45. Leur profil d'expression, leurs fonctions, ainsi que leurs implications dans diverses pathologies ont fait l'objet de nombreuses études. Cependant, ces études concernent essentiellement la circulation systémique et peu d'entre elles ont abordé le rôle des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire.

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une pathologie de la circulation pulmonaire représentant un problème de santé publique majeur : c'est une pathologie très invalidante ayant un très mauvais pronostic. Il s'agit d'une maladie de causes multiples, qui se caractérise par une élévation progressive des résistances artérielles pulmonaires. Elle fait l'objet d'une classification selon son origine. Si l'origine des HTAP du groupe 1 n'est pas connue, les patients peuvent être atteints d'une autre pathologie fréquemment associée à l'HTAP telles que le SIDA ou une connectivite (par exemple le lupus). Le groupe 1 rassemble également les HTAP dites familiales (associées à une mutation génétique) et les HTAP associées à la prise de médicaments tels que les anorexigènes. Cette dernière forme a connu une forte incidence entre les années 60 à 80 suite à la mise sur le marché de médicaments anorexigènes, dits « coupe-faim » permettant une perte de poids rapide. Les 4 autres groupes de cette classification rassemblent les HTAP dont la cause est connue. Parmi celles-ci, les

pathologies obstructives des voies aériennes sont à l'origine des HTAP du groupe 3, dites HTAP hypoxiques. L'HTAP est ainsi une complication de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou de la fibrose pulmonaire.

Sur le plan physiopathologique, l'HTAP est caractérisée par un déséquilibre en faveur des médiateurs vasoactifs contractants au détriment des médiateurs relaxants libérés par l'endothélium et le muscle lisse vasculaire pulmonaire. Parmi eux, la **sérotonine** (5-HT) contribue aux altérations de la vasomotricité dans la circulation pulmonaire.

La 5-HT, médiateur important du système nerveux central, est un puissant vasoconstricteur et suscite un intérêt croissant dans la compréhension de l'étiologie de l'HTAP. Elle est ainsi au centre du concept d'« **hypothèse sérotonine** » dans l'HTAP établi suite à diverses observations chez les patients ainsi que sur des modèles animaux d'HTAP. En effet, les médicaments anorexigènes impliqués dans le développement de l'HTAP interagissent avec le transport de la 5-HT. Par ailleurs, des taux élevés de 5-HT plasmatique ont été rapportés chez les patients souffrant d'HTAP.

D'autre part, au niveau vasculaire, la 5-HT est une substance ayant la particularité d'agir à la fois sur le muscle lisse et sur l'endothélium. L'action de la 5-HT sur le muscle lisse induit la contraction de celui-ci, alors que l'action de la 5-HT sur l'endothélium conduit à une relaxation du muscle lisse *via* la production de monoxyde d'azote (NO). Cependant, l'effet résultant de la 5-HT est une vasoconstriction. Cette observation amène alors à s'interroger sur **le rôle des jonctions myoendothéliales dans la vasoconstriction à la 5-HT**.

Enfin, il a été montré sur plusieurs vaisseaux, que la 5-HT produit de **l'anion superoxyde** au niveau du muscle lisse. L'anion superoxyde, et plus généralement **les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS)** sont à l'origine du stress oxydatif cellulaire et font l'objet de nombreuses études. L'augmentation des ROS est souvent observée lors de diverses pathologies telles que le cancer, les pathologies cardiovasculaires (infarctus du myocarde, athérosclérose), le diabète, l'insuffisance rénale, la maladie d'Alzheimer etc. De plus, certaines études mettent en évidence **le rôle des ROS dans le développement de l'HTAP**. D'autre part, depuis une vingtaine d'années, de nombreuses recherches ont apporté la preuve que certaines espèces réactives dérivées de l'oxygène interviennent dans de nombreux processus physiologiques (différenciation, prolifération, apoptose...).

Ainsi l'objectif principal de ce travail de thèse est d'acquérir des informations sur les jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire en conditions physiologique et pathologique. Cette étude a tout d'abord été menée sur la circulation pulmonaire normale, où nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle des jonctions communicantes et des ROS dans la réactivité de la circulation pulmonaire à la 5-HT. Par la suite, nous avons

poursuivi l'étude sur la circulation pulmonaire pathologique. Pour cela nous avons utilisé deux modèles animaux atteints d'HTAP : un modèle de rats atteints d'HTAP se rapprochant du groupe 1, et un modèle d'HTAP hypoxique, se rapprochant du groupe 3 de la classification des HTAP. La finalité de ces travaux est, dans un premier temps, d'apporter une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la réactivité de la circulation pulmonaire saine. Dans un deuxième temps, ces travaux ont pour but d'apporter de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les altérations de la vasomotricité pulmonaire observées dans l'HTAP.

INTRODUCTION

La circulation pulmonaire

1. GENERALITES

La circulation sanguine est divisée en deux composantes :

- la circulation systémique qui apporte le sang oxygéné et les nutriments du cœur vers les tissus,
- la circulation pulmonaire qui apporte le sang non oxygéné vers les poumons.

Le rôle de la circulation pulmonaire est donc de réoxygéner et d'éliminer le dioxyde de carbone du sang, grâce aux échanges gazeux se produisant dans les poumons. A l'inverse de la circulation systémique, la circulation pulmonaire est dite à basse pression (10 à 20 mmHg chez l'homme au repos) ; c'est un système à haut débit et à faibles résistances.

La circulation pulmonaire a la particularité d'être très sensible à l'oxygène, en effet, chez les mammifères, cette circulation est la seule à avoir la capacité de s'adapter à l'hypoxie en produisant une vasoconstriction : c'est la **vasoconstriction hypoxique pulmonaire (VHP)** (Gupte *et al.*, 2008). Cette VHP est un mécanisme d'adaptation, ayant pour rôle de protéger l'organisme en cas d'hypoxie. En effet, la VHP ayant lieu dans les zones atteintes par l'hypoxie, elle va permettre de rediriger le sang vers des zones non atteintes par l'hypoxie afin d'assurer une meilleure oxygénation du sang (Gupte *et al.*, 2008).

Au cours du développement fœtal, les poumons ne sont pas ventilés et les échanges gazeux se réalisent au niveau du placenta *via* la circulation fœtale. On observe alors une VHP persistante au niveau de la circulation pulmonaire, celle-ci est accompagnée de résistances vasculaires pulmonaires très élevées ainsi, le flux sanguin au niveau des poumons fœtaux non ventilés est très faible (Michelakis *et al.*, 2004). A la naissance, la circulation pulmonaire se dilate en réponse à l'oxygénation suite à la première inspiration. Ceci permet d'augmenter de 8 à 10 fois le débit sanguin pulmonaire en quelques minutes, permettant au poumon de remplir sa fonction d'échanges gazeux (Michelakis *et al.*, 2004).

La VHP est donc un phénomène physiologique qui, chez le fœtus, permet de détourner le flux sanguin du poumon fœtal vers la circulation fœtale *via* le canal artériel tandis que chez l'adulte, ce phénomène permet de détourner le flux sanguin des zones moins ventilées vers les zones plus ventilées.

2. ORGANISATION ET ANATOMIE

Les artères pulmonaires transportent le sang veineux pauvre en oxygène du ventricule droit aux capillaires où sont réalisés les échanges gazeux. A la suite de ces échanges, le sang oxygéné est transporté *via* les veines pulmonaires vers l'oreillette gauche, puis le ventricule gauche. Le sang oxygéné est alors distribué vers tous les organes *via* l'aorte (Figure 1).

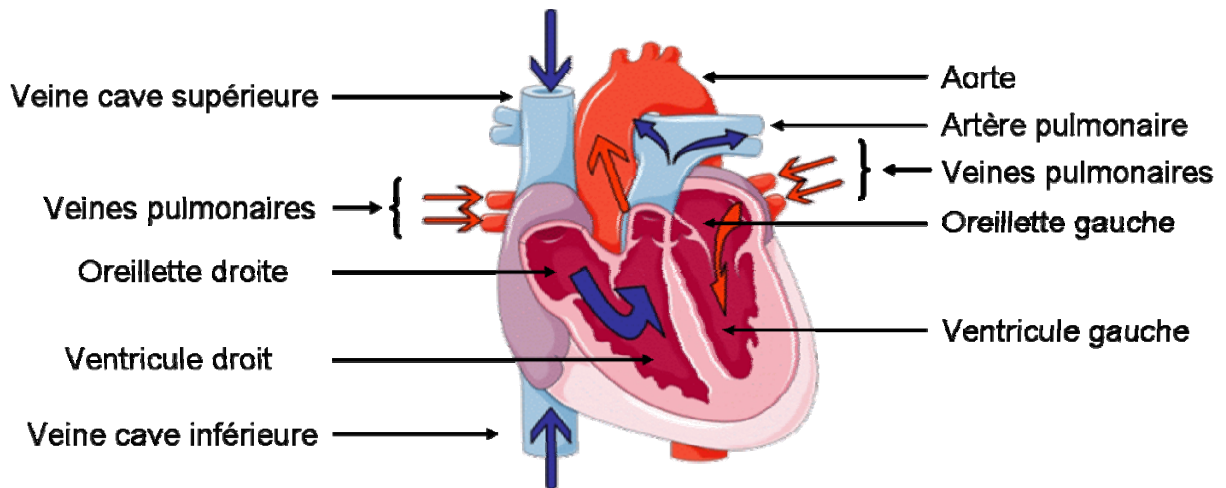


Figure 1 : schéma d'une coupe longitudinale de cœur.

D'après <http://www.meditas-cardio.fr/img/anat/anat03.gif>.

L'artère pulmonaire principale issue du ventricule droit se divise en deux branches droite et gauche destinées aux deux poumons (artères extrapulmonaires droite et gauche). Chez l'homme, le poumon droit est composé de 3 lobes et le poumon gauche de 2 lobes. Chez la souris et le rat, le poumon droit est composé de 4 lobes, et le poumon gauche est constitué d'un seul lobe.

A l'intérieur du poumon, la circulation artérielle pulmonaire peut être divisée en deux populations d'artères :

- Les artères pulmonaires conventionnelles qui se superposent au réseau bronchique ;
- Les artères surnuméraires qui correspondent à de petites artères musculaires issues des artères pulmonaires conventionnelles mais n'accompagnant pas le réseau bronchique (Shaw *et al.*, 1999).

L'artère extrapulmonaire devient l'artère intrapulmonaire de 1^{er} ordre une fois dans le poumon (Figure 2). Les différentes ramifications de cette dernière aboutissent aux artères pulmonaires de résistance. Le grand nombre de petites artères intrapulmonaires, ainsi que leur petite taille contribuent aux faibles résistances vasculaires observées dans le poumon (Merkus *et al.*, 2008).

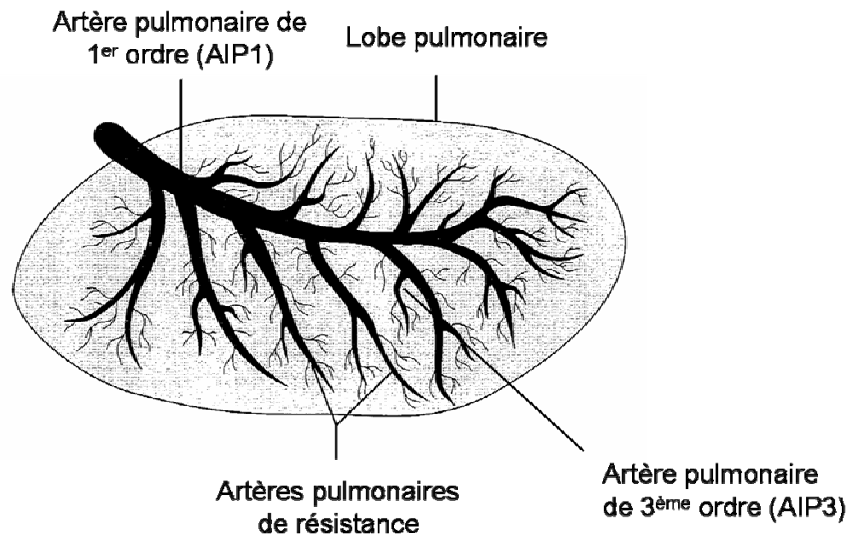


Figure 2 : schéma de la circulation artérielle pulmonaire du rat.

(D'après MacLean et al., 1997).

3. MORPHOLOGIE

La paroi des artères est constituée de trois couches concentriques distinctes. De la lumière vers la périphérie, on distingue l'intima, la media et l'adventice (Figure 3).

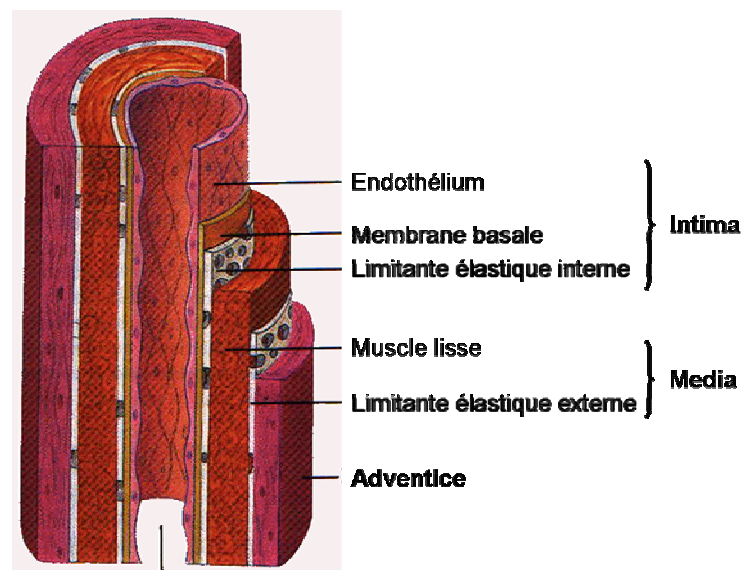


Figure 3 : schéma de la paroi d'une artère.

D'après <http://bio.m2osw.com/gcartable/cardiologie/artereveincapil.gif>

L'**intima** est directement en contact avec le sang et, par conséquent, avec les différents facteurs vasoactifs circulants. L'intima est formée d'une couche continue de cellules endothéliales (CE) disposées longitudinalement et reposant sur la membrane basale. L'axe de ces cellules se trouve allongé dans le sens de l'écoulement sanguin et cette orientation est déterminée par les

forces de cisaillement appliquées à leur surface. L'endothélium a principalement des rôles fibrinolytique, antithrombotique et de régulation du tonus vasculaire. L'endothélium assure ces différents rôles grâce à la libération de diverses substances (thromboxane A2, endothéline, prostaglandine, monoxyde d'azote etc.). L'intima est séparée de la média par une limitante élastique interne (Figure 3).

La **média** est, quant à elle, composée de cellules musculaires lisses (CML) disposées de façon hélicoïdale. Ces cellules sont réparties dans une matrice constituée d'élastine et de fibres de collagène. Par leur état de contraction, les cellules musculaires lisses vont produire la tension active de l'artère et définir ainsi le diamètre de celle-ci. La média définit donc le tonus vasomoteur qui va influencer sur la pression artérielle et permettre la répartition du flux en fonction des besoins métaboliques. La média est séparée de l'adventice par une limitante élastique externe (Figure 3).

L'**adventice** constitue l'enveloppe externe des artères, elle a un rôle de protection et de soutien. Elle est constituée de tissu conjonctif composé de fibroblastes, de fibres de collagène et de fibres élastiques. Dans les vaisseaux de diamètre important, de minuscules vaisseaux sanguins parcourent cette adventice, permettant l'irrigation de la partie externe de la média : ce sont les *vasa vasorum*. Enfin, l'adventice possède des terminaisons nerveuses, provenant du système nerveux autonome, qui participent au contrôle du tonus vasculaire. Cependant, ces terminaisons sont peu présentes dans la circulation pulmonaire.

En ce qui concerne plus précisément les artères pulmonaires, leur épaisseur est moins importante que les artères de la circulation systémique, et la proportion de cellules musculaires lisses est plus faible. Cette particularité confère aux artères pulmonaires une plus grande compliance, leur permettant une plus grande distensibilité en réponse à de faibles augmentations de pression (Merkus *et al.*, 2008). Le nombre de cellules musculaires lisses diminue à mesure que l'on descend dans l'arbre vasculaire pulmonaire, pour disparaître dans les capillaires, qui ne sont formés que de cellules endothéliales. Les petites artères intrapulmonaires, de diamètre interne de quelques dizaines de micromètres, contribuent majoritairement à la résistance vasculaire pulmonaire et sont le siège de la VHP.

4. MECANISME DE CONTRACTION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Les cellules musculaires lisses sont constituées d'actine (formant les filaments fins) et de myosine (formant les filaments épais) (Figure 4). L'état de contraction des CML dépend du degré de phosphorylation des chaînes légères régulatrices de la myosine, associées à la tête de myosine, et notamment la MLC20. Cette phosphorylation provoque un changement de conformation de la myosine qui devient capable de se lier à l'actine (myosine activée). Une

augmentation de la phosphorylation de la MLC20 conduit ainsi à une augmentation de la contraction.

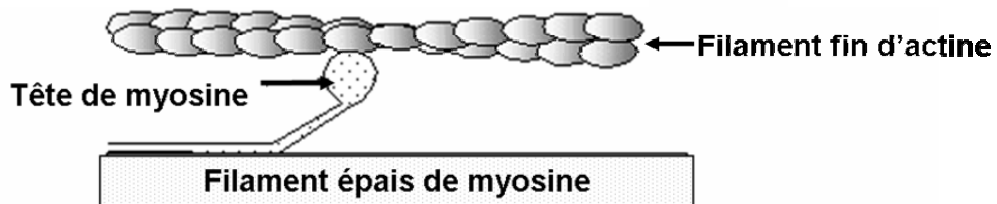


Figure 4 : les protéines contractiles des CML.

Schéma représentant l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine constituant les cellules musculaires. (D'après http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/article.php3?id_article=27)

L'état de phosphorylation de la MLC20 est sous la dépendance de 2 enzymes : **la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK)** va catalyser la phosphorylation de la MLC20, alors que **la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP)** va catalyser sa déphosphorylation. L'activité de ces enzymes définit donc l'état de contraction des cellules musculaires lisses.

L'activité de la MLCK est sous la dépendance du complexe calcium/calmoduline (Figure 5). Quand la concentration en calcium cytosolique augmente, le calcium va se fixer à la calmoduline et le complexe va activer la MLCK. L'augmentation de calcium peut être due à une modification du potentiel de membrane qui va provoquer l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage et permettre l'entrée du calcium extracellulaire : c'est le **couplage électromécanique**. La hausse de calcium peut également résulter de la liaison d'un agoniste à un récepteur spécifique : c'est le **couplage pharmacomécanique**. Dans ce cas, la hausse de calcium intracellulaire n'est pas due à une dépolarisation de la membrane, cependant, il faut noter que la modification du potentiel de membrane peut apparaître secondairement. La majorité des agonistes vasoconstricteurs provoquent une contraction des cellules musculaires lisses *via* leur liaison à un récepteur couplé à la protéine G_q . Ceci va aboutir à la production d'un second messager : l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) qui va se fixer sur des récepteurs-canaux présents sur la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ce compartiment étant un lieu de stockage du calcium, la fixation de l' IP_3 sur ses récepteurs-canaux va conduire à une libération de calcium dans le cytosol. Ce phénomène peut soit induire soit être accompagné d'une entrée de calcium extracellulaire *via* des canaux calciques indépendants du voltage présents à la membrane plasmique.

Plus récemment, un autre mécanisme induisant une augmentation du niveau de phosphorylation de la MLC20 (et donc une contraction) a été mis en évidence. Ce mécanisme est indépendant de la concentration calcique cytosolique, en revanche, il dépend de la

sensibilisation de l'appareil contractile (Savineau *et al.*, 1997). Ce mécanisme implique l'inhibition de la MLCP, enzyme qui, contrairement à la MLCK, est indépendante de la concentration calcique (Figure 5). La MLCP peut être inhibée soit par la phosphorylation d'une de ses sous-unités régulatrices : MYPT-1, soit par l'activation de protéines partenaires inhibitrices de la MLCP : CPI-17 (Hirano, 2007). Divers agonistes sont capables de sensibiliser l'appareil contractile *via* l'activation de la protéine kinase associée à Rho (Rho-kinase). La Rho-kinase phosphoryle la sous-unité MYPT-1 de la MLCP, et peut également activer CPI-17 par phosphorylation, aboutissant à l'inhibition de l'activité de la MLCP. D'autre part, la protéine kinase C (PKC) est également connue pour phosphoryler et donc activer CPI-17 (Hirano, 2007).

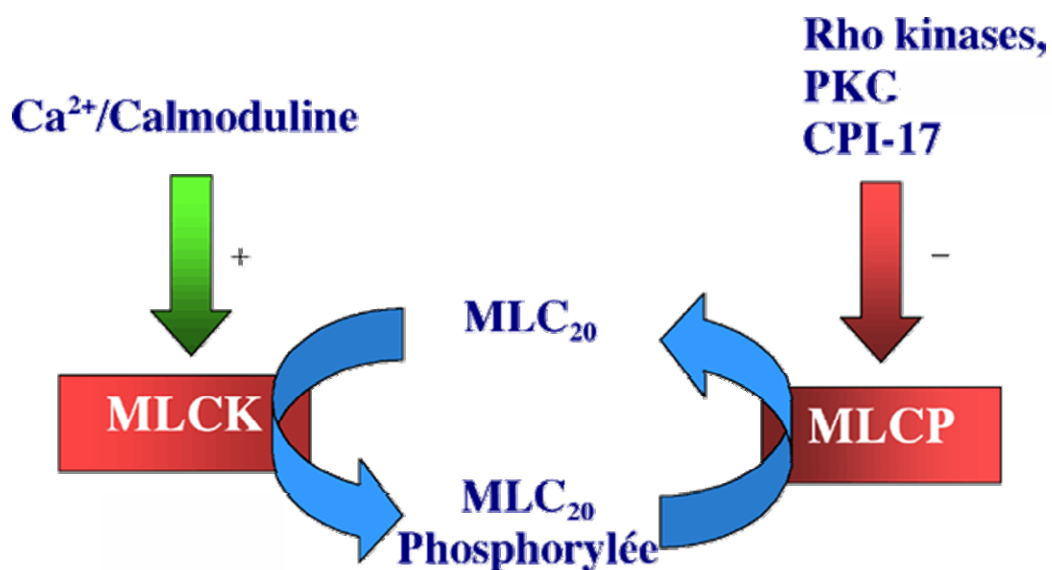


Figure 5 : mécanisme moléculaire de la contraction des CML.

Régulation de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC₂₀) par la kinase de la MLC₂₀ (MLCK) et la phosphatase de la MLC₂₀ (MLCP). (D'après <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/cmlv-b2.htm>).

L'hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (ou HTAP) est une maladie très invalidante dont le pronostic est sévère. Cette pathologie a fait l'objet d'une classification à l'Organisation Mondiale de la Santé en 2003, permettant de distinguer différentes formes d'HTAP selon leur origine.

Dans cette seconde partie introductive, je décrirai tout d'abord les données cliniques concernant l'HTAP, puis je détaillerai deux formes d'HTAP et les modèles animaux correspondants et à notre disposition.

1. GENERALITES

L'hypertension artérielle pulmonaire (ou HTAP) est une pathologie caractérisée par l'augmentation progressive des résistances artérielles pulmonaires, aboutissant à une insuffisance cardiaque droite.

L'échographie cardiaque permet le dépistage de l'HTAP, mais le diagnostic formel nécessite une procédure invasive : la pose d'un cathéter cardiaque droit permettant de mesurer la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm). En cas d'HTAP, cet examen met en évidence une PAPm supérieure à 25 mmHg au repos (30 mmHg à l'effort) (Farber *et al.*, 2004).

La prévalence de l'HTAP est difficile à évaluer, car de nombreux cas ne sont probablement pas identifiés. En effet, les symptômes de cette pathologie sont peu spécifiques. Parmi eux, la dyspnée d'effort est le signe le plus souvent retrouvé chez les patients atteints d'HTAP. Ce symptôme est évalué par des tests d'aptitude à l'effort dont le plus répandu est le test de marche à 6 minutes. Ce test consiste à soumettre le patient à la marche à pied normale pendant 6 minutes et mesurer la distance parcourue. Une distance parcourue inférieure à 450 m est considérée comme un mauvais pronostic (Frost *et al.*, 2005).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'HTAP sont peu connus. Cependant, il apparaît que les principales modifications observées dans l'HTAP sont la vasoconstriction et l'obstruction artérielle. On observe une rupture de l'équilibre vasodilatation/vasoconstriction en faveur d'une **vasoconstriction**. Ce déséquilibre est dû à une diminution de la production endothéliale pulmonaire de vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline, mais également à une production accrue de vasoconstricteurs comme l'endothéline-1 (ET-1) et le thromboxane A2 (Haworth, 2006). De plus, on observe un taux plasmatique de sérotonine (agoniste vasoconstricteur) élevé chez les patients atteints d'HTAP. Au niveau des artères pulmonaires de petit calibre, cette vasoconstriction s'accompagne d'un **remodelage vasculaire**, dû à une prolifération des cellules musculaires lisses et/ou des cellules

endothéliales. Ce phénomène, qui peut être aggravé par des thromboses, est à l'origine d'une diminution de la lumière des vaisseaux entraînant une augmentation persistante des résistances artérielles pulmonaires (Montani *et al.*, 2004).

Les stratégies thérapeutiques visent essentiellement à contrer les phénomènes de vasoconstriction, de remodelage vasculaire et de thrombose observés dans l'HTAP ; il n'existe aucun traitement curatif. Actuellement, les patients peuvent être traités par des vasodilatateurs tels que les bloqueurs de canaux calciques (nifedipine) ou les inhibiteurs de phosphodiesterase (sildenafil). Cependant, d'autres molécules telles que les analogues de la prostacycline (époprosténol, iloprost) et les antagonistes des récepteurs à l'ET-1 (bosentan, ambrisentan, sitaxsentan) offrent de meilleurs résultats de par leurs caractères vasodilatateur et antiprolifératif (Rhodes *et al.*, 2009). Enfin, l'approche la plus radicale mais aussi la plus efficace est la transplantation bi-pulmonaire ou cardio-pulmonaire (Montani *et al.*, 2004).

2. CLASSIFICATION

La nouvelle classification discutée au congrès mondial à Venise en 2003 et mise à jour au congrès mondial de Dana Point en 2009, distingue 5 groupes d'HTAP (Tableau 1) (Simonneau *et al.*, 2009). Le premier groupe rapproche les **HTAP idiopathiques** qui sont, par définition, de cause inconnue, des **HTAP associées** à diverses pathologies (connectivite, cardiopathie congénitale, infection par le VIH etc.). Ces situations sont en effet caractérisées par un dysfonctionnement endothélial pulmonaire et des modifications histologiques similaires, ce qui justifie une prise en charge clinique identique (Montani *et al.*, 2004). Par définition, les HTAP dites secondaires à une cause bien identifiée pouvant bénéficier d'un traitement spécifique n'appartiennent pas au groupe 1. Parmi ces causes, l'insuffisance respiratoire chronique (broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), exposition chronique à l'altitude etc.) conduit au développement d'une **HTAP dite hypoxique**.

Groupe 1 : hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

- 1.1. HTAP idiopathique ;
- 1.2. Héréditaire ;
 - 1.2.1. BMPR2 ;
 - 1.2.2. ALK1, endogline ;
 - 1.2.3. inconnue.
- 1.3. Médication et toxiques ;
- 1.4. Associée à une condition sous jacente :
 - 1.4.1. connectivite ;
 - 1.4.2. infection par le VIH ;
 - 1.4.3. hypertension portale ;
 - 1.4.4. cardiopathies congénitales avec shunt ;
 - 1.4.5. schistosomiase ;
 - 1.4.6. anémie hémolytique chronique.
- 1.5. HTAP persistante du nouveau-né.

Groupe 1' : maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire

Groupe 2 : hypertension pulmonaire associée à une cardiopathie gauche

- 2.1. Dysfonction systolique ;
- 2.2. Dysfonction diastolique ;
- 2.3. Maladie valvulaire.

Groupe 3 : hypertension pulmonaire associée aux pathologies respiratoires chroniques

- 3.1. Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ;
- 3.2. Maladies interstitielles chroniques ;
- 3.3. Autre maladie pulmonaire avec un profil restrictif et obstructif ;
- 3.4. Pathologies du sommeil ;
- 3.5. Hypoventilation alvéolaire ;
- 3.6. Exposition chronique à l'altitude ;
- 3.7. Anomalie du développement.

Groupe 4 : hypertension pulmonaire liée à une maladie thrombo-embolique chronique

Groupe 5 : Hypertension pulmonaire à mécanismes multifactorielles

- 5.1. Troubles hématologiques : troubles myéloprolifératifs, splénectomie ;
- 5.2. Troubles systémiques : sarcoïdose, hystiocytose, lymphangiomatose, neurofibromatose ;
- 5.3. Troubles métaboliques : maladie de stockage du glycogène, maladie de Gaucher, problèmes thyroïdiens ;
- 5.4. Autres : obstruction tumorale, fibrose médiastinale, insuffisance rénale chronique.

Tableau 1 : classification clinique des hypertensions pulmonaires.

(d'après Simonneau et al., 2009).

3. HTAP IDIOPATHIQUE, HEREDITAIRE ET ASSOCIEE (GROUPE 1)

3.1. Données cliniques

Les HTAP de ce groupe peuvent être idiopathiques, familiales ou associées à diverses pathologies ou à la prise de substances toxiques. Une HTAP **idiopathique** se définit par la survenue de la maladie en l'absence d'affection associée. Environ 6 % des HTAP du groupe 1 sont familiales et environ 60 % des HTAP **familiales** sont associées à une mutation ou à une délétion du gène codant le récepteur de la « bone morphogenetic protein » de type II (BMP-R II) (Haworth, 2006). Les HTAP du groupe 1 peuvent également être **associées** à diverses pathologies telles que les connectivites (lupus érythémateux systémique, sclérodermie etc.), l'hypertension portale, l'infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), etc (Tableau 1). Enfin, les HTAP du groupe 1 peuvent survenir suite à la prise de substances toxiques telles que les anorexigènes, la cocaïne ou les amphétamines.

Les HTAP du groupe 1 sont souvent plus sévères que les HTAP hypoxiques (groupe 3). En effet, la PAPm observée chez les patients atteints d'HTAP du groupe 1 dépasse très souvent 40 mmHg (Weitzenblum *et al.*, 2005).

Sur le plan histologique, l'**artériopathie plexiforme** est une lésion caractéristique des HTAP du groupe 1, elle associe une hypertrophie de la média, une fibrose de l'intima, des lésions plexiformes et des lésions thrombotiques. En effet, on observe une importante hypertrophie de la média (Figure 6D), secondaire à une hypertrophie et une hyperplasie des cellules musculaires lisses, et à une augmentation de la matrice conjonctive et des fibres élastiques de la média. D'autre part, les cellules de la média et de l'adventice vont migrer dans l'intima et participer à son épaissement (Figure 6C). Quant aux lésions plexiformes (Figure 6A et 6B), elles correspondent à des amas de cellules endothéliales impliquées dans un processus d'angiogénèse aberrante. Au plan morphologique, elles consistent en des amas de vaisseaux désorganisés constitués de cellules endothéliales, entourées de myofibroblastes, de cellules musculaires lisses, de cellules inflammatoires (macrophages) et de matrice extracellulaire (Montani *et al.*, 2005). Cet intense remodelage vasculaire a lieu préférentiellement au niveau des artères pulmonaires de petit calibre (< 500 µm) et entraîne une élévation persistante des résistances artérielles pulmonaires.

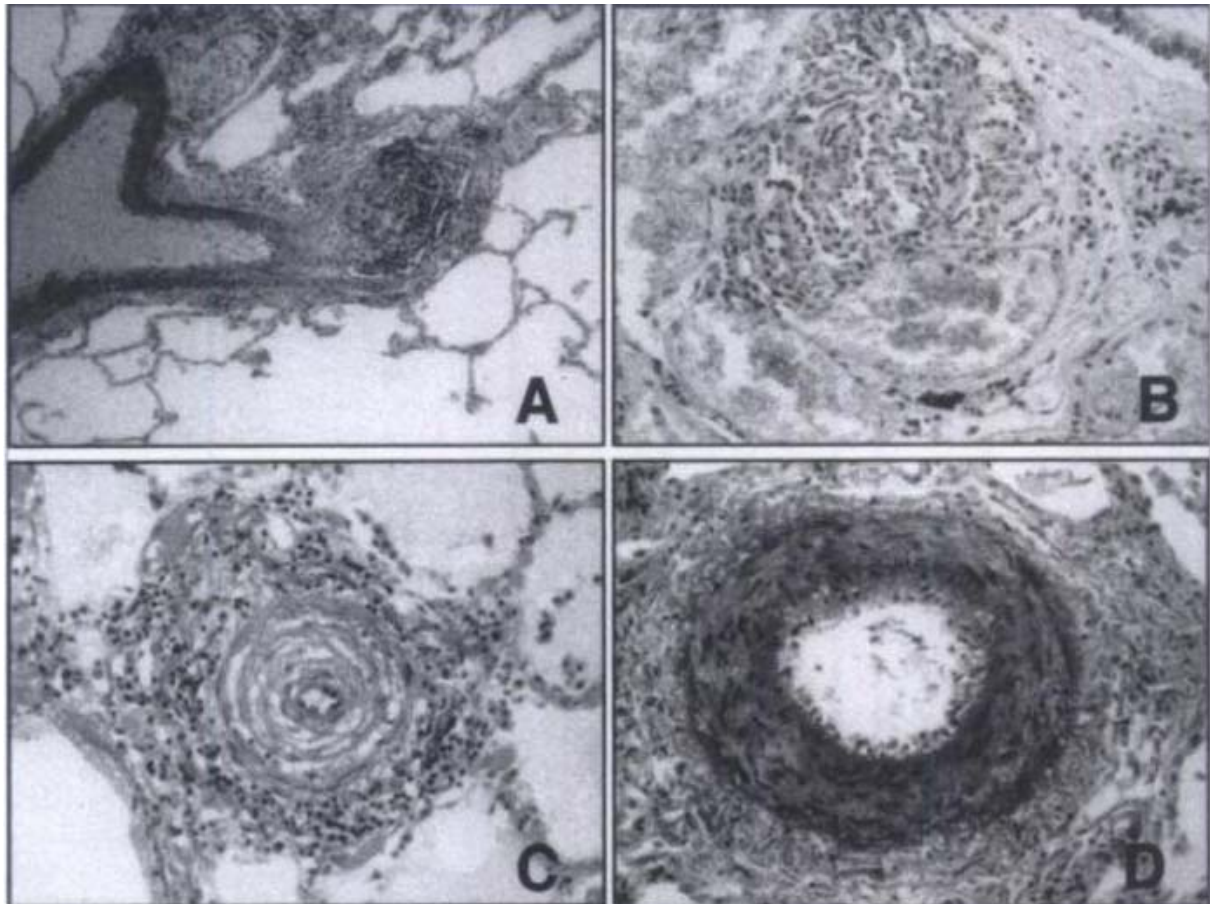


Figure 6 : anatomopathologie de l'HTAP du groupe 1 chez l'homme.

A et B : lésions plexiformes, C : fibrose intimale en bulbe d'oignon, D : hypertrophie de la média. (Humbert et al., 2002).

Sur le plan biologique, ces HTAP sont caractérisées par une **dysfonction endothéliale** due à une augmentation du taux circulant d'ET-1, une augmentation du ratio thromboxane/prostacycline et une réduction de la libération de NO accompagnée d'une réduction de la relaxation NO-dépendante. En parallèle, on observe un dysfonctionnement plaquettaire accompagné d'un taux circulant élevé de 5-HT (Haworth, 2006). Toutes ces modifications affectent non seulement le tonus vasculaire mais entraînent également un remodelage vasculaire pulmonaire intense.

3.2. Modèle animal : le rat monocrotaline (MCT)

Le modèle de rat MCT consiste en une injection unique de monocrotaline par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée, à la dose de 60 mg/kg. La MCT est un alcaloïde de la famille de la pyrrolizidine qui se trouve dans les tiges, feuilles et graines de la plante tropicale *Crotalaria spectabilis*. Bien que ce modèle soit utilisé depuis plusieurs décennies, le mécanisme selon lequel la MCT induit une HTAP reste à élucider. Cependant, la MCT en elle-même n'est pas toxique,

mais doit être métabolisée en MCT pyrrole par les cytochromes P450 3A hépatiques. La MCT pyrrole est ensuite transportée par les hématies dans la circulation sanguine et atteint le poumon, où la substance produit un œdème et une destruction de l'endothélium (Campian *et al.*, 2006).

Ainsi, l'administration de MCT produit initialement une nécrose endothéliale accompagnée d'un œdème pulmonaire visible les deux premières semaines après l'injection. En même temps que l'œdème pulmonaire régresse plus ou moins complètement, il y a un remodelage progressif des artérioles pulmonaires (Figure 7) et installation d'une défaillance cardiaque droite (Naeije *et al.*, 2007). En parallèle, l'augmentation de la synthèse de collagène chez les rats MCT contribue au remodelage (Voelkel *et al.*, 1997). Cependant, contrairement au remodelage observé chez les patients, le remodelage des artères pulmonaires des rats MCT ne comporte pas de lésions plexiformes.

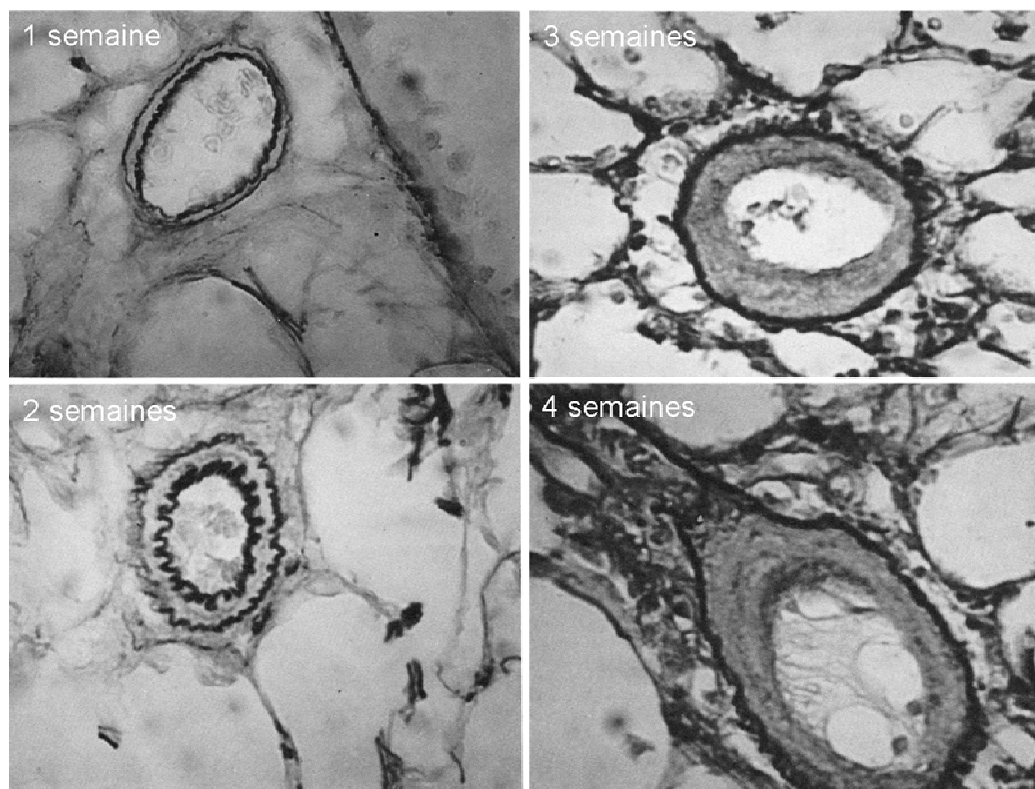


Figure 7 : anatomopathologie de l'HTAP du groupe 1 chez le rat.

Coupes transversales d'artérioles de rats 1, 2, 3 et 4 semaines après injection sous cutanée de MCT. L'épaisseur de la média augmente en fonction du temps (grossissement x 100) (d'après Ghodsi *et al.*, 1981)

Sur le plan biologique, l'intoxication à la MCT s'accompagne d'une augmentation des taux plasmatiques d'ET-1 et de 5-HT qui précèdent toutes deux le développement de l'HTAP (Kanai *et al.*, 1993; Miyauchi *et al.*, 1993). De plus, l'expression de la NO synthase endothéliale est diminuée et la relaxation NO-dépendante est fortement diminuée, confirmant la destruction

modèle ressemblant aux formes familiales d'HTAP liées à un défaut de ce gène (Naeije *et al.*, 2007).

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré une hyperréactivité des artères pulmonaires à divers agonistes comme la 5-HT et l'angiotensine 2 (Hilliker *et al.*, 1985; Kanai *et al.*, 1993).

L'HTAP due à la MCT reste inflammatoire tout au long de son évolution, on observe en effet une surexpression de plusieurs cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TGF- β) (Naeije *et al.*, 2007). De ce fait, ce modèle se rapproche des HTAP familiales et des HTAP associées à une connectivite (lupus érythémateux systémique, sclérodermie etc...) ou au VIH (Dorfmüller *et al.*, 2003).

4. HTAP HYPOXIQUE (GROUPE 3)

4.1. Données cliniques

L'HTAP hypoxique apparaît suite à une hypoxie alvéolaire maintenue. Cette situation peut être physiologique (vie à une altitude supérieure à 3000 m) ou bien, elle peut être pathologique. Une HTAP peut en effet apparaître à la suite de diverses pathologies obstructives touchant les voies aériennes, ces HTAP correspondent au groupe 3 de la classification des hypertensions pulmonaires (Tableau 1). La maladie des voies aériennes la plus communément associée à une HTAP est la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), mais l'HTAP peut également survenir à la suite d'une fibrose pulmonaire (Rich *et al.*, 2008).

Comme décrit précédemment (cf. 1.), la circulation pulmonaire est dotée d'une VHP en cas d'hypoxie transitoire et localisée. Cependant, lorsque l'hypoxie alvéolaire est générale (en altitude ou dans les pathologies obstructives généralisées des voies aériennes), la VHP s'étend à toute la circulation pulmonaire et induit une HTAP. Si cette hypoxie alvéolaire générale devient chronique, apparaît alors un remodelage des vaisseaux incluant un excès de prolifération et une diminution de l'apoptose des cellules de la paroi des vaisseaux pulmonaires (Weissmann *et al.*, 2006). Ainsi, la moitié des patients atteints de BPCO va développer une HTAP modérée (PAPm entre 20 et 40 mmHg) et dans seulement 5 % des cas, une HTAP sévère (PAPm > 40 mmHg) va apparaître (Weitzenblum *et al.*, 2005).

Parallèlement à cette vasoconstriction, le **remodelage** de la circulation pulmonaire de ces patients montre un épaissement majeur des petites artères pulmonaires dû à un épaissement de la média par hypertrophie et hyperplasie des cellules musculaires lisses uniquement. Une fibrose de l'adventice peut également être observée (Voelkel *et al.*, 1997; Weitzenblum *et al.*, 2005).

En parallèle, on observe une réduction de la production des vasodilatateurs comme une diminution de la synthèse et/ou de la libération du NO et une réduction de l'expression de l'ARNm de l'enzyme à l'origine de la production de la prostacycline (prostacycline synthase) (Shujaat *et al.*, 2007). Cette diminution de vasodilatateurs s'accompagne d'une augmentation de la production de divers vasoconstricteurs. Parmi eux, l'ET-1 et la 5-HT voient leur taux plasmatique augmenté, et l'enzyme à l'origine de la production d'angiotensine 2 est présente en très grande concentration chez ces patients (Shujaat *et al.*, 2007). Ces diverses modifications pourraient être à l'origine à la fois du remodelage vasculaire, mais également de la vasoconstriction maintenue observés chez ces patients.

4.2. Modèle animal : le rat hypoxique chronique (HC)

Expérimentalement, ce type d'HTAP peut être reproduit en plaçant des animaux dans un environnement hypoxique. Celui-ci peut être réalisé soit en diminuant le contenu en oxygène de l'air inspiré (hypoxie normobare), soit en diminuant la pression atmosphérique ambiante (hypoxie hypobare).

Dans ce modèle, le remodelage artériel (Figure 8) fait rapidement suite à la constriction hypoxique initiale et ce, grâce à la participation d'un processus inflammatoire transitoire ayant lieu dans les huit premières heures d'hypoxie (Naeije *et al.*, 2007). Après 3 semaines d'hypoxie, le remodelage artériel se limite à une hypertrophie de la média et une légère prolifération adventitielle mais pas d'épaississement intimal, ce qui est similaire à ce qui est observé chez les patients. Par ailleurs, l'infiltration des cellules inflammatoires (macrophages) observée après 8 heures d'hypoxie a totalement disparu après 3 semaines d'hypoxie (Naeije *et al.*, 2007).

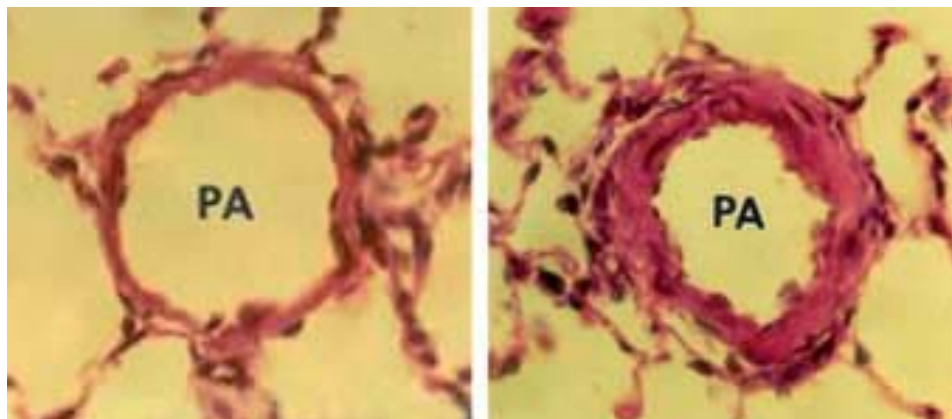


Figure 8 : anatomopathologie de l'HTAP du groupe 3 chez le rat.

Coupes transversales d'artérioles pulmonaires (50-100 µm) de rat normal (à gauche) et de rat soumis à deux semaines d'hypoxie chronique (à droite) (Naeije et al., 2007).

Sur le plan biologique, les rats HC présentent un taux circulant d'ET-1 élevé (Karamsetty *et al.*, 1995), cependant, le taux de 5-HT n'est pas modifié (Eddahibi *et al.*, 1997). L'hypoxie

chronique a également pour conséquence de diminuer la réponse à la prostacycline (Shaul *et al.*, 1991). Contrairement à ce qui est observé chez les patients, les rats HC présentent une surexpression intimale de la NO-synthase, cependant, les données concernant la relaxation NO-dépendante dans ce modèle expérimental sont très controversées (Karamsetty *et al.*, 1995; Shimoda *et al.*, 2000).

L'ET-1 joue un rôle primordial dans l'apparition de l'HTAP, puisque l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A prévient l'apparition de l'HTAP induite par hypoxie chronique chez le rat (Bonvallet *et al.*, 1994). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré une hyperréactivité des artères pulmonaires de rats HC à divers agonistes comme la 5-HT, l'ET-1, l'angiotensine 2, la noradrénaline et l'histamine (Shimoda *et al.*, 2000).

A l'échelle cellulaire, l'hypoxie chronique induit un déséquilibre ionique ainsi que des modifications de l'homéostasie calcique au niveau des cellules musculaires lisses. En effet, on observe une dépolarisation de la membrane des cellules musculaires lisses, une augmentation de la concentration calcique intracellulaire au repos, et des variations de réponses calciques aux agonistes vasoconstricteurs et vasodilatateurs (Lin *et al.*, 2004; Rodat *et al.*, 2007).

Sérotonine et hypertension artérielle pulmonaire

Plusieurs arguments sont à l'origine de l'intérêt actuel suscité par la sérotonine dans le développement de l'HTAP. La prise de médicaments anorexigène interagissant avec le transport de la sérotonine augmente le risque de développer une HTAP du groupe 1. Par ailleurs, des taux élevés de sérotonine plasmatique ont été rapportés chez des patients atteints d'HTAP, et ces taux persistent après transplantation pulmonaire. Ces observations ont mené au concept d'« hypothèse sérotonine ».

Par ailleurs, ce concept était déjà appuyé par des données expérimentales, puisque le rat Fawn-hooded, dont la principale caractéristique est un déficit héréditaire du stockage plaquettaire de la sérotonine, développe spontanément une HTAP (pour revue : Maclean *et al.*, 2009).

Dans cette partie, je décrirai tout d'abord quelques généralités sur le système sérotoninergique, puis j'exposerai les liens connus entre la sérotonine et les différentes formes d'HTAP chez les patients, et sur les modèles animaux d'HTAP.

1. SOURCES DE SEROTONINE

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une amine biogène similaire à l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'histamine. La sérotonine est produite au niveau du système nerveux central par des neurones dont les corps cellulaires sont situés au niveau du raphé. En périphérie, les cellules endocrines assurent la synthèse de sérotonine à différents niveaux : la 5-HT est produite par les cellules entérochromaffines au niveau du tractus digestif (Jonnakuty *et al.*, 2008), et par les cellules neuroendocrines regroupées en corps neuroépithéliaux au niveau pulmonaire (MacLean *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été montré que des cellules endothéliales issues d'artères pulmonaires humaines sont également capables de synthétiser de la sérotonine (Eddahibi *et al.*, 2006).

La sérotonine est produite en deux étapes à partir de l'acide aminé essentiel L-tryptophane (L-trp), apporté par l'alimentation (Figure 9). Le L-trp est hydroxylé par la tryptophane hydroxylase en L-5-hydroxytryptophane (L-5-HTP), précurseur immédiat de la sérotonine. L'hydroxylation du L-tryptophane, qui peut être inhibée par la PCPA (p-chlorophénylalanine), est l'étape limitante de cette biosynthèse. Le 5-HTP est ensuite décarboxylé en 5-hydroxytryptamine ou sérotonine par une enzyme ubiquitaire, la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC: Aromatic Amino acid Decarboxylase). Une fois synthétisée, la sérotonine est stockée dans des vésicules

intracellulaires (granules denses) par un système de transport des monoamines : le VMAT (Vesicular MonoAmine Transporter) (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Cependant la majorité de la sérotonine est libérée dans la circulation sanguine, où elle est majoritairement stockée dans les plaquettes, et minoritairement métabolisée par le foie. La sérotonine circulante résiduelle atteint le poumon où elle est captée au niveau des cellules endothéliales pulmonaires.

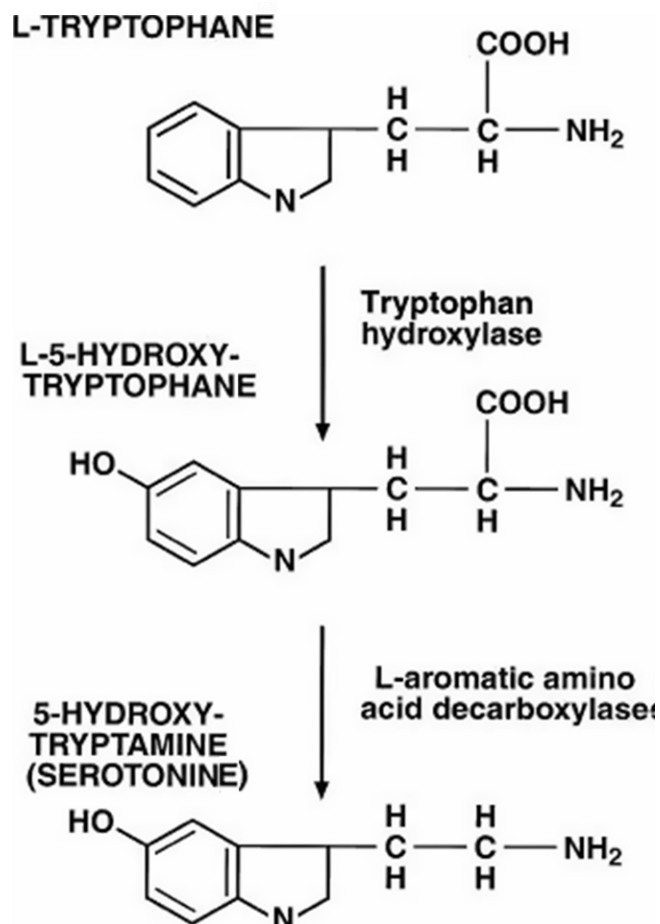


Figure 9 : synthèse de la sérotonine.

(D'après Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008).

La dégradation enzymatique de la sérotonine est effectuée par la monoamine oxydase (MAO), enzyme présente au niveau de la membrane mitochondriale externe. La dégradation de la sérotonine par la MAO conduit à la production d'acide 5-hydroxyindolacétique (5HIAA) qui est excrété dans les urines (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008).

2. LES RECEPTEURS A LA SEROTONINE

Les effets de la sérotonine les plus largement connus concernent le système nerveux central. Ils comprennent, entre autres, le contrôle de l'appétit, du sommeil, de la mémoire, de l'apprentissage, de la thermorégulation, des comportements et des régulations endocrines. En périphérie, la sérotonine joue un rôle majeur dans l'homéostasie plaquettaire, les fonctions

cardiovasculaires, et notamment la régulation de la pression artérielle et la motilité intestinale (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008).

La sérotonine produit ses effets en se liant à des récepteurs présents sur la membrane plasmique. Ces récepteurs sont présents à la fois dans le système nerveux central et périphérique, et dans les tissus non neuronaux tels que le tractus digestif et le système cardiovasculaire. Des expériences de binding utilisant des agonistes et antagonistes spécifiques ont permis de caractériser 14 récepteurs différents classés en 7 familles (5-HT₁ à 5-HT₇) (Hoyer *et al.*, 1994). Parmi ces 7 familles, 6 sont constituées de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G (tableau 2). Les récepteurs de la famille 5-HT₃ appartiennent à la superfamille des récepteurs ionotropiques, ils sont couplés à un échangeur Na⁺/K⁺, et leur activation conduit à une dépolarisation membranaire (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Les récepteurs des familles 5-HT₁ sont négativement couplés à l'adénylate cyclase, l'activation de ces récepteurs aboutit donc à la diminution de la production d'AMP cyclique (AMPc). Les récepteurs de la famille 5-HT₂ sont couplés à la protéine G_q et leur activation induit la formation de diacylglycérol (DAG) et d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) puis l'augmentation de calcium intracellulaire. Les récepteurs 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇ augmentent la production d'AMPc (Hoyer *et al.*, 1994; Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008; Pauwels, 2000).

récepteur	couplage	localisation	rôles physiologiques	phénotype du KO
5-HT _{1A}	G _{1/0}	SNC	- mémoire à long terme, inhibition neuronale, sommeil, thermorégulation et anxiété	- haut niveau d'anxiété
		SNP	- inhibition des potentiels postsynaptiques excitateurs du plexus myentérique	- problème de thermorégulation
5-HT _{1B}		SNC	- mémoire à court et long terme, comportements	- agressivité
		vaisseaux	- vasoconstriction	
5-HT _{1D}		SNC	- migraines	
5-HT _{1E}				
5-HT _{1F}		SNC	- inflammation	
5-HT _{2A}	G _q	SNC	- comportements et apprentissage	- sensibilité aux amphétamines
		muscles lisses	- contraction	
		plaquettes	- agrégation plaquettaire	
5-HT _{2B}		endothélium	- vasodilatation	- partiellement létal (défaut morphogénétique cardiaque)
		tractus digestif	- motilité intestinale	
5-HT _{2c}	SNC	- comportements alimentaires, émotion	- obésité	
5-HT ₃	canal Na ⁺ /K ⁺	SNC	- vomissements	
		SNP	- sécrétion et motilité intestinale	
5-HT ₄	G _s	SNC		- faible activité locomotrice
		cœur	- inotropisme positif	
		tractus digestif	- relaxation muscle lisse intestinal	
5-HT ₅	? (G _s ou G _{1/0})	SNC		- meilleure adaptation dans un environnement stressant
5-HT ₆	G _s	SNC	- apprentissage et mémoire	
5-HT ₇	G _s	vaisseaux	- vasodilatation	- faible niveau de dépression

Tableau 2 : classification des récepteurs à la sérotonine.

KO : Knock out ; SNC : système nerveux central ; SNP : système nerveux périphérique. (Hannon et al., 2008; Hoyer et al., 1994; Jonnakuty et al., 2008; Katzung, 2006; Mohammad-Zadeh et al., 2008).

3. LE TRANSPORTEUR DE LA SEROTONINE

Le transporteur de la sérotonine ou 5-HTT est connu pour son rôle au niveau du système nerveux central consistant à contrôler le niveau de sérotonine dans la fente synaptique. Le transporteur de la sérotonine permet de transférer la sérotonine de l'espace extracellulaire vers le

cytoplasme où la sérotonine est soit dégradée par les MAO, soit recyclée dans les vésicules intracellulaires.

Le 5-HTT est une protéine à 12 domaines transmembranaires appartenant à la famille des transporteurs associés aux ions sodium et chlore. Le transport de la sérotonine en même temps que celui des ions Na^+ et Cl^- nécessite la fixation des 3 composés au 5-HTT, ce qui induit une série de changements conformationnels exposant les sites de fixation sur la face cytoplasmique. Après la libération de la sérotonine et des ions Na^+ et Cl^- dans la cellule, des ions K^+ se lient au 5-HTT, ce qui permet au transporteur de revenir dans sa conformation initiale où les sites de fixation se retrouvent exposés sur la face extracellulaire (Rudnick, 2006).

Dans le système nerveux central, le 5-HTT est localisé dans la membrane plasmique des neurones sérotoninergiques, au niveau de leur corps cellulaire et de leurs terminaisons. A la périphérie, le 5-HTT est localisé dans la membrane plasmique des plaquettes, permettant de maintenir un faible taux plasmatique de sérotonine (10 nM) protégeant ainsi l'organisme de ses effets vasoactifs puissants. Le 5-HTT est également exprimé dans de nombreux tissus (appareil cardiovasculaire, poumons, intestin etc.) (Murphy *et al.*, 2004).

Le promoteur du gène codant le transporteur de la sérotonine présente un polymorphisme avec des séquences répétées « short » (S) et « long » (L). La forme S conduit à un niveau de transcription 2 à 3 fois plus faible du 5-HTT par rapport à la forme L, et il existe une corrélation entre le nombre d'épisodes de dépression nerveuse et la présence du polymorphisme « short » sur les deux allèles chez l'homme (Murphy *et al.*, 2004).

4. SEROTONINE ET CIRCULATION PULMONAIRE

La sérotonine est un puissant vasoconstricteur de la circulation pulmonaire, un agent prolifératif des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires et un agrégant plaquettaire. Cette substance est donc susceptible de participer aux phénomènes de **vasoconstriction**, de **remodelage** et de **thrombose** observés dans l'HTAP.

Dans cette partie, je décrirai les mécanismes impliquant la sérotonine dans la **réactivité** et la **prolifération** des cellules musculaires lisses en conditions physiologiques. Ces deux phénomènes étant caractéristiques de l'HTAP, j'exposerai ensuite les modifications des réponses sérotoninergiques dans les deux types d'HTAP décrits précédemment (HTAP du groupe 1 et du groupe 3).

4.1. Sérotonine et circulation pulmonaire saine

4.1.1. Réactivité vasculaire

Dans l'artère pulmonaire humaine, la vasoconstriction est due à l'activation des récepteurs 5-HT_{1B/1D} (Morecroft *et al.*, 1999), alors que chez le rat, elle est majoritairement due à l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}, et dans une moindre mesure 5-HT_{1B/1D} (MacLean *et al.*, 1996; Rodat-Despoix *et al.*, 2008).

Des études menées au laboratoire ont permis de préciser le mécanisme cellulaire induisant la vasoconstriction à la sérotonine des artères intrapulmonaires de rat. La sérotonine induit une augmentation biphasique de la concentration calcique intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CML-AP) de rat. La phase transitoire est due à une mobilisation des stocks calciques intracellulaires *via* la voie de l'IP₃ suite à l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} couplés à la protéine G_q. Quant à la phase soutenue, elle est due à une entrée de calcium extracellulaire non capacitive correspondant à un influx calcique provenant de canaux cationiques non spécifiques indépendants du voltage mais sensibles à la production d'acide arachidonique (Guibert *et al.*, 2004). Plus précisément, c'est le métabolite de l'acide arachidonique produit par la cytochrome P450 epoxygénase (CYP₄₅₀), l'acide epoxyeicosatriénoïque (EET), qui est à l'origine d'un courant calcique entrant qui ferait intervenir le canal calcique indépendant du voltage TRPV4 (Ducret *et al.*, 2008).

4.1.2. Prolifération des cellules musculaires lisses

La sérotonine induit une hypertrophie et une hyperplasie des CML-AP bovines en culture (Lee *et al.*, 1994). Bien que certaines études aient montré un rôle des récepteurs à la 5-HT dans le processus de prolifération des CML-AP (Lee *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004b; Pitt *et al.*, 1994), la majorité des travaux montrent un rôle prépondérant du 5-HTT dans l'activité mitogène de la 5-HT (Marcos *et al.*, 2003). Les équipes de Pitt et Lee ont mis en évidence un effet mitogène de la sérotonine moins important dans les CML-AP de rat et de bœuf en culture en présence d'inhibiteur des récepteurs 5-HT_{2A} (kétansérine) (Lee *et al.*, 1999; Pitt *et al.*, 1994). Par contre, la même expérience reproduite chez le rat quelques années plus tard par une autre équipe (Eddahibi *et al.*, 1999) n'a pas mis en évidence d'effet de la kétansérine mais a montré une absence d'effet mitogène de la sérotonine en présence d'inhibiteur du transporteur de la sérotonine (fluoxétine et paroxétine). Une étude sur des CML-AP de bovin a, quant à elle, montré l'implication des récepteurs 5-HT_{1B/1D} dans ce processus (Liu *et al.*, 2004b).

Les mécanismes par lesquels la sérotonine exerce son rôle d'agent mitogène impliquent une phosphorylation de la sous-unité régulatrice de la NADPH oxydase Rac1 (Lee *et al.*, 1997). La phosphorylation de Rac1 conduit alors à l'activation de la NADPH oxydase produisant de l'anion superoxyde, celui-ci active ensuite les MAP Kinases qui induisent l'expression de

facteurs de transcription tels que c-Fos et GATA-4 menant à l'hypertrophie et l'hyperplasie des CML-AP (Fanburg *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1999; Maclean *et al.*, 2009). Plus récemment, l'implication des voies de la RhoKinase, des Smad et de la phospholipase D a été mise en évidence dans ce processus (Liu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

4.2. 5-HT et HTAP idiopathique, héréditaire et associée (groupe 1)

En Europe, à la fin des années 1960, la mise sur le marché d'un anorexigène (l'Aminorex®) a été suivie de l'apparition rapide de cas d'HTAP du 1^{er} groupe. Ce n'est cependant qu'en 1996 qu'une étude épidémiologique menée aux Etats-Unis a démontré que la prise de ces anorexigènes pendant plus de 3 mois consécutifs augmente de plus de 23 fois le risque de développer une HTAP (Abenhaim *et al.*, 1996).

Depuis, de nombreuses études ont été conduites majoritairement sur du tissu humain provenant de patients atteints d'HTAP du 1^{er} groupe et sur le modèle MCT, afin de comprendre l'implication de la sérotonine dans le développement des HTAP du groupe 1.

En 1995, l'équipe d'Hervé a mis en évidence une augmentation du taux circulant de sérotonine chez ces patients (Herve *et al.*, 1995). Plus tard, l'importance du 5-HTT dans cette pathologie a été démontrée par plusieurs études. Tout d'abord, la présence du génotype LL du 5-HTT est augmentée chez les patients atteints d'HTAP du groupe 1 (Eddahibi *et al.*, 2001). De plus, l'expression du transporteur 5-HTT est fortement augmentée dans ce type d'HTAP, et plus particulièrement au niveau du muscle lisse (Marcos *et al.*, 2004). Enfin, le rôle du 5-HTT dans l'effet mitogène de la sérotonine a ensuite été précisé dans les CML isolées de patients atteints d'HTAP du groupe 1, les récepteurs n'intervenant pas dans ce processus (Marcos *et al.*, 2004).

Par ailleurs, chez le rat MCT, il existe une hyperréactivité des AP à la sérotonine (Hilliker *et al.*, 1985) et le niveau de sérotonine plasmatique est plus élevé que chez le rat sain. D'autre part, le traitement des rats par un inhibiteur non spécifique des récepteurs 5-HT₂ (DV-7028) diminue la sévérité de l'HTAP induite par la MCT (Kanai *et al.*, 1993; Miyata *et al.*, 2000), démontrant ainsi l'importance des récepteurs 5-HT₂ dans le développement de l'HTAP induite par la MCT. Plus tard, l'implication de 5HT_{2A} a été mise en évidence (Hironaka *et al.*, 2003; Miyata *et al.*, 2000). Des études ont également montré que le traitement avec un inhibiteur du transporteur à la sérotonine (fluoxétine) non seulement prévient mais améliore également l'HTAP induite par la MCT (Guignabert *et al.*, 2005).

4.3. 5-HT et HTAP hypoxique (groupe 3)

Dans la circulation pulmonaire, l'hypoxie aiguë induit une libération de sérotonine des cellules pulmonaires neuroendocrines et des corps neuroépithéliaux distribués dans les voies

aériennes (Johnson *et al.*, 1989). D'autre part, 24h d'hypoxie induisent une augmentation de l'expression et de l'activité du transporteur à la sérotonine dans les CML-AP de rat en culture, ce qui potentialise l'effet mitogène de la 5-HT (Eddahibi *et al.*, 1999). L'augmentation de l'expression du 5-HTT a également été retrouvée dans le muscle lisse des artères pulmonaires de rat HC (Eddahibi *et al.*, 1999).

L'importance de la sérotonine dans le développement de l'HTAP hypoxique a été démontrée grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées n'exprimant pas un récepteur à la sérotonine ou son transporteur :

- Les souris déficientes en 5-HT_{1B} développent une HTAP et un remodelage vasculaire moins sévère que les souris sauvages après hypoxie chronique. De la même façon, les rats traités avec un inhibiteur du récepteur 5-HT_{1B/1D} (GR127935) développent une HTAP hypoxique moins sévère (Keegan *et al.*, 2001).
- Les souris déficientes en 5-HT_{2B} ne développent pas du tout d'HTAP. Après hypoxie chronique, aucun remodelage n'est observé, et la PAPm n'est pas augmentée. Ceci montre ainsi l'importance de ce récepteur dans le développement de l'HTAP hypoxique (Launay *et al.*, 2002).
- Les souris déficientes en 5-HTT développent une HTAP hypoxique moins sévère que les souris sauvages (Eddahibi *et al.*, 2000). A l'inverse, les souris surexprimant le transporteur à la sérotonine développent spontanément une HTAP sans autre stimulus extérieur (MacLean *et al.*, 2004). Il en est de même pour les souris surexprimant le 5-HTT exclusivement dans le muscle lisse (Guignabert *et al.*, 2006). Des études menées sur la souris sauvage montrent que le traitement chronique avec des inhibiteurs du 5-HTT (citalopram et fluoxétine) diminue le développement d'une HTAP hypoxique (Marcos *et al.*, 2003).

Toutes ces études mettent en évidence le rôle majeur à la fois des récepteurs et du transporteur à la sérotonine dans le développement de l'HTAP.

Chez l'humain, le promoteur du gène codant le 5-HTT possède deux régions sensibles à l'hypoxie, de plus l'expression de ce gène est fortement induite par l'hypoxie (Eddahibi *et al.*, 1999). D'autre part, il existe une corrélation entre la sévérité de l'HTAP chez les patients BPCO et le polymorphisme du promoteur du gène codant le 5-HTT. En effet, les patients portant le génotype LL ont une PAPm plus élevée que les patients portant le génotype LS ou SS, alors que le niveau d'obstruction bronchique est équivalent dans les 3 populations (Eddahibi *et al.*, 2003).

D'autre part, les AP de rats atteints d'HTAP hypoxique présentent une hyperréactivité à la sérotonine. La vasoconstriction des artères pulmonaires de rats atteints d'HTAP hypoxique est

due à l'activation à la fois des récepteurs 5-HT_{1B/1D} et des récepteurs 5-HT_{2A} (MacLean *et al.*, 1996).

Les jonctions communicantes

Dans un organisme multicellulaire, la communication entre les cellules d'un même tissu qu'elles soient du même type ou non, est primordiale. Celle-ci peut avoir lieu de deux manières différentes :

- La communication paracrine : une cellule sécrète des hormones, facteurs de croissance, neurotransmetteurs ou des cytokines qui vont aller agir sur des récepteurs extra ou intracellulaires de cellules cibles
- **La communication intercellulaire directe** : les cellules expriment des canaux transmembranaires à leur surface permettant de relier directement, de cytoplasme à cytoplasme, deux cellules adjacentes. Ce sont les **jonctions communicantes**.

Les jonctions communicantes cardiovasculaires ont fait l'objet de nombreuses études. En effet, ces structures sont essentielles et permettent, par exemple, d'homogénéiser l'état de contraction des artères et du cœur. Cependant peu d'études ont été menées sur la circulation pulmonaire en particulier.

Dans cette partie, je décrirai tout d'abord la structure, les propriétés physiologiques et la régulation des jonctions communicantes, puis j'exposerai les différentes techniques utilisées pour étudier la fonctionnalité de ces jonctions communicantes. Enfin, je détaillerai le rôle des jonctions communicantes dans l'appareil cardiovasculaire, ainsi que les quelques études menées sur la circulation pulmonaire.

1. STRUCTURE DES JONCTIONS COMMUNICANTES

1.1. Découverte des jonctions communicantes

Les premières études sur la communication intercellulaire directe étaient principalement descriptives, elles datent des années 50 et faisaient appel à la cryofracture et à la microscopie électronique. Le terme « jonction communicante » trouve son origine dans les travaux de Revel et Karnovsky qui observent alors que la jonction communicante est formée par l'apposition des deux membranes plasmiques, séparées par une mince fente de 2 à 3 nm de large et désignée par le terme « gap » en anglais. En marquant l'espace extracellulaire avec du lanthane colloïdal, des agrégats de particules ou sous-unités protéiques ont été mis en évidence, rangés selon une structure pentalaminaire, qui se révélera typique des « jonctions gap ». Cette observation s'opposait aux jonctions serrées où le lanthane colloïdal ne pouvait pas pénétrer (Revel *et al.*,

1967). Les jonctions communicantes correspondent ainsi à une plaque jonctionnelle constituée de milliers de canaux intercellulaires, qui connectent le cytoplasme de deux cellules voisines (Goodenough *et al.*, 1970).

En condition non pathologique, quasiment tous les types cellulaires possèdent des jonctions communicantes. Les quelques cellules saines qui n'expriment pas de jonctions communicantes sont les cellules musculaires squelettiques adultes, certains neurones, les spermatozoïdes matures et les cellules circulantes du sang (Kumar *et al.*, 1996).

1.2. Découverte de la protéine unitaire : la connexine

En utilisant la diffraction aux rayons X, plusieurs études ont montré que chaque cellule contribue à la formation d'une jonction communicante par la juxtaposition d'un demi-canal ou connexon avec son homologue de la cellule voisine (Caspar *et al.*, 1977; Makowski *et al.*, 1977) (Figure 10). Des études par cryofracture et microscopie de force atomique (AFM) décrivent que les connexons correspondent à une structure large de 3,8 nm avec un pore de 2 nm de diamètre et de 1 nm de profondeur (Saez *et al.*, 2003). La microscopie électronique combinée au traitement d'images et les analyses hydrodynamiques ont montré que chaque connexon consiste en l'assemblage annulaire de 6 sous-unités protéiques transmembranaires appelées connexines (Cx) (Saez *et al.*, 2003) (Figure 10). Durant plusieurs dizaines d'années, les connexons dispersés dans des zones non jonctionnelles étaient considérés comme fermés en permanence pour éviter la mort cellulaire. Mais des études rapportent, depuis une dizaine d'années, que certaines isoformes de connexines forment des connexons qui pourraient être ouverts à l'état basal, au moins dans quelques cellules (Evans *et al.*, 2006).

A l'origine, toutes les jonctions communicantes étaient présumées composées par la même protéine. La diversité des protéines a été mise en évidence par la variation de mobilité électrophorétique entre 27 et 70 kDa à partir de préparations enrichies en jonctions communicantes issues de foie (Henderson *et al.*, 1979). Suite à la découverte rapide de différentes connexines, une nomenclature a été proposée par Beyer (Beyer *et al.*, 1987). Elle est basée sur la masse moléculaire déduite à partir des séquences d'ADNc et de l'addition de l'espèce d'origine en préfixe telle que hCx pour les connexines découvertes chez l'homme.

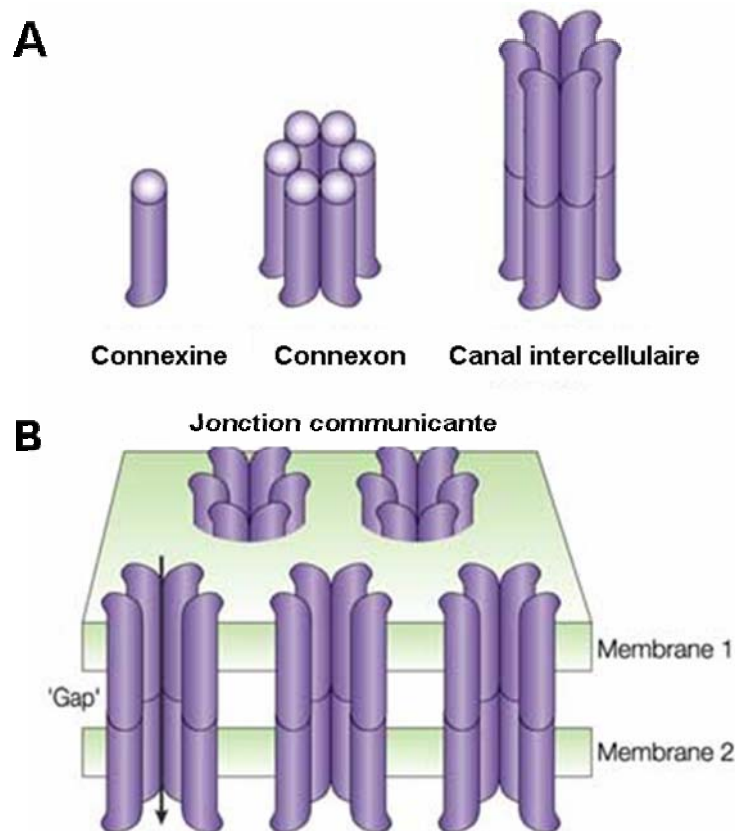


Figure 10 : structure des jonctions communicantes.

Schéma représentant le lien entre connexine, connexon, canal intercellulaire et jonction communicante. Six monomères de connexine s'assemblent pour former un connexon, puis deux connexons s'apposent l'un face à l'autre pour former un canal intercellulaire. Les canaux intercellulaires se regroupent pour former une jonction communicante entre deux cellules séparées par une mince fente ou « gap ». (D'après Goodenough et al., 2003).

1.3. Connexines : sous-unité protéique

Les connexines forment une famille multigénique, dont la plupart des gènes sont situés sur des chromosomes différents. Actuellement, 20 gènes codant les connexines ont été mis en évidence chez la souris, et 21 chez l'homme, 19 étant communs et orthologues (Sohl et al., 2004). La plupart des gènes codant les connexines contiennent deux exons et un intron de longueur variable (Saez et al., 2003). Le premier exon contient seulement une séquence 5' non transcrite et le second exon contient la région codante complète et une séquence 3' non transcrite.

Concernant la topologie des connexines, l'analyse du profil d'hydrophobie des séquences de plusieurs connexines a montré la présence de domaines hydrophobes comprenant chacun 20 à 28 résidus, référencés M1, M2, M3 et M4, depuis l'extrémité N- à l'extrémité C-terminale (Figure 11). Les connexines possèdent également deux boucles extracellulaires (E1 et E2), contenant

chacune 3 résidus cystéine (essentielle pour l'ancrage des connexons l'un face à l'autre) et une boucle cytoplasmique entre M2 et M3. Enfin, les extrémités N- et C- terminales sont cytoplasmiques (Yancey *et al.*, 1989) (Figure 11).

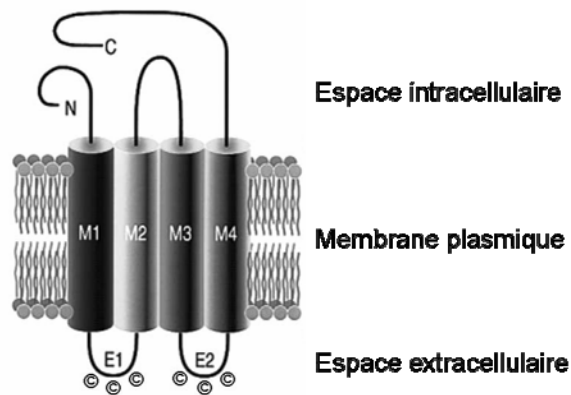


Figure 11 : structure topologique d'une connexine.

(D'après Sohl *et al.*, 2004).

Les quatre domaines transmembranaires et plus particulièrement les boucles E1 et E2 sont des régions très conservées ; à l'inverse, la boucle intracellulaire et le domaine C-terminal sont très variables (Kumar *et al.*, 1986). Ainsi, l'extrémité C-terminale de la Cx 26 possède seulement 18 résidus, et la Cx 46 en possède 191, ceci explique les variations de poids entre les isoformes. M1, M2 et M3 sont constitués principalement de résidus hydrophobes et M3 contient aussi un certain nombre de résidus chargés positivement et négativement, ce qui laisse à penser que M3 représente la paroi du pore du canal intercellulaire (Bennett *et al.*, 1991).

1.4. Cycle de vie des connexines

Pour des cellules en culture, la demi-vie de la plupart des connexines est très courte, elle est comprise entre 1,5 et 4 heures (Berthoud *et al.*, 2004).

1.4.1. Synthèse et assemblage

La synthèse des connexines, l'acquisition de la topologie transmembranaire ainsi que leur oligomérisation en hémicanal se déroulent dans le réticulum endoplasmique (RE). Les connexons sont ensuite stockés dans le réseau transgolgien (Figure 13) (Segretain *et al.*, 2004).

Un connexon peut être homomérique s'il est constitué d'isoformes de connexines identiques, à l'inverse, l'association de différentes connexines conduit à la formation de connexons hétéromériques. De la même façon, un canal intercellulaire peut être homotypique ou hétérotypique comme le détaille la figure 12.

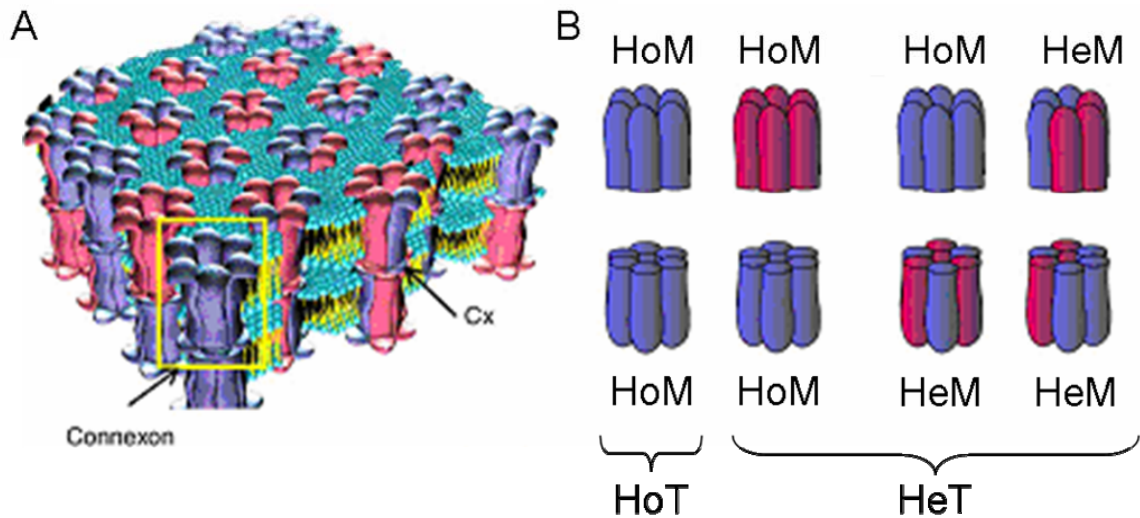


Figure 12 : assemblage des connexines.

Schéma représentant les différentes possibilités d'assemblage des connexines (Cottrell *et al.*, 2005). A : dessin illustrant les différentes possibilités de canaux à partir de cellules exprimant deux connexines (rouge et bleue). B : dessin illustrant les connexons homo/hétéromériques (HoM/HeM) et les canaux intercellulaires homo/hétérotypiques (HoT/HeT) formées à partir de deux isoformes de connexines (rouge et bleue).

La fixation « bout à bout » de deux connexons se produit grâce à des interactions non covalentes entre les boucles extracellulaires des connexines, qui par leurs trois résidus cystéines forment des ponts disulfures (Yeager *et al.*, 1996).

1.4.2. Transport et adressage à la membrane

Une fois assemblés, les connexons sont transportés à l'intérieur de vésicules le long des microtubules, depuis l'appareil de Golgi, vers la membrane plasmique (Lauf *et al.*, 2002). Une fois insérés dans la membrane plasmique, les connexons diffusent librement le long de la bicouche lipidique sous le guidage de N et E-cadhérine (Figure 13) (Laird, 2006). Le contact entre deux cellules provoque en quelques minutes une concentration des connexons qui s'associent bout à bout avec ceux de la cellule voisine pour donner naissance à une plaque de jonctions communicantes. Les connexons nouvellement formés se trouvent sur la couronne externe de la plaque tandis que les canaux les plus anciens sont eux au centre des plaques (Gaietta *et al.*, 2002). Les canaux sont donc distinctement localisés en fonction de leur âge : actuellement, on suppose que les canaux au centre des plaques sont destinés à être internalisés puis dégradés (Laird, 2006).

1.4.3. Internalisation et dégradation

La dégradation des jonctions communicantes ne correspond pas à la séparation des hémicanaux mais à l'internalisation des jonctions communicantes en jonctions annulaires (Figure 13) (Gaietta *et al.*, 2002). Les jonctions annulaires, également appelées connexosomes, se distinguent par une centaine de canaux quittant la surface cellulaire sous forme de vésicule pentalaminaire, c'est-à-dire contenant à la fois les connexons et la membrane cytoplasmique des deux cellules adjacentes (Jordan *et al.*, 2001). Ce phénomène d'internalisation massive déclenche une brusque diminution de la communication intercellulaire. Ces jonctions annulaires seront par la suite détruites par voies lysosomale et protéosomale dépendantes de l'ubiquitine (Berthoud *et al.*, 2004) (Figure 13). D'autre part, les connexons peuvent être internalisés par endocytose, ils seront ensuite dégradés par les voies lysosomale et protéosomale.

La mise en place de la communication intercellulaire dépend donc de l'exécution coordonnée d'une série d'évènements schématisés dans la figure 13, incluant (Bruzzone *et al.*, 1994) :

- La synthèse des connexines (1)
- L'oligomérisation des monomères de connexines en connexons (2)
- La translocation des connexons sur la membrane plasmique et l'accumulation au site d'apposition cellule-cellule (3 à 7)
- L'interaction avec le connexon « partenaire » de la cellule adjacente (8)
- L'ouverture du canal intercellulaire formé.

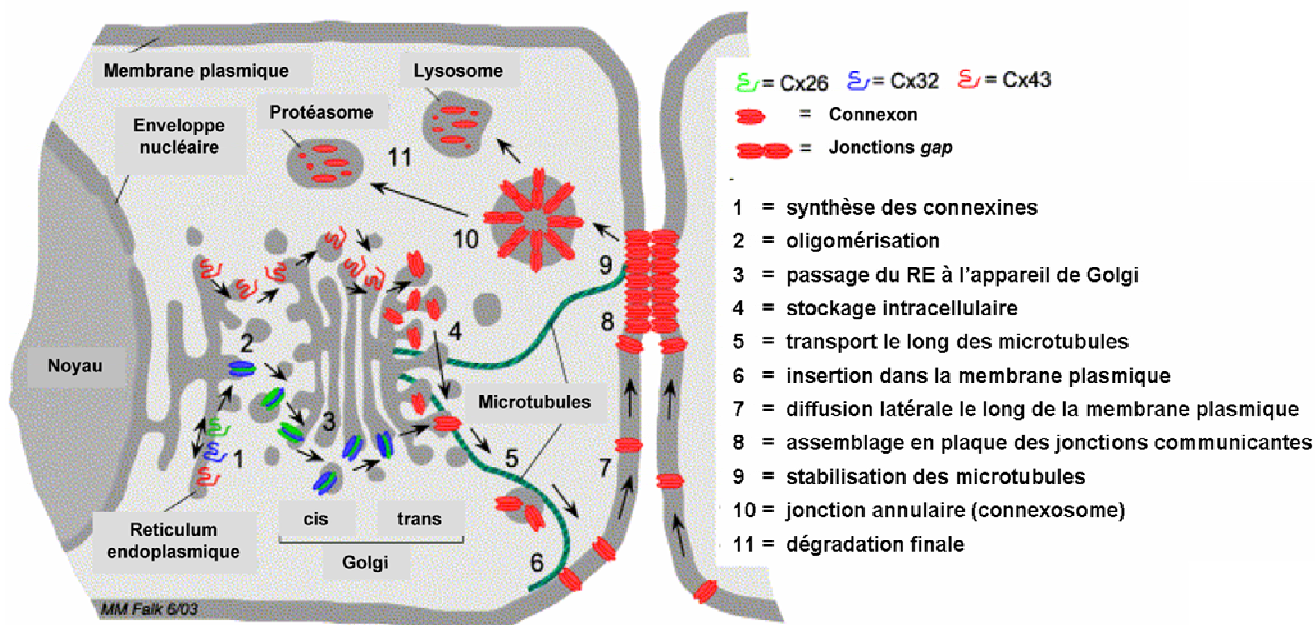


Figure 13 : cycle de vie des connexines

Représentation schématique des étapes de la synthèse, de l'assemblage et de la dégradation des jonctions communicantes (d'après Segretain et al., 2004).

2. PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES

On retrouve chaque type de connexine dans plusieurs tissus et la plupart des cellules synthétisent plusieurs connexines. Chaque isoforme produit des canaux ayant différentes propriétés de conductance unitaire, de perméabilité moléculaire et une sensibilité propre à la régulation chimique et électrique. Lorsqu'un canal est hétéromérique, les connexines qui composent les connexons vont déterminer ses propriétés. Du fait qu'il existe au moins 21 connexines, il existe 190 possibilités de conformations de jonctions communicantes hétérotypiques faisant ainsi varier leur propriété (Cottrell et al., 2005).

2.1.1. Couplage électrique

Les jonctions communicantes permettent le passage de courant ionique entre les cellules, permettant ainsi une communication électrique. Ce couplage a été détecté par un enregistrement effectué avec des microélectrodes de haute résistance placées entre des cellules cardiaques (Weidmann, 1952). En 1963, par microscopie électronique, une corrélation a été décrite entre le couplage électrique et la présence de jonctions communicantes (Robertson, 1963). Le couplage électrique, mis en évidence dans un premier temps dans des tissus excitables, fut ensuite démontré dans les tissus épithéliaux tels que les hépatocytes de souris (Penn, 1966). Le couplage électrique par échange d'ions est indispensable à certains types cellulaires dont les fonctions sont associées à une dépolarisation (neurones, cellules musculaires lisses, cellules sécrétrices et sensorielles). Cette forme de couplage génère une réponse synchronisée des

cellules (Bruzzone *et al.*, 1996b). Le couplage électrique peut être évalué en mesurant la conductance des jonctions communicantes par la technique de patch clamp (cf 4.3. de la partie « les jonctions communicantes »).

La perméabilité des canaux formant les jonctions communicantes est unique pour chaque isoforme de connexine (Brisset *et al.*, 2009). Ainsi, la perméabilité d'un canal intercellulaire sera définie par sa composition en connexine. La perméabilité des jonctions communicantes est aussi fonction d'autres paramètres tels que le nombre de plaques jonctionnelles au niveau de la membrane de la cellule considérée (Weber *et al.*, 2004) et de la probabilité d'ouverture d'une jonction communicante, variant de 0,6 à 0,9 (Goldberg *et al.*, 2004).

Le passage des ions d'une cellule à l'autre se fait le long d'un gradient électrochimique. D'une façon générale, toutes les molécules de poids supérieur à 1kDa ne pourront pas diffuser *via* les jonctions communicantes quel que soit le type de connexine dont elles sont composées. Par ailleurs, la conductance unitaire est comprise entre 10 et 300 pS (Harris, 2007).

2.1.2. Couplage métabolique

La diffusion de molécules hydrophiles par les jonctions communicantes a été mise en évidence dans les années 60 (Kanno *et al.*, 1966). Différentes approches ont montré que les jonctions communicantes sont perméables à des nucléotides, des acides aminés, des cofacteurs vitaminiques, des petits peptides, des sucres et des seconds messagers (AMPc, IP₃) (Saez *et al.*, 2003). Cette propriété met en avant l'importance des jonctions communicantes pour certaines fonctions biologiques essentielles (prolifération, différenciation, contraction, etc.).

2.1.3. Rôles physiologiques

La distribution des connexines quasiment à toutes les cellules montre la participation des jonctions communicantes à de multiples fonctions. Certaines connexines sont produites par de très nombreux types cellulaires comme la Cx 43 alors que d'autres connexines ont une distribution restreinte comme la Cx 30.3 (Bruzzone *et al.*, 1996a).

Les canaux intercellulaires participent à la régulation de divers processus tels que :

- La contraction du muscle cardiaque où les jonctions communicantes permettent la propagation de l'activité électrique dans les tissus auriculaires et ventriculaires (Herve *et al.*, 2008) ;
- La contraction du muscle lisse (Risek *et al.*, 1990). Ainsi, juste avant l'accouchement, on observe une multiplication par cinq du nombre de jonctions communicantes en corrélation avec une hausse de l'expression des Cx 43 dans le muscle utérin en réponse à la modification du taux d'hormones stéroïdiennes. Ce processus permettrait à l'utérus

d'effectuer des contractions synchrones pour développer la force nécessaire à la délivrance de l'enfant (Doring *et al.*, 2006) ;

- La relaxation du muscle lisse où les jonctions communicantes interviennent dans l'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (Cf 5.5.2. de la partie « les jonctions communicantes »)
- La transmission des signaux neuronaux aux synapses électriques (Bennett, 1997; Furshpan *et al.*, 1957). Les jonctions communicantes permettent le couplage électrique entre les neurones et pourraient réguler et/ou synchroniser le réseau d'activité neuronal ;
- La compartimentation cellulaire lors du développement embryonnaire. Les connexines sont exprimées dès le stade 8 cellules, et la communication intercellulaire intervient dans la génération des gradients morphogènes. Ces derniers sont à l'origine, entre autres, du développement de structures morphologiques spécifiques et des organes (Wei *et al.*, 2004) ;
- Le contrôle de la croissance cellulaire (Loewenstein *et al.*, 1992). La communication intercellulaire est considérée comme un mécanisme régulateur clé de l'homogénéisation de la croissance cellulaire puisqu'elle permet l'échange de métabolites, en particulier l'AMPc (Vinken *et al.*, 2006).

2.1.4. Jonctions communicantes et pathologies

Des études cliniques ont permis l'identification d'un nombre croissant de maladies génétiques causées par des mutations des connexines (tableau 3). Actuellement, huit maladies distinctes sont liées directement à des mutations germinales des connexines, de la plus courante : la surdité neurosensorielle non syndromique due à une mutation de la Cx 26 ; à la plus rare et la plus grave : la dysplasie Occulo-Dento-Digitale (ODDD) due à une mutation de la Cx 43 (Laird, 2006). Le gène de la Cx 32 peut également être atteint : environ 270 mutations sont décrites menant au syndrome de Charcot-Marie-Tooth lié au chromosome X (CMTX). Cette pathologie est la première maladie héréditaire découverte liée à une mutation des connexines (Bergoffen *et al.*, 1993). De la famille des neuropathies périphériques, elle se caractérise par une dégénérescence progressive de la gaine de myéline entourant les axones.

Connexine	maladie humaine héréditaire
Cx 26	surdité neurosensorielle non syndromique - hyperkératose palmoplantaire
Cx 30	surdité neurosensorielle non syndromique - dysplasie ectodermique hidrotique
	perte de cheveux - d�ficiency mentale
Cx 31	baisse de l'audition - neuropathies périphériques
Cx 32	syndrome de Charcot-Marie-Tooth lié au chromosome X
Cx 36	épilepsie myoclonique juvénile
Cx 43	dysplasie oculo-dento-digitale - hétérotaxie visc�roatriale
Cx 46	cataracte congénitale
Cx 50	cataracte héréditaire

Tableau 3 : maladies héréditaires associées à des mutations des connexines.

(Bergoffen *et al.*, 1993)

3. REGULATION DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE

Le degré de couplage intercellulaire est finement régulé selon trois voies : le nombre de canaux présents à la membrane, leur état fonctionnel et leur perméabilité. Ces régulations sont majoritairement dues à des phosphorylations des connexines, mais sont également dues à la sensibilité des connexines à divers stimulus (variations de calcium, de pH etc.).

3.1. Les phosphorylations

Les phosphorylations des connexines se font principalement au niveau de la partie C-terminale intracellulaire, quelques connexines peuvent être phosphorylées au niveau de la boucle intracellulaire, mais aucune phosphorylation n'a été mise en évidence au niveau de la partie N-terminale actuellement (Solan *et al.*, 2009). La Cx 26 est la seule connexine à ne pas être phosphorylée (Traub *et al.*, 1989) en raison du faible nombre d'acides aminés de son extrémité C-terminale (18 acides aminés). Puisque la Cx 26 forme des canaux fonctionnels, la phosphorylation des connexines n'est pas indispensable à la formation de jonctions communicantes fonctionnelles.

De nombreuses études ont été menées sur le rôle des phosphorylations de la Cx 43. Ainsi, par analogie avec la Cx 26, des mutants de la connexine 43 dont l'extrémité C-terminale est tronquée, peuvent néanmoins former des canaux intercellulaires fonctionnels, mais ils présentent alors une perméabilité différente ainsi que des propriétés électrophysiologiques modifiées par rapport à la Cx 43 sauvage (Fishman *et al.*, 1991). De plus, la coupure des 130 derniers résidus de la Cx 43 (correspondant à sa partie C-terminale comprenant une vingtaine de résidus sérine)

n'a aucun effet sur l'oligomérisation. Cependant cette protéine tronquée apparaît alors transportée vers la membrane plasmique avec moins d'efficacité (Saez *et al.*, 2003).

D'autre part, de nombreuses équipes ont mis en évidence que la Cx 43 est phosphorylée différemment tout au long de son cycle de vie. On distingue plusieurs isoformes électrophorétiques avec une forme qui migre plus rapidement : la Cx 43 non phosphorylée (P0 ou NP) et deux formes phosphorylées qui migrent plus lentement appelées communément P1 et P2 (Musil *et al.*, 1990). La majorité de ces phosphorylations ont lieu sur des résidus sérine, bien que quelques cas de phosphorylation au niveau de résidus tyrosine aient été décrits (Lampe *et al.*, 1998). Plusieurs sites de la Cx 43 peuvent être phosphorylés en même temps : au moins 5 résidus sérine phosphorylés ont été découverts au niveau de la Cx 43 isolée de cellule non stimulée et davantage dans des cellules traitées avec un facteur de croissance ou un activateur de kinase (Cooper *et al.*, 2000).

La Cx 43 n'est pas nécessairement phosphorylée au niveau des régions non jonctionnelles de la membrane plasmique, alors que la Cx 43 localisée dans les jonctions communicantes est majoritairement phosphorylée sous la forme P2 (Musil *et al.*, 1991). Ces événements de phosphorylation ont été corrélés avec des changements dans l'assemblage, l'ouverture et la dégradation des canaux composés de Cx 43. Ces modifications dépendent du site de phosphorylation de la Cx 43, et donc de la protéine kinase à l'origine des phosphorylations. Par exemple, la protéine kinase C (PKC) est connue pour phosphoryler les sérines 262 et 368. La phosphorylation de la sérine 262 potentialise la progression du cycle cellulaire, alors que la phosphorylation de la sérine 368 diminue de moitié la conductance unitaire des canaux intercellulaires composés de Cx 43 (Solan *et al.*, 2009). Quant à la MAP kinase, elle phosphoryle les sérines 255, 279 et 282, aboutissant à la diminution du temps d'ouverture des canaux intercellulaires (Solan *et al.*, 2009). La caséine kinase 1, quant à elle, phosphoryle les sérines 325, 328 et 330 ce qui potentialise l'assemblage des Cx 43 en connexons (Solan *et al.*, 2009).

3.2. Autres modes de régulation

L'ouverture des jonctions communicantes semble pouvoir être modulée par des événements dépendants du calcium puisqu'une forte augmentation de la concentration intracellulaire de calcium déclenche leur fermeture (Lurtz *et al.*, 2007). En particulier, la régulation de la perméabilité de la Cx 43 est due à la présence d'un site de liaison de la calmoduline au niveau de la boucle intracellulaire de la Cx 43 (Zhou *et al.*, 2007).

Des sites de régulation des canaux en fonction du pH intracellulaire ont été décrits au niveau des connexines. L'acidification du milieu intracellulaire induit un changement

conformationnel de la Cx 43 où le domaine C-terminal se lie à un résidu histidine situé au niveau de la boucle intracellulaire. Ceci aboutirait à la fermeture du canal intracellulaire (Wei *et al.*, 2004).

De la même façon, selon leur composition en connexines, les jonctions communicantes sont sensibles au potentiel transjonctionnel. Des études ont permis de diviser les connexines en deux groupes en fonction de la polarité à laquelle le canal se ferme : positive pour les Cx 26, 30, 37, 40, 46 et 50 ou négative pour les Cx 32, 43, 45 ou 31 (Gonzalez *et al.*, 2007).

De nombreuses connexines interagissent *via* leur domaine C-terminal avec d'autres protéines. Parmi celles-ci, les protéines membranaires constitutives ou associées à des jonctions autres que les jonctions communicantes (*Zonula occludens* (ZO-1) et les protéines de la famille des cadhérines), des protéines du cytosquelette (actine, tubuline), des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire (cavéoline) et des enzymes (protéine kinase C, protéines phosphatases). Par ces diverses associations, les connexines entrent dans la composition de complexes multiprotéiques ou microdomaines, où les différents acteurs de la signalisation intracellulaire sont regroupés (pour revue : Hervé *et al.*, 2007).

4. METHODES D'ETUDE DES JONCTIONS COMMUNICANTES

Diverses méthodes sont utilisées par de nombreuses équipes et permettent d'évaluer la fonctionnalité des jonctions communicantes, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

4.1. Outils pharmacologiques

Il existe une grande diversité de composés capables d'inhiber la communication intercellulaire *via* les jonctions communicantes. Cependant, la plupart d'entre eux présentent un intérêt limité car ils sont peu spécifiques dans la mesure où ils modifient l'intégrité membranaire générale (Salameh *et al.*, 2005). Par exemple, les alcools aliphatiques octanol et heptanol provoquent une désorganisation locale des lipides membranaires menant à la compression des connexons et d'une façon générale de tous les canaux membranaires (Matchkov *et al.*, 2004). D'autres inhibiteurs souvent utilisés tels que les acides 18 α - et 18 β -glycyrrhétinique et le carbénoxolone entrent dans la cellule et induisent des modifications métaboliques souvent reflétées par une déphosphorylation de la Cx 43 (Guan *et al.*, 1996).

C'est au début des années 90 que sont apparus des outils pharmacologiques plus spécifiques : les peptides mimétiques. Ces oligopeptides sont identiques à une courte séquence d'acides aminés des boucles extracellulaires des connexines. Initialement, ces peptides ont été créés pour inhiber sélectivement les jonctions communicantes, mais il a été montré qu'ils peuvent également inhiber les hémicanaux (Evans *et al.*, 2006). Les peptides les plus utilisés actuellement sont les Gap 26 et Gap 27, correspondant aux séquences d'acides aminés présentes

respectivement sur la première et la seconde boucle extracellulaire des connexines (Chaytor *et al.*, 1997). Les séquences peptidiques contiennent des domaines conservés (VCYDK pour le Gap 26 et SRPTEK pour le Gap 27) et des domaines variables leur conférant leur spécificité à telle ou telle connexine. Les peptides mimétiques agissent spécifiquement sur les isoformes de connexines dont ils sont analogues (Matchkov *et al.*, 2006), il en existe actuellement 5 :

- ³⁷⁻⁴³ Gap 27 : SRPTEKTIFII (Chaytor *et al.*, 1997) ;
- ⁴⁰ Gap 27 : SRPTEKNVFIV (Chaytor *et al.*, 2005) ;
- ⁴³ Gap 26 : VCYDKSFPISHVR (Chaytor *et al.*, 1997) ;
- ³⁷⁻⁴⁰ Gap 26 : VCYDQAFPISHIR (Chaytor *et al.*, 2005) ;
- ⁴⁵ Gap 27 : SRPTEKTIFLL (Sorensen *et al.*, 2008).

Ces peptides se fixent au niveau des boucles extracellulaires des connexines, empêchant ainsi l'apposition des connexons l'un face à l'autre. Cependant, ces peptides peuvent également agir sur des jonctions communicantes déjà formées. Il a donc été proposé qu'ils sont capables d'ouvrir une plaque de jonctions communicantes à la manière d'une fermeture éclair (Berthoud *et al.*, 2000) (Figure 14). Ces peptides inhibent le transfert de fluorophores (Chaytor *et al.*, 1997), le couplage électrique (Dora *et al.*, 1999) et la synchronisation des oscillations calciques dans le muscle lisse (Martin *et al.*, 2005).

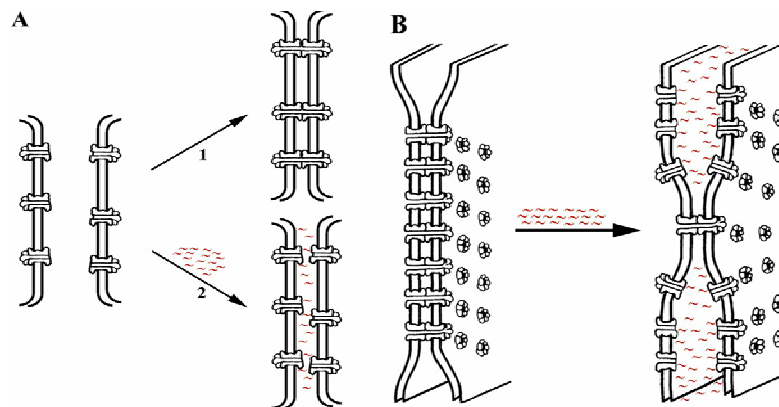


Figure 14 : mode d'action supposé des peptides mimétiques.

A : inhibition de l'ancrage des connexons, B : ouverture de jonctions communicantes déjà formées (d'après Berthoud et al., 2000).

Cependant, tous ces outils pharmacologiques, même utilisés à faibles doses, ont toujours été sujets à controverse en ce qui concerne leur spécificité (Brisset *et al.*, 2009). Afin de parer à ceci, des outils moléculaires ont été développés, comme l'interférence ARN (siRNA), cependant,

leur utilisation est limitée aux cultures cellulaires, et on ne peut pas s'affranchir d'un éventuel problème de compensation de la connexine non exprimée par d'autres connexines.

4.2. Diffusion de traceurs

La plupart des méthodes disponibles pour étudier les jonctions communicantes utilisent des colorants non toxiques introduits dans les cellules vivantes, la mobilité de ces colorants au sein des cellules d'un tissu ou de tapis de cellules donne une indication du couplage intercellulaire. Les colorants utilisés doivent être assez petits pour traverser les jonctions communicantes (*i.e.* < 1 kDa) et ne doivent pas traverser la membrane plasmique par diffusion (Abbaci *et al.*, 2008).

4.2.1. Traceurs non perméants

Le jaune de Lucifer peut être introduit dans la cellule selon plusieurs méthodes. La microinjection (Figure 15A) a été la première technique utilisée (Kanno *et al.*, 1966). Puisque cette technique permet de charger une cellule de façon sélective, elle a l'avantage d'apporter des informations spécifiques à une cellule. Outre les difficultés techniques de cette méthode, sa principale limite est due à l'introduction de la micropipette au travers de la membrane qui conduit à des changements soudains de potentiel de membrane ou de concentration ionique intracellulaire pouvant altérer les jonctions communicantes.

Par la suite, d'autres méthodes ont été développées afin de charger les cellules avec les colorants. La technique de « scrap loading » (Figure 15B) par exemple consiste à tracer un trait au scalpel sur un tapis de cellule de façon à léser les cellules, le colorant peut alors rentrer dans les cellules ouvertes et une fois que l'intégrité de la membrane est rétablie, le traceur se retrouve piégé dans la cellule. Bien que nécessitant peu de moyens techniques, cette méthode n'apporte que des résultats qualitatifs car la quantité de colorant chargé est difficile à maîtriser, et non uniforme (Abbaci *et al.*, 2008). L'incorporation de colorant par électroporation (Figure 15C) a également été développée, et a apporté de très bons résultats (De Vuyst *et al.*, 2008).

4.2.2. Traceurs perméants

L'utilisation de molécules perméables à la membrane a permis de s'affranchir de tous les biais des techniques d'injection de colorant. Une des méthodes développées à la fin des années 1990 est le test de précharge ou le test parachute (Figure 15E) (Ziambaras *et al.*, 1998). Cette méthode consiste à précharger un tapis de cellules avec un fluorophore perméant tel que la calcéine acétoxyméthylester (calcéine-AM) ou le CarboxyFluorescein DiAcetate (CFDA). Ces fluorophores pénètrent dans la cellule grâce aux groupement lipophiles (AM ou DA), puis l'hydrolyse de ces groupements par des estérases membranaires et cytosoliques piège les fluorophores dans les cellules. Ensuite on applique un second tapis de cellules non chargées sur

le premier tapis préchargé, le temps que les jonctions communicantes se forment entre les deux couches de cellules (*i.e.* 15 minutes à 3 heures). La diffusion du fluorophore *via* les jonctions communicantes dans la seconde couche cellulaire peut alors être observée. Cette technique a par la suite été adaptée aux tissus, et a notamment permis d'étudier la fonctionnalité des jonctions myoendothéliales dans les vaisseaux (Griffith *et al.*, 2002). Cette méthode s'utilise sur des vaisseaux pressurisés, dans lesquels un flux de liquide peut être appliqué : les cellules endothéliales sont chargées en faisant passer la sonde fluorescente perméante dans la lumière des vaisseaux. Après lavage de la sonde en excès, le vaisseau est remis en condition physiologique afin de laisser la sonde fluorescente diffuser dans le muscle lisse sous-jacent *via* les jonctions présentes à l'interface entre les CE et les CML (*i.e.* : les jonctions myoendothéliales).

La méthode la plus adaptée est certainement la technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching ; Figure 15D). Initialement, cette technique a été élaborée dans le but de mesurer la diffusion dans la membrane, le cytoplasme et les organelles, de macromolécules marquées avec un fluorophore. Les molécules fluorescentes situées dans une région de la cellule sont photoblanchies en utilisant un laser de forte intensité, et le mouvement, dans la zone photoblanchie, des molécules fluorescentes non photoblanchies environnantes est enregistré avec un laser d'intensité moins importante (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001). La cinétique de ce retour de fluorescence étant modélisée, on peut déterminer la constante de diffusion de la molécule fluorescente. La technique de FRAP peut être appliquée à l'étude des jonctions communicantes, en utilisant une molécule fluorescente exogène telle que le CFDA ou la calcéïne-AM. Si le traceur est alors hydrophile et que sa taille n'excède pas 1 kDa, alors le degré de fluorescence associée au retour de la fluorescence est directement proportionnel au degré de couplage des cellules par les jonctions communicantes.

Basée sur un principe sensiblement analogue, la technique d'activation locale d'une sonde fluorescente (LAMP : Local Activation of Molecular fluorescent Probe ; Figure 15F) utilise des molécules photoactivables telles que le coumarine 1-(2-nitrophenyl)ethyl cagé. Ces molécules sont lipophiles et traversent la membrane plasmique où des estérases vont les hydrolyser de façon à les retenir dans le cytoplasme des cellules. Une illumination brève d'une seule cellule va rendre la molécule photoactivable fluorescente et son intensité de fluorescence est suivie dans le temps et dans l'espace comme dans la méthode de FRAP (Abbaci *et al.*, 2008).

Ces deux dernières méthodes présentent de nombreux avantages : en plus d'être non invasives, elles permettent d'obtenir des données quantitatives de la perméabilité des jonctions communicantes. En effet, elles permettent de définir un coefficient de perméabilité, alors que les techniques de microinjection et de « scrap loading » apportent seulement des informations sur la fonctionnalité des jonctions communicantes et sur la taille des molécules perméantes.

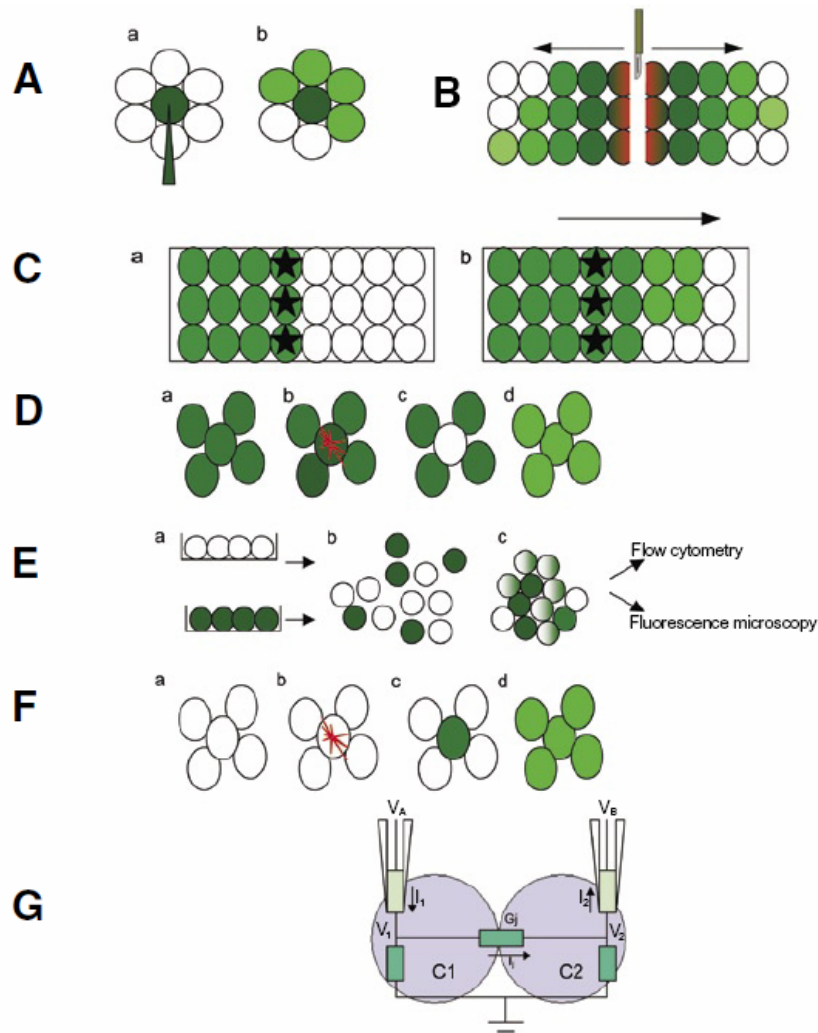


Figure 15 : méthodes d'études de la communication intercellulaire via les jonctions communicantes.

A : microinjection (a : charge des cellules, b : diffusion du traceur), B : « scrap loading », C : electroporation (a : charge des cellules, b : diffusion du traceur), D : FRAP (a : charge des cellules, b : application d'un laser de forte intensité, c : photoblanchiment de la zone d'intérêt, d : diffusion du traceur), E : test de précharge ou de parachute (a : charge des cellules, b : coculture de cellules chargées et non chargées, c : diffusion du traceur), F : LAMP (a : charge des cellules, b : application d'un laser de forte intensité, c : photoactivation de la zone d'intérêt, d : diffusion du traceur), G : double patch clamp (Abbaci et al., 2008).

4.3. Electrophysiologie

La technique de double patch clamp en cellule entière (Figure 15G) consiste à placer une électrode par cellule sur un couple de cellules. L'électrode placée sur la première cellule permet d'imposer un potentiel donné (appelé potentiel transjonctionnel), celui-ci va induire un courant dans la seconde cellule qui pourra être mesuré par l'électrode placée sur celle-ci. Le courant mesuré dans la seconde cellule (appelé courant jonctionnel) correspond à la diffusion de charges

électriques via les canaux intercellulaires joignant les deux cellules. On peut alors établir une relation entre l'intensité du courant jonctionnel mesuré en fonction du potentiel transjonctionnel imposé, et ainsi définir la conductance jonctionnelle globale entre deux cellules. D'autre part, la conductance unitaire d'un canal jonctionnel peut être mesurée en appliquant cette technique sur des couples de cellules partiellement découplées, en présence d'inhibiteurs des jonctions communicantes. Ceci a pour effet de diminuer la probabilité d'ouverture des canaux intercellulaires, alors, un seul canal (ou un très petit nombre de canaux) sera ouvert. Par ailleurs, la mesure des conductances unitaires et globales permet d'avoir une idée du nombre de canaux intercellulaires ouverts à un instant t (Herve *et al.*, 2008).

Cette méthode est la plus adéquate pour mesurer les propriétés électriques des jonctions communicantes, cependant elle n'apporte que des informations sur la perméabilité aux ions et peu sur la perméabilité aux métabolites (Abbaci *et al.*, 2008).

4.4. Modèles animaux

Les études actuelles basées sur l'utilisation de souris transgéniques (tableau 4) ont clairement mis en évidence le rôle indispensable des connexines dans le développement et la fonctionnalité des tissus et organes (Willecke *et al.*, 2002). Par exemple, la délétion germinale du gène codant la Cx 43 entraîne la mort par asphyxie des souris quelques heures après la naissance. Ces souris présentent des malformations des artères coronaires et une obstruction du tronc pulmonaire empêchant le sang d'atteindre les poumons (Wei *et al.*, 2004). D'autre part, la délétion partielle de la Cx 43 (hétérozygote Cx 43 +/-) n'est pas létale, mais les souris présentent des troubles cardiaques (Huang *et al.*, 1998). Cependant, ces modèles animaux se sont révélés problématiques de par la compensation de la connexine manquante par d'autres connexines. Par exemple, les souris déficientes en Cx 40 ont une diminution de l'expression de la Cx 37 et une réorganisation cellulaire de la Cx 43 (Brisset *et al.*, 2009). Ce phénomène rend les interprétations des expériences très difficiles (Mesnil, 2004).

Connexine	Phénotype des souris Knock out
Cx 26	léta1 au 11ème jour de l'embryon
Cx 30	affaiblissement de l'audition
Cx 31	dysmorphogénèse placentaire transitoire
Cx 32	diminution de la dégradation du glycogène, augmentation de l'incidence de cancer du foie
Cx 36	déficit visuel
Cx 37	stérilité des femelles, hémophilie
Cx 40	arythmie cardiaque
Cx 43	malformation cardiaque et arythmie ventriculaire
Cx 45	léta1 au 15ème jour de l'embryon
Cx 46	cataracte zonula nucléaire
Cx 50	cataracte congénitale - microphthalmie

Tableau 4 : phénotype des souris déficientes en connexines (souris Knock-out).

(D'après Anzini *et al.*, 1997, Dobrowolski *et al.*, 2009, Mesnil, 2004, Reaume *et al.*, 1995).

Un modèle de souris déficientes en Cx 43 seulement dans l'endothélium a été mis au point, ces souris survivent après la naissance, et présentent une hypotension et une bradycardie. De plus, ces souris présentent des taux de NO et d'angiotensine plasmatiques plus élevés que les souris sauvages (Liao *et al.*, 2001). La même équipe a récemment développé un modèle de souris déficientes en Cx 43 seulement au niveau du muscle lisse, ces souris ne meurent pas prématurément et se développent normalement. L'expression de la Cx 43 est non seulement diminuée dans les CML des artères de ces souris, mais également dans les CE suggérant une réorganisation du profil d'expression de la Cx 43 suite à sa délétion dans le muscle lisse (Liao *et al.*, 2007).

5. LES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE

5.1. Les jonctions communicantes dans le coeur

Le coeur est une pompe qui expulse le sang dans les vaisseaux grâce à la contraction coordonnée des oreillettes et des ventricules. L'efficacité de ces muscles dépend de la contraction synchronisée des myocytes qui les constituent. La contraction des cardiomyocytes contractiles est déclenchée par une dépolarisation membranaire spontanément générée par des cardiomyocytes conducteurs dans le nœud sino-auriculaire. C'est à partir de ce nœud que l'activité électrique se propage dans les oreillettes qui se contractent, atteint le nœud auriculo-

ventriculaire, puis le système de conduction ventriculaire aboutissant à la contraction des deux ventricules. Depuis les années 70, il est connu que cette propagation nécessite l'intégrité des jonctions communicantes. Tous les cardiomyocytes sont interconnectés par des jonctions communicantes principalement localisées dans les disques intercalaires (Severs, 1990).

Il a été démontré que 4 connexines sont synthétisées dans les cardiomyocytes humains : les Cx 31.9, 40, 43 et 45. La Cx 43 est la plus exprimée, elle est synthétisée par tous les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires, contractiles et conducteurs, elle participe essentiellement à la propagation de l'influx cardiaque dans les ventricules. La Cx 40 n'est exprimée qu'au niveau des cardiomyocytes conducteurs auriculaires et ventriculaires et dans le nœud auriculo-ventriculaire, elle contribue ainsi de manière très significative à la propagation normale de l'activité électrique dans les oreillettes et le système de conduction. Quant à la Cx 45, elle est fortement exprimée durant le stade embryonnaire, puis disparaît pour n'être présente que dans certains cardiomyocytes dans le cœur adulte. La Cx 45 serait essentielle pour coordonner la synchronisation des battements des cardiomyocytes embryonnaires et pour la progression normale de la cardiogenèse. Quant à la Cx 31.9, elle est fortement exprimée dans les cardiomyocytes du nœud auriculo-ventriculaire et contribue au ralentissement de la propagation de l'activité électrique dans ce tissu. Elle est donc impliquée dans la coordination des contractions auriculo-ventriculaires et protège les ventricules des arythmies auriculaires (Herve *et al.*, 2008).

En dehors des cardiomyocytes, les connexines sont également exprimées dans les autres types cellulaires présents au niveau du cœur. La Cx 37 est exprimée par les cellules endocardiques et les cellules endothéliales des vaisseaux coronaires. La Cx 40 est également exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux coronaires et la Cx 45, par les cellules musculaires lisses de ces mêmes vaisseaux. Les fibroblastes cardiaques synthétisent, par ailleurs, les Cx 45 et 40.

5.2. Les jonctions communicantes dans les vaisseaux

La coordination des réponses vasculaires est essentielle pour le contrôle des fonctions vasculaires normales. Le couplage intercellulaire *via* les jonctions communicantes contribue majoritairement à cette coordination. Dans les cellules vasculaires, les jonctions communicantes permettent la propagation des variations du potentiel membranaire et de la concentration calcique intracellulaire, *via* le couplage entre les CE, entre les CML, mais également entre ces deux types cellulaires (jonctions myoendothéliales) (Figueroa *et al.*, 2009). Les jonctions communicantes jouent également un rôle dans des processus physiologiques plus lents tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et le développement (Brisset *et al.*, 2009).

5.2.1. Isoformes exprimées

Dans la paroi vasculaire, seulement 4 isoformes ont été retrouvées dans les CE et les CML : les Cx 37, 40, 43 et 45 ; cependant, leur profil d'expression diffère en fonction du diamètre des vaisseaux.

Dans les **artères de gros calibre**, les CE sont particulièrement bien couplées grâce à l'expression abondante des Cx 37 et 40 dans les artères élastiques (aorte) et musculaires (coronaires) (van Kempen *et al.*, 1999). L'expression de la Cx 43 quant à elle, est restreinte aux CE des points d'embranchement de ces artères, là où le flux sanguin est turbulent (Gabriels *et al.*, 1998). Au niveau des CML des artères de gros calibre, les jonctions communicantes permettent la coordination de la contraction dépendante du calcium le long des vaisseaux. La Cx 43 est principalement exprimée au niveau des CML et serait responsable, entre autre, du contrôle de la mitose, et donc probablement du contrôle de leur différenciation (Brisset *et al.*, 2009).

Dans les **vaisseaux de résistance**, les CE sont également bien couplées. Les Cx 40 et 43 sont exprimées au niveau des CE, et la Cx 43 est essentielle dans la propagation des vagues calciques d'une CE à une autre (de Wit *et al.*, 2006). Comme dans les artères de gros calibre, les jonctions communicantes permettent la coordination de la contraction des vaisseaux de résistance. D'autre part, les jonctions communicantes au niveau des CML semblent être impliquées dans le tonus myogénique des artères de résistance (Figuroa *et al.*, 2009). La particularité des artères de résistance est la présence de jonctions communicantes entre les CE et les CML, ces jonctions myoendothéliales (JME) ne sont pas retrouvées dans les artères de gros calibre (aorte et carotide) (Brisset *et al.*, 2009).

5.2.2. La jonction myoendothéliale

Cette structure particulière est principalement due à des extensions des CE, et dans une moindre mesure des CML, qui traversent la lamina élastique interne de façon à créer un contact direct cellule - cellule. Anatomiquement, ces structures sont présentes dans toutes les artérioles, cependant, elles sont de très petite taille (environ 0,5 x 0,5 μm) et localisées dans des zones très confinées, ce qui rend leur étude difficile en microscopie optique. La majorité des études se fait donc par microscopie électronique, ce qui a limité le nombre d'études sur la fonction des JME et est probablement à l'origine de controverses concernant leur fonctionnalité. En ce qui concerne les isoformes exprimées au niveau des JME, elles varient en fonction du type de vaisseau étudié.

Physiologiquement, les JME participent à la propagation de l'« endothelium – derived hyperpolarizing factor » (EDHF). Ce phénomène est basé sur l'observation d'une relaxation à l'acétylcholine dépendante de l'endothélium mais indépendante des prostaglandines et du monoxyde d'azote (NO) (Vanhoutte, 2004). En présence d'inhibiteur de NO synthase et de la voie des prostaglandines, l'activation de récepteurs endothéliaux à l'acétylcholine conduit à une

augmentation de la concentration calcique intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) dans les CE, ce qui active les canaux potassiques dépendants du calcium (canaux K_{Ca}). Ce phénomène est également observé lors de l'activation de récepteurs endothéliaux à la bradykinine ou en présence de forces de cisaillement exercées par le flux sanguin. L'activation des K_{Ca} provoque une hyperpolarisation des CE qui se propage aux CML sous-jacentes, entre autre, *via* la JME. Les CML répondent alors par une relaxation (Feletou *et al.*, 2007). De nombreuses données montrent une corrélation entre la diminution de la réponse dépendante de l'EDHF et l'augmentation de la taille des vaisseaux (Sandow *et al.*, 2000). Cette observation est à mettre en relation avec l'absence de JME dans les artères de gros calibre.

Dernièrement, quelques travaux se sont penchés sur la communication des CML vers les CE *via* les JME. Ainsi, trois modèles différents (deux *in vivo* et un *in vitro*) ont montré qu'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les CML induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les CE, ce phénomène impliquant les JME (Dora *et al.*, 1997; Isakson *et al.*, 2007; Lamboley *et al.*, 2005). Deux de ces modèles ont montré que l' IP_3 produit dans les CML traverse les JME pour augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ dans les CE et ainsi induire une production de NO. Ceci représente un mécanisme important selon lequel les jonctions communicantes interviennent dans la réactivité des vaisseaux.

5.3. Jonctions communicantes et pathologies cardiovasculaires

5.3.1. Pathologies cardiaques

Chez l'homme, lors de maladies cardiaques l'expression ou la distribution des Cx 40 et Cx 43 est souvent modifiée. Ainsi, dans le cas d'hypertrophie cardiaque due à une sténose aortique et d'infarctus du myocarde, la Cx 43 voit son expression diminuée et sa localisation est modifiée (Dhein *et al.*, 2004; Severs *et al.*, 2004). D'autre part, des variations de l'expression des Cx 40 et 43 ont été observées chez des patients souffrant de fibrillation auriculaire ou d'insuffisance cardiaque (Herve *et al.*, 2008). Dans le cas d'ischémie cardiaque, on observe un découplage des jonctions communicantes dû, entre autre, à une diminution de l'ATP, une augmentation du calcium intracellulaire et une acidification du cytoplasme (De Groot *et al.*, 2004).

5.3.2. Hypertension artérielle

Bien que les résultats varient souvent d'un modèle à l'autre, un grand nombre d'études rapporte des changements d'expression des connexines. Par exemple, dans le modèle de rat hypertendu spontanément (SHR), les Cx 37 et 40 voient leur expression diminuée dans les CE de la majorité des artères, quant à la Cx 43, des études rapportent une augmentation et d'autres, une diminution de son expression dans la paroi des artères (Rummery *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 2006). Chez les rats SHR, la normalisation de la pression artérielle en utilisant un inhibiteur de

l'enzyme de conversion de l'angiotensine restaure l'expression endothéliale des connexines (Rummary *et al.*, 2005). Dans le modèle d'hypertension rénale chez le rat, l'expression des Cx 40 et 43 est augmentée. Il a par ailleurs été montré dans ce modèle que l'expression de la Cx 43 est très sensible aux changements hémodynamiques. A la différence du modèle d'hypertension rénale, l'hypertension induite par l'inhibition de l'enzyme endothéliale produisant le NO (eNOS) est associée à une diminution de l'expression de la Cx 43 dans la paroi des artères, et de la Cx 37 au niveau des CE (Brisset *et al.*, 2009).

De nombreuses études mettent en évidence le rôle important de la Cx 40 dans la régulation de la pression artérielle. Le modèle de souris KO pour la Cx 40 souffre d'une hypertension artérielle marquée et soutenue (de Wit *et al.*, 2003). Cette délétion de la Cx 40 est également associée à une vasoconstriction soutenue et un tonus vasculaire irrégulier suggérant un lien direct entre la Cx 40, les résistances périphériques et la pression artérielle (de Wit *et al.*, 2006). De plus, une série d'études récentes suggère une association entre la sécrétion de rénine et l'expression de la Cx 40. En effet, chez les souris déficientes en Cx 40, la synthèse et le taux plasmatique de rénine sont tous deux augmentés (Wagner *et al.*, 2007).

Chez l'homme, un polymorphisme au niveau du promoteur du gène de la Cx 40 a récemment été associé aux arythmies spécifiques de l'oreillette (Firouzi *et al.*, 2004). D'autre part, cette même équipe a montré plus tard une corrélation entre le sexe, la pression artérielle systolique et le polymorphisme génétique de la Cx 40 chez des sujets sains (Firouzi *et al.*, 2006).

5.3.3. Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie immunoinflammatoire représentant la cause majeure de décès dans les pays développés. Durant les 15 dernières années, de nombreuses preuves ont été apportées sur la contribution des jonctions communicantes dans le développement de l'athérosclérose. L'expression des connexines évolue en même temps que la maladie progresse d'un vaisseau sain à un vaisseau présentant une dysfonction de l'endothélium, jusqu'à la rupture de la plaque d'athérome (Brisset *et al.*, 2009). Lors de cette pathologie, l'expression de la Cx 43 est d'abord augmentée puis diminuée au niveau des CML environnant la plaque d'athérome des carotides humaines, alors qu'elle est augmentée dans les macrophages (Blackburn *et al.*, 1995; Polacek *et al.*, 1993). Dans les vaisseaux sains, la Cx 37 est exprimée dans les CE et les monocytes circulants. Une fois que ces derniers infiltrent la paroi vasculaire au travers d'un endothélium devenu non fonctionnel, afin de se différencier en macrophages, l'expression de la Cx 37 est augmentée. Dans la plaque athéromateuse, l'expression de la Cx 37 est diminuée au niveau des CE et commence à être exprimée au niveau des CML (Brisset *et al.*, 2009). Quant à la Cx 40, son expression est diminuée à mesure que l'endothélium devient non fonctionnel. En définitive, les CE n'expriment plus aucune connexine dans les stades les plus avancés de la

maladie. Toutes ces modifications d'expression sont dues aux forces de cisaillement exercées au niveau des plaques d'athérome, mais sont également induites par les cytokines et facteurs de croissance exprimés durant le développement de la maladie (Brisset *et al.*, 2009).

5.4. Jonctions communicantes et circulation pulmonaire

5.4.1. Jonctions communicantes et circulation pulmonaire saine

Les études des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire sont peu nombreuses et concernent majoritairement l'artère pulmonaire principale. Des études montrent la présence des Cx 37, 40 et 43 dans l'endothélium et des Cx 37 et 43 dans le muscle lisse de l'artère pulmonaire principale de rat (Ko *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 1999). Récemment, une étude *in vitro* a également montré la présence des Cx 32 et 43 dans les CE d'artère pulmonaire humaine en culture (Okamoto *et al.*, 2009).

Du point de vue fonctionnel, une étude a montré l'absence de contribution des JME des artères extrapulmonaires de rat dans la relaxation à l'acétylcholine, laissant penser qu'il n'y a pas d'EDHF dans ces artères (Gupta *et al.*, 2008).

5.4.2. Jonctions communicantes et HTAP

Une étude au laboratoire a montré l'apparition de contractions spontanées rythmiques (CSR) au niveau de l'artère pulmonaire principale de rat ayant subi 14 jours d'hypoxie chronique. Ces CSR disparaissent lorsque l'artère pulmonaire principale est traitée à l'acide 18- α glycyrrhétinique, mettant en évidence le rôle des jonctions communicantes dans ce phénomène. L'amplitude de ces CSR est d'autant plus grande que l'hypertrophie du ventricule droit est faible, et les CSR disparaissent lorsque l'HTAP est installée chez des rats ayant subi 3 à 4 semaines d'hypoxie chronique. Cette relation suggère que les CSR représentent un processus adaptatif temporaire de la circulation pulmonaire à l'hypoxie chronique (Bonnet *et al.*, 2001).

En ce qui concerne le modèle de rat MCT, plusieurs études montrent une désorganisation du profil d'expression de la Cx 43 au niveau du ventricule droit, associée à une altération de la conduction de l'activité électrique (Uzzaman *et al.*, 2000). Plus tard, cette même équipe a expliqué cette désorganisation par la déphosphorylation de la Cx 43 conduisant à son internalisation en jonctions annulaires puis à sa dégradation (Sasano *et al.*, 2007). Actuellement, aucune étude n'a été menée sur les connexines au niveau des artères pulmonaires dans ce modèle.

Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS)

L'oxygène est indispensable au fonctionnement cellulaire, mais paradoxalement, il est aussi source de ROS qui peuvent oxyder des macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est à l'origine de la formation d'autres ROS plus ou moins réactives avec leur environnement tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle ($\bullet OH$).

Les ROS sont impliquées dans un certain nombre de régulations physiologiques et sont responsables du stress oxydant. Ce terme est souvent utilisé pour caractériser la condition dans laquelle les cellules ou les tissus sont exposés à des niveaux excessifs de ROS, par augmentation de leur synthèse, ou par diminution de l'efficacité des systèmes de défense endogènes. Le stress oxydant est fréquemment impliqué en pathologie, et la surproduction de ROS est un phénomène souvent observé dans les pathologies cardiovasculaires. L'implication des ROS dans l'HTAP a par ailleurs été prouvée par plusieurs études.

Dans cette dernière partie introductive, je décrirai tout d'abord les différentes espèces réactives dérivées de l'oxygène, ainsi que leurs sources de production, puis j'exposerai les systèmes endogènes de défense contre les ROS. Ensuite, je détaillerai les propriétés physiologiques et physiopathologiques des ROS dans l'organisme et plus particulièrement dans l'appareil cardiovasculaire. Enfin, je présenterai les liens connus entre les ROS et les différentes formes d'HTAP.

1. DEFINITION

Au cours du métabolisme cellulaire normal, l'oxygène peut être réduit en $O_2^{\bullet-}$ dont peut dériver un ensemble d'espèces réactives, radicalaires ou non. En effet, il existe deux types de ROS : les ROS radicalaires, qui correspondent à des radicaux libres et les ROS non radicalaires. Un **radical libre** est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Parmi eux, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est le radical libre à l'origine de la formation de nombreuses autres espèces radicalaires réactives telles que les radicaux peroxydes ($ROO\bullet$) et hydroxyles ($\bullet OH$) (Figure 16). En parallèle, il existe des ROS non radicalaires mais tout aussi réactives, dérivant elles aussi de l' $O_2^{\bullet-}$, parmi elles, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical peroxydinitrite ($ONOO\bullet$).

L' O_2^{\bullet} est très instable en solution aqueuse, il réagit très rapidement avec d'autres molécules, aussi sa $\frac{1}{2}$ vie est de l'ordre de la microseconde (Bienert *et al.*, 2006). D'autre part, il ne traverse pas la membrane plasmique. L' O_2^{\bullet} peut réagir avec le NO produit par la NO synthase endothéliale et former du peroxydinitrite ($ONOO^-$) une espèce radicalaire causant des modifications de nombreuses molécules biologiques (Figure 16).

L' H_2O_2 est produit par la dismutation de l' O_2^{\bullet} par une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD) (cf 3.4.1. de la partie « les espèces réactives dérivées de l'oxygène ») (Figure 16). Contrairement à l' O_2^{\bullet} il est beaucoup plus stable, sa $\frac{1}{2}$ vie est de l'ordre de la milliseconde, et il a la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques (Bienert *et al.*, 2006).

Le radical hydroxyle ($\bullet OH$) est issu d'une réaction entre le fer et l' H_2O_2 , appelée la réaction de Fenton (Figure 16). Le radical hydroxyle est extrêmement réactif et est considéré comme le ROS le plus dangereux : sa demi-vie est de l'ordre de la nanoseconde et il n'existe pas de système enzymatique permettant de le dégrader (Sies, 1993).

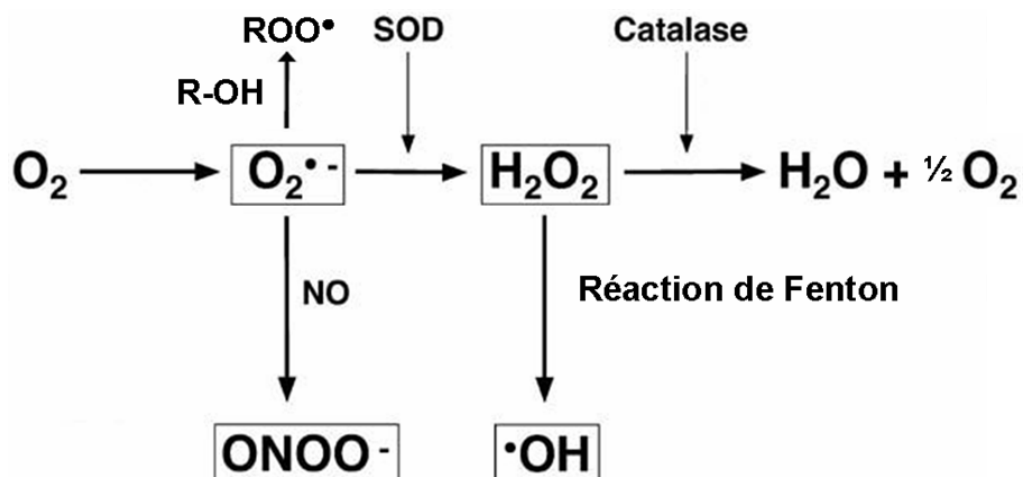


Figure 16 : schéma de synthèse des ROS

(D'après Kyaw *et al.*, 2004).

L'un des plus grands dangers représentés par les radicaux libres est leur capacité à interagir avec d'autres molécules cibles de façon à gagner un nouvel électron et obtenir une configuration stable. Ceci transforme alors la molécule cible en radical libre très réactif et déclenche des réactions en chaîne (Lau *et al.*, 2008).

2. SOURCES DE ROS

Dans l'organisme, il y a de nombreuses sources de ROS dont l'importance varie selon les tissus. Toutefois, d'une façon générale, il existe une production basale de ROS dans toutes les cellules par les différentes oxydases et la mitochondrie, et cette production est augmentée par divers stimuli physiologiques et physiopathologiques.

2.1. NADPH oxydase

La NADPH oxydase fut d'abord caractérisée dans les phagocytes où elle joue un rôle important dans la défense anti-microbienne *via* la production d' O_2^{\bullet} . Il s'agit d'un complexe multienzymatique constitué d'une sous-unité catalytique gp91^{phox} (ou Nox2) et d'une sous-unité p22^{phox}, le tout formant un hétérodimère associé à la membrane appelé flavocytochrome b₅₅₈ (Figure 17b). La sous-unité gp91^{phox} contient un nucléotide flavine-adénine (FAD) et un site de fixation au NADPH situé sur la face cytosolique. Dans la partie transmembranaire de l'enzyme, 2 hèmes sont présents et permettent le transfert des électrons du NADPH cytosolique à l'oxygène moléculaire *via* le FAD, produisant ainsi de l' O_2^{\bullet} dans l'espace extracellulaire. Le complexe enzymatique est régulé par plusieurs sous-unités régulatrices présentes dans le cytosol telles que p47^{phox}, p67^{phox} et une petite protéine à activité GTPase : Rac1 ou Rac 2 (Figure 17b). Toutes sont nécessaires à l'activation de la réaction de transfert d'électron au niveau du complexe enzymatique b₅₅₈ (Bindoli *et al.*, 2008; Cave, 2009; Sumimoto, 2008).

Par la suite, plusieurs homologues de gp91^{phox} ont été découverts, parmi lesquels Nox1, Nox3, Nox4 et Nox5 (gp91^{phox} a alors été renommée Nox2). Nox1, Nox2, Nox4 et Nox5 sont présentes au niveau vasculaire et sont encodées par des gènes différents (Lee *et al.*, 2008). Nox1 possède deux sous-unités régulatrices NoxO1 et NoxA1 qui sont homologues aux sous-unités p47^{phox} et p67^{phox} de la Nox2 (Figure 17a). Nox4 et Nox5 ont la particularité de ne pas nécessiter la présence des sous-unités cytosoliques régulatrices pour leur activation (Figure 17c et 17d). Nox4 produirait préférentiellement de l' H_2O_2 et peu d' O_2^{\bullet} (Chrissobolis *et al.*, 2008) (Figure 17c). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que Nox4 est constitutivement active et responsable de la production de ROS en conditions basales (Cave, 2009). Contrairement à Nox1, Nox2 et Nox4, Nox5 a la particularité de ne pas se lier à la sous-unité p22^{phox}, cependant, son activation nécessite une augmentation de calcium (Figure 17d).

Au niveau cardiovasculaire, les CE, les cardiomyocytes et les fibroblastes expriment principalement Nox4 et de façon moins importante Nox2. Quant aux CML, elles expriment de façon prédominante Nox4 et dans une moindre mesure Nox1 (Cave, 2009).

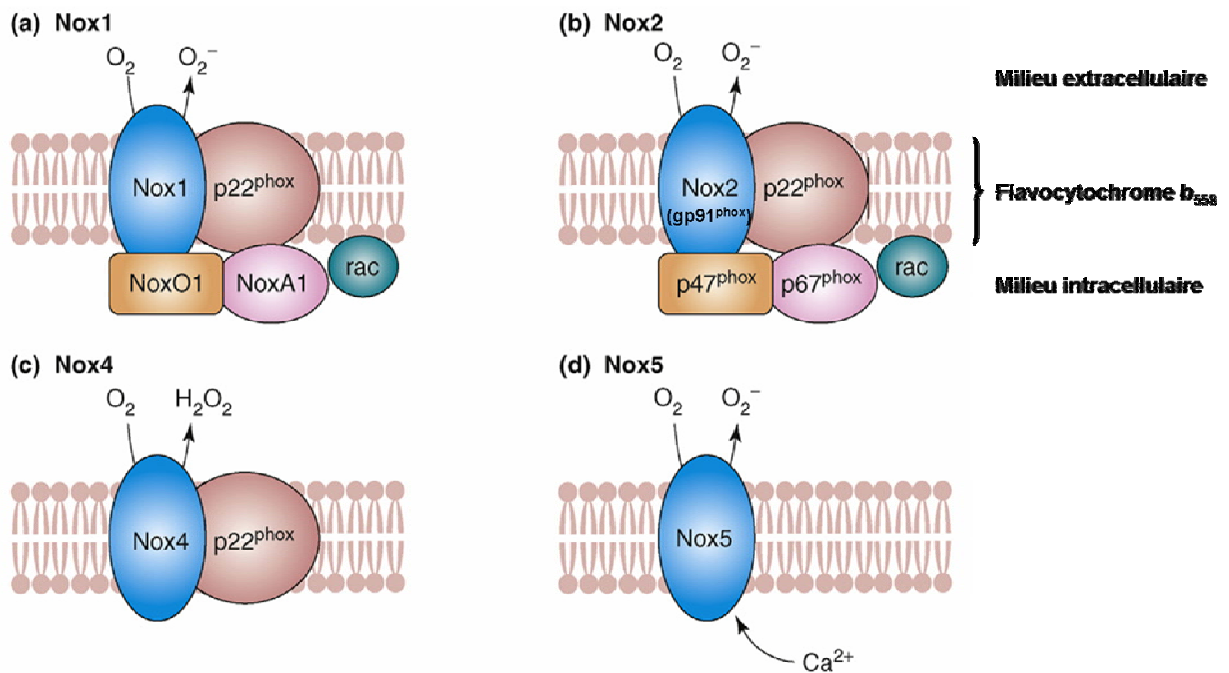


Figure 17 : la NADPH oxydase.

Représentation schématique des composants des différentes isoformes de NADPH oxydases vasculaires (d'après Chrissobolis et al., 2008).

Le NADPH et, dans une moindre mesure, le NADH, sont les substrats des NADPH oxydases, leur biodisponibilité peut donc influencer la production de ROS dans les tissus (Wolin, 2009).

Les Nox peuvent être activées par différents stimuli comme les agonistes de récepteurs couplés aux protéines G (récepteurs à l'angiotensine II et récepteurs à l'aldostérone), les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance, les forces de cisaillement ou l'hypoxie. D'autre part, un même agoniste peut stimuler différentes isoformes de Nox selon le type cellulaire en question. Par exemple, l'angiotensine II (dont le mode d'action sur les Nox est le mieux caractérisé) active Nox1 au niveau des CML vasculaires, alors qu'au niveau des CE et des cardiomyocytes, l'angiotensine II active Nox2 (Cave, 2009).

2.2. Mitochondrie

La fonction principale de la mitochondrie est d'assurer la respiration cellulaire conduisant à la formation d'ATP via la chaîne respiratoire, cependant, ceci a pour conséquence la formation de ROS.

La chaîne respiratoire est constituée de 4 complexes indépendants (I, II, III et IV, Figure 18) permettant de réoxyder les cofacteurs ayant participé au catabolisme mitochondrial des glucides, des acides gras et des acides aminés. Au final, cette série de réoxydations va produire

un gradient de protons à l'origine d'une différence de potentiel électrochimique utilisée par l'ATP synthase mitochondriale pour produire de l'ATP.

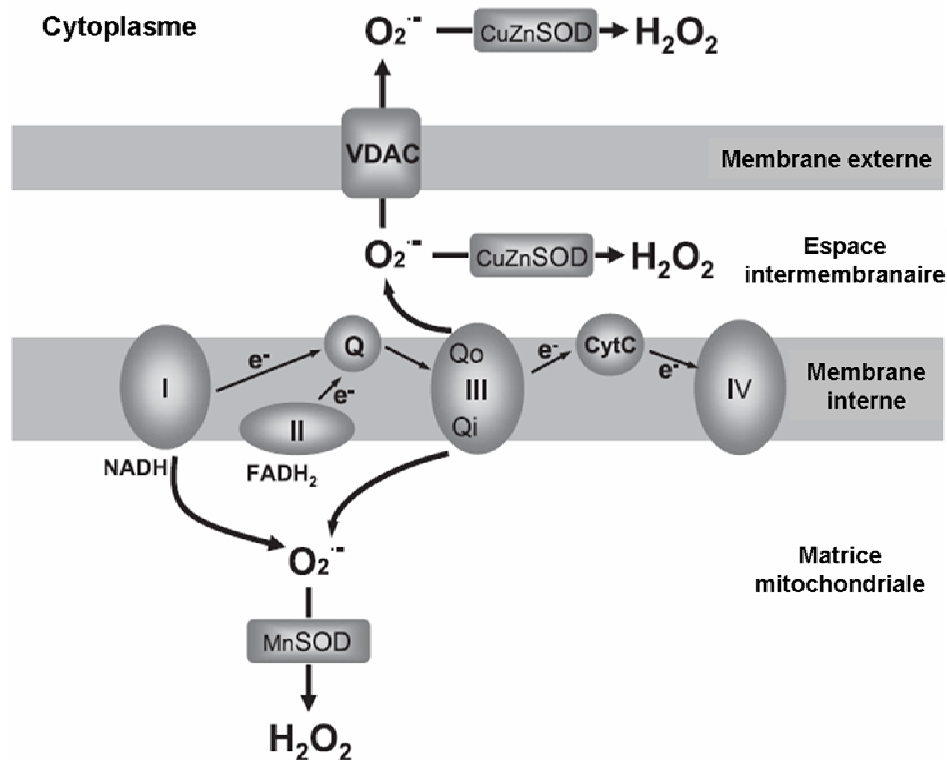


Figure 18 : représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'O₂[•] produit dans la matrice mitochondriale est pris en charge par la superoxyde dismutase mitochondriale dépendante du manganèse (MnSOD), alors que l'O₂[•] produit dans l'espace intermembranaire est pris en charge par la superoxyde dismutase associée au cuivre/zinc (Cu/ZnSOD). L'O₂[•] produit au niveau de l'espace intermembranaire peut traverser la membrane mitochondriale externe via le canal anionique dépendant du voltage (VDAC) (Zhang et al., 2007).

Les complexes I et III sont souvent désignés comme étant la source de production de ROS par la mitochondrie. Ces complexes génèrent de l'O₂[•] lors des oxydations. L'O₂[•] produit dans la matrice mitochondriale est rapidement dismuté par la superoxyde dismutase mitochondriale (cf 3.4.1 de la partie « les espèces réactives dérivées de l'oxygène »), et de la même façon, l'O₂[•] produit dans l'espace intermembranaire est rapidement pris en charge par la superoxyde dismutase dépendante du cuivre et du zinc. Cependant, si la concentration en O₂[•] est très élevée dans la matrice mitochondriale, l'O₂[•] peut s'échapper dans l'espace intermembranaire puis dans le cytosol *via* des canaux anioniques (VDAC) présents sur la membrane mitochondriale externe (Figure 18) (Camello-Almaraz et al., 2006).

2.3. NO synthase (NOS) découplée

Il existe 4 isoformes de cette enzyme : la NOS neuronale (nNOS), la NOS inducible (iNOS), la NOS mitochondriale (mtNOS) et la NOS endothéliale (eNOS).

Les NOS sont homodimériques, chaque monomère est constitué d'un domaine oxygénase et d'un domaine réductase possédant chacun une activité catalytique (Figure 19). Le domaine oxygénase catalyse la formation du NO à partir de la L-arginine, et le domaine réductase catalyse la réduction du NADPH en NADP. Le domaine oxygénase contient le domaine de liaison de l'hème et du cofacteur principal des NOS (la tétrahydrobioptérine ou BH₄), ainsi que le domaine de fixation du substrat (la L-arginine). Le domaine réductase est, quant à lui, constitué d'un site de fixation pour les flavines FAD et FMN ainsi que pour le NADPH (Figure 19). Les deux domaines oxygénase et réductase sont reliés entre eux par un site de liaison à la calmoduline (Alderton *et al.*, 2001).

Pour que les NOS produisent du NO, elles doivent être sous forme d'homodimères, si les monomères ne sont pas assemblés, alors on parle de NOS découplée (Figure 19), et l'enzyme va alors produire de l'O₂^{•-}. La BH₄ est un cofacteur essentiel pour stabiliser la NOS sous forme homodimérique (Li *et al.*, 2004).

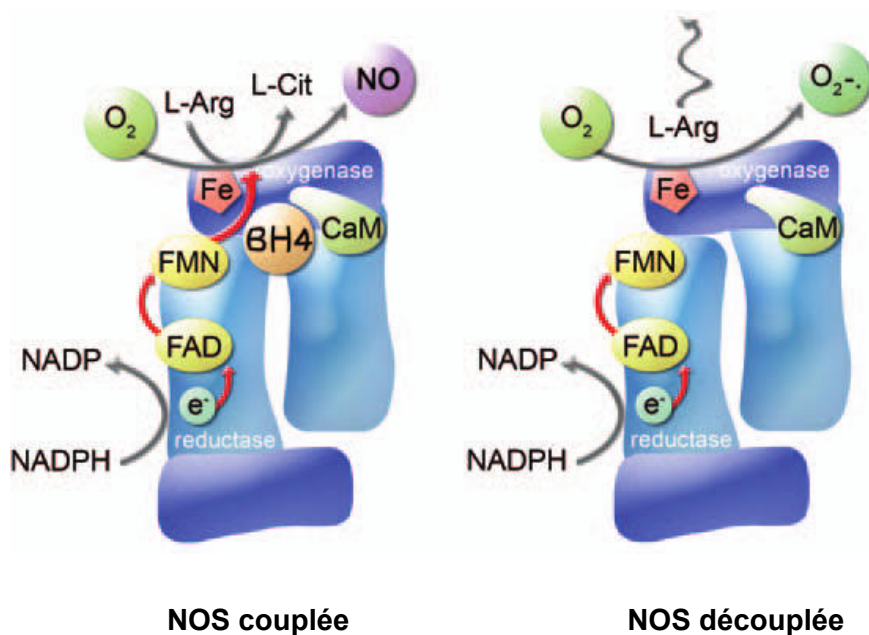


Figure 19 : représentation schématique de la structure de la NO synthase.

Le schéma de gauche représente la NOS sous sa forme couplée : les deux dimères sont liés par le cofacteur BH₄, et l'enzyme produit du NO. Le schéma de droite représente la NOS sous sa forme découplée : un déficit en BH₄ empêche la dimérisation des sous-unités, et l'enzyme produit de l'O₂^{•-} (Schulz *et al.*, 2008).

2.4. Autres oxydases

Les autres systèmes enzymatiques capables de générer des ROS dans les cellules vasculaires sont la xanthine-oxydase, la SOD, les cytochromes P450, les lipooxygénases, les cyclooxygénases (Li *et al.*, 2004).

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une métalloflavoprotéine ubiquitaire qui peut être trouvée sous deux formes fonctionnelles distinctes : la xanthine déshydrogénase (XD) qui est constitutivement exprimée *in vivo* et la xanthine oxydase (XO) qui est une modification post traductionnelle de XD. XD et XO catalysent l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique (Figure 20). XD utilise NAD⁺ comme accepteur d'électrons pour ses réactions redox, ce qui génère un produit stable NADH. Cependant, XO ne peut pas utiliser NAD⁺, elle nécessite la réduction d'oxygène pour l'oxydation de la xanthine, ce qui va générer de fortes concentrations d'O₂^{•-} (Li *et al.*, 2004).

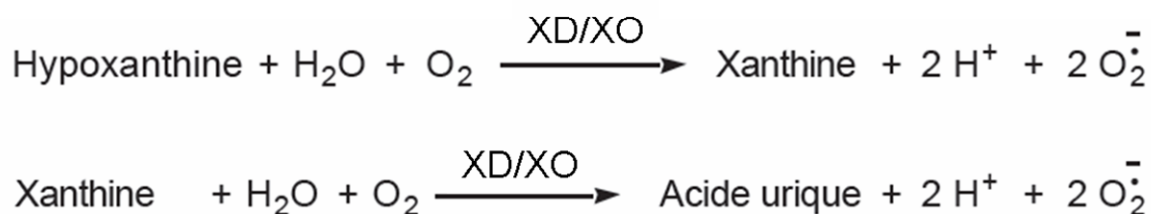


Figure 20 : production d'anion superoxyde par la xanthine oxydase (XO)

Les SOD sont également une source de ROS car elles catalysent la conversion de l'O₂^{•-} en H₂O₂ (Figure 16). Les cytochromes P450 (CYP) génèrent de l'O₂^{•-}, de l'H₂O₂ et de l'•OH durant leur cycle de réaction d'oxydoréduction (Li *et al.*, 2004). Les cyclooxygénases peuvent également produire de l'O₂^{•-} au cours du métabolisme de l'acide arachidonique.

3. SYSTEMES ENDOGENES DE DEFENSE CONTRE LES ROS

Les systèmes antioxydants sont soit des molécules qui captent ou inactivent les ROS, soit des systèmes enzymatiques qui catalysent leur réduction. Ces systèmes permettent la détoxification et la défense des cellules vis-à-vis des effets potentiellement délétères des ROS.

3.1. Le monoxyde d'azote

En présence de faibles concentrations de NO, l'interaction NO/O₂^{•-} a deux conséquences : la production de faibles quantités d'ONOO⁻ et la diminution de la concentration en O₂^{•-}. Ainsi, les concentrations relativement faibles de NO n'induisent pas de stress oxydant et lui confèrent des propriétés antioxydantes. Cependant, lorsque les taux de NO et d'O₂^{•-} sont élevés, la quantité d'ONOO⁻ formé est plus importante. De plus, dans certains cas où la quantité d'O₂^{•-} est très élevée et ainsi supérieure à la capacité d'utilisation de l'O₂^{•-} par la SOD, le stress oxydant sera

important de par la présence à la fois de fort taux d'ONOO⁻ et d'O₂[•] (Wolin, 2009). Le NO possède donc des propriétés antioxydantes seulement s'il est produit en faible quantité.

3.2. Tétrahydrobioptérine

La BH₄ est considérée comme un important antioxydant biologique, en stabilisant le complexe homodimérique de la NOS, il empêche le découplage de la NOS et donc la formation d'O₂[•] par la NOS (cf 2.3. de la partie « les espèces réactives dérivées de l'oxygène ») (Li *et al.*, 2004).

3.3. L'acide ascorbique (Vitamine C) et l'α-tocophérol (Vitamine E)

Ces deux vitamines font parties de la famille des thioprotéines, ou protéines à groupement thiol. Ce groupement leur confère leur propriété antioxydante et participe au contrôle de l'état redox des thiols (cf 4.2.2. de la partie « les espèces réactives dérivées de l'oxygène »).

L'acide ascorbique ou vitamine C est l'un des antioxydants les plus importants du plasma humain. Il peut diminuer l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL), capter l'O₂[•], réagir avec les ONOO⁻ et les ROS, protégeant ainsi les lipides contre la peroxydation lipidique (Forman *et al.*, 2009). D'autre part, l'acide ascorbique augmente le niveau de BH₄ intracellulaire, en stabilisant ce composé sans affecter la synthèse du BH₄ ou modifier son affinité pour la eNOS. Ceci a pour conséquence de potentialiser l'activité de la eNOS et donc, la production de NO (Heller *et al.*, 2001).

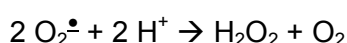
Quant à l'α-tocophérol ou vitamine E, il est fixé aux membranes et stoppe la chaîne de réaction de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxyde (L[•]). La vitamine E devient alors à son tour un radical, mais est moins réactive que le L[•], elle pourra par la suite être prise en charge par une autre molécule antioxydante (Forman *et al.*, 2009).

3.4. Les systèmes enzymatiques

Dans le système vasculaire, la SOD et la catalase sont les principales enzymes qui détoxifient les ROS (Figure 16). Cependant, les radicaux tels que [•]OH et L[•] ne peuvent pas être éliminés par catalyse enzymatique car leur vitesse de réaction avec des molécules cibles est trop rapide. Seuls l'O₂[•] et l'H₂O₂ sont dégradés par les systèmes enzymatiques.

3.4.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

Cette enzyme catalyse la dismutation de l'O₂[•] en H₂O₂ selon la réaction :



Ainsi, les SOD jouent un rôle majeur dans la protection des cellules contre les effets néfastes causés par l' O_2^{\bullet} et $ONOO^-$.

Il existe trois isoformes de SOD :

- La Cu/Zn-SOD (SOD 1) est une enzyme homodimérique (32 kDa) contenant un Cu (II) et un Zn (II) par sous-unité. Elle est principalement localisée dans le cytoplasme et dans le noyau, et une petite quantité peut être détectée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Elle représente la forme prédominante dans les vaisseaux sanguins.
- La Mn-SOD (SOD 2) possède un Mn (II) par sous-unité, elle est présente dans la matrice mitochondriale, et représente la première ligne de défense contre le stress oxydant car elle permet la dismutation quasi instantanée de l' O_2^{\bullet} produit au niveau de la chaîne respiratoire.
- L'EC-SOD (SOD 3) est la forme extracellulaire, c'est une enzyme homotétramérique qui fonctionne avec un Cu (II) et un Zn (II) par sous-unité. Elle est produite dans les vaisseaux par les CML et est principalement localisée au niveau de l'espace entre l'endothélium et les CML. (Faraci, 2003).

L' H_2O_2 formé par les différentes SOD, sera par la suite pris en charge par deux types d'enzymes : la catalase et la glutathion peroxydase.

3.4.2. Catalase

La catalase est une enzyme antioxydante intracellulaire qui est principalement localisée dans les peroxysomes et parfois dans le cytosol. Elle métabolise l' H_2O_2 en $H_2O + \frac{1}{2} O_2$, évitant ainsi sa transformation en radical $\bullet OH$ (Figure 16) (Pryor *et al.*, 2006).

3.4.3. Glutathion peroxydase (GPx)

La GPx fait partie d'un système enzymatique complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination de l' H_2O_2 . La GPx est l'enzyme clé du système et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron et aboutit à la production de glutathion disulfite (GSSG) et d' H_2O . Le GSSG sera à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électron.

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

3.4.4. Peroxyredoxines

Ces enzymes, découvertes récemment, sont au nombre de 6 chez les mammifères et sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les péroxysomes ou sont associées au noyau et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant dans la cellule à travers une activité peroxydase, où H_2O_2 , le peroxy-nitrite et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Ces enzymes ont une faible efficacité catalytique par rapport à la GPx et à la catalase, mais sont présentes en grande quantité dans les cellules, elles joueraient donc un rôle important dans la détoxification cellulaire (Forman *et al.*, 2009).

4. ROLES PHYSIOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES

4.1. Rôles physiologiques

Un des aspects intéressants des ROS est qu'elles ne sont pas toutes délétères, certaines sont des produits essentiels en conditions physiologiques.

Les ROS sont par exemple les senseurs des variations d'oxygène à l'origine du contrôle de la ventilation au niveau des corps carotidiens, mais également à l'origine de l'activation de l'expression de gènes *via* le facteur de transcription inductible par l'hypoxie (HIF-1 pour « Hypoxia Inducible Factor »). D'autre part, la production de ROS est souvent augmentée avant le phénomène de mort cellulaire programmée ou apoptose (pour revue : Droge, 2002).

L' H_2O_2 en particulier est relativement stable et non chargé, il est donc moins réactif et peut facilement diffuser de cellule à cellule. De plus, récemment, l' H_2O_2 a été identifié comme facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). En effet, dans certains territoires vasculaires comme les artéioles coronaires ou les artères mésentériques, certains stimuli (bradykinine ou augmentation du flux) induisent la production d' H_2O_2 . Dans ce cas, l' H_2O_2 produit par l'endothélium provoque une hyperpolarisation des CML adjacentes *via* l'activation de canaux potassiques dépendants du calcium (Feletou, 2009). Ceci conduit alors à une relaxation des CML adjacentes (Bellien *et al.*, 2008).

D'autre part, l' H_2O_2 constitue un second messager impliqué dans différentes voies de signalisation. Il a en effet été montré que l' H_2O_2 inhibe les phosphatases et active la guanylate cyclase, le tout conduisant à une augmentation des effets du NO (Mueller *et al.*, 2005). De plus, il serait capable de réagir avec l'hème composant les cyclooxygénases, conduisant ainsi à leur activation et à la production de prostaglandines (Wolin, 2009).

Cependant ces phénomènes ont lieu lorsque la balance production/élimination des ROS est à l'équilibre, mais lorsque la production augmente ou la dégradation est altérée, le phénomène de stress oxydant apparaît.

4.2. Stress oxydant

Dans la cellule, il existe un équilibre entre la production de ROS et leur élimination. Le stress oxydant est classiquement défini comme un déséquilibre en faveur de la production de ROS qui conduit à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels. Le stress oxydant est à l'origine du vieillissement cellulaire.

4.2.1. Altération des lipides membranaires

Les lipides membranaires sont une cible importante des ROS. Les acides gras polyinsaturés sont plus susceptibles aux attaques radicalaires, particulièrement de l' $\cdot\text{OH}$, et génèrent des peroxydes lipidiques ($\text{L}\cdot$) très réactifs, à l'origine de la formation de $\text{L}\cdot$ en chaîne (Forman *et al.*, 2009). Parmi eux, l'isoprostane, la malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont été très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Pamplona, 2008). La peroxydation des lipides membranaires a des conséquences néfastes sur la cellule de par la perte de l'intégrité membranaire, et donc une désorganisation de tous les complexes qui la composent. De plus, les produits de la peroxydation lipidique réagissent avec les protéines et l'ADN.

4.2.2. Altération des protéines

Les ROS peuvent altérer les protéines de façon directe ou de façon indirecte. En effet, l' H_2O_2 réagit rapidement avec les protéines, en particulier avec les groupements thiols des résidus cystéines. De plus, l'ONOO⁻ conduit à la formation de protéines nitrosylées, marqueurs du stress oxydant dans la cellule. En parallèle, les protéines peuvent être la cible des lipides peroxydés, en particulier le 4-HNE qui peut réagir avec les protéines en ajoutant une double liaison carbone - carbone, ou en induisant la formation d'une base de Schiff (Forman *et al.*, 2009). De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002). Les protéines modifiées par l'oxydation vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (Heat Shock Protein ou HSP) (Levine, 2002).

Il faut souligner l'importance de l'acide aminé cystéine dans les voies de signalisation impliquant les ROS. En effet, le groupement thiol présent sur cet acide aminé réagit très rapidement avec les ROS, particulièrement avec l' H_2O_2 , on parle alors **d'état redox des thiols**. Cet état redox est ainsi un marqueur de l'état redox de la cellule. De nombreux systèmes régulent l'état redox des thiols, parmi eux le système enzymatique comprenant la glutathion peroxydase, ainsi que les peroxyredoxines (cf 3.4.3 et 3.4.4 de la partie « les espèces réactives dérivées de l'oxygène »). Le contrôle de l'état redox des thiols est extrêmement important pour la régulation des voies de signalisation dans les cellules (Bindoli *et al.*, 2008). En effet, la majeure partie des

propriétés biologiques des protéines (fonctions, structure) dépend de l'état redox des cystéines composant ces protéines.

4.2.3. Conséquences sur la mitochondrie

Si la mitochondrie est une source de ROS intracellulaire, elle est surtout leur principale cible. Les ROS peuvent en effet avoir une action directe sur l'activité mitochondriale, ainsi, le peroxy-nitrite (ONOO^-) formé par la réaction entre le NO et l' O_2^{\bullet} peut inhiber la chaîne respiratoire et endommager différents composants mitochondriaux (complexe de la chaîne respiratoire, membrane et ADN mitochondriaux) (Shiva *et al.*, 2004). En effet, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est à proximité directe de la source de ROS et l'absence d'histone et de système de réparation le rend très fragile. Les différents complexes de la chaîne mitochondriale étant codés par l'ADNmt, son altération pourrait endommager le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Starkov, 2008).

4.2.4. Altération du génome

D'une façon générale, les réactions d'oxydation de l'ADN (qu'il soit nucléaire ou mitochondrial) créent un grand nombre de dommages de l'ADN et peuvent être classées en deux catégories : les oxydations directes et les modifications par fixation de produits secondaires. Dans le premier cas, la guanine est la cible privilégiée de nombreux oxydants tels que l' $^{\bullet}\text{OH}$ et l' ONOO^- , et aboutit à la formation de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) qui constitue un marqueur expérimental du stress oxydant (Helbock *et al.*, 1999). Cette modification peut conduire, en l'absence de réparation, à diverses mutations. L'ADN peut également être modifié par l'ajout de produit de la peroxydation lipidique tels que le 4-HNE et le MDA. Ces modifications semblent fortement impliquées dans les phénomènes de cancérisation de même que les mutations de l'ADNmt pourraient être impliquées dans les phénomènes de mort cellulaire en altérant le fonctionnement mitochondrial (Pamplona, 2008; Starkov, 2008).

4.3. ROS et pathologies vasculaires

Les données des 15 dernières années montrent un rôle majeur des ROS en physiologie et physiopathologie vasculaire. Au niveau des CML, les ROS proviennent majoritairement de la NADPH oxydase et de la mitochondrie (Lyle *et al.*, 2006). L'endothélium peut également être une source de ROS *via* différents systèmes enzymatiques tels que la eNOS, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et le cytochrome P450 (Li *et al.*, 2004).

L' O_2^{\bullet} interagit avec le NO avec des constantes de vitesse très élevée, la réaction est simplement limitée par la vitesse de diffusion des deux espèces. Ceci conduit à l'inactivation du NO et à la formation d' ONOO^- , ROS non radicalaire mais potentiellement cytotoxique. Une augmentation de production d' O_2^{\bullet} conduit donc à la diminution de la biodisponibilité du NO et donc à une **dysfonction endothéliale**, facteur à l'origine de dysfonction vasculaire et jouant un

rôle majeur dans la physiopathologie de nombreuses pathologies vasculaires parmi lesquelles l'athérosclérose, la diabète ou encore les hypertensions artérielles systémique et pulmonaire (Rojas *et al.*, 2006).

5. ROS ET CIRCULATION PULMONAIRE

La circulation pulmonaire a la propriété de se contracter en réponse à une hypoxie alvéolaire de façon à maintenir un rapport ventilation/perfusion stable. A l'inverse, les artères systémiques se dilatent lors d'une hypoxie de façon à apporter suffisamment d'oxygène aux tissus. Ces observations ont amené à déterminer le senseur des variations d'oxygène dans les vaisseaux, il est maintenant bien établi que ce senseur se situe au niveau des CML vasculaires (Gupte *et al.*, 2008). Cependant, sa nature moléculaire n'a pas encore été identifiée, mais les mécanismes faisant intervenir les ROS dans le développement de l'HTAP hypoxique ont fait l'objet de nombreuses études.

5.1. ROS et HTAP idiopathique, familiale et associée (groupe 1)

Alors que les mécanismes impliquant les ROS dans l'HTAP hypoxique ont fait l'objet de nombreuses études, ce n'est pas le cas pour les HTAP du groupe 1. Cependant, une étude sur du tissu humain montre la présence d'un stress oxydant au niveau du poumon des patients. Ce stress oxydant se traduit par une augmentation des dommages sur l'ADN, une augmentation du taux de tyrosines nitrosylées, et une diminution de l'expression ainsi que de l'activité de la Mn-SOD (Bowers *et al.*, 2004).

Les études menées sur le modèle de rats MCT s'accordent à dire que les ROS sont augmentées en cas d'HTAP induite par la MCT, et un stress oxydant est observé. En effet, les ROS sont augmentées au niveau du ventricule droit de rats MCT, dont les sources de production sont la NADPH oxydase et la mitochondrie (Redout *et al.*, 2007). D'autre part, cette même étude montre une augmentation de l'expression des sous-unités gp91^{phox} et Rac, ainsi qu'une diminution de l'expression des Cu/Zn SOD et Mn SOD au niveau du ventricule droit des animaux malades. Par ailleurs, les systèmes de défenses antioxydants sont activés 1 et 2 semaines après l'injection de MCT avant le développement de l'HTAP, mais leur activité diminue de façon drastique 6 semaines après l'injection de MCT, une fois l'HTAP installée (Farahmand *et al.*, 2004).

Enfin deux études montrent que le traitement des rats MCT avec des antioxydants prévient l'apparition de l'HTAP induite par la MCT. Une première étude montre en effet que l'administration intratrachéale d'adénovirus codant la EC-SOD humaine prévient le développement de l'HTAP induite par la MCT, et une seconde équipe est arrivée au même résultat en traitant les rats avec des piègeurs de ROS (Chen *et al.*, 2001; Kamezaki *et al.*, 2008).

5.2. ROS et HTAP hypoxique (groupe 3)

Une première hypothèse fait intervenir l' H_2O_2 dont la production par les Nox ou la mitochondrie serait diminuée. Ceci inactiverait les canaux potassiques dépendants du calcium (BK_{Ca}) et dépendants du voltage ($Kv_{1.5}$) soit de façon directe, soit *via* une diminution de la production de GMPc. Ce phénomène conduit à une dépolarisation membranaire et donc à l'activation des canaux calciques dépendants du voltage de type L. L'augmentation de calcium produit alors une contraction : c'est la vasoconstriction hypoxique (VHP) qui, si elle est maintenue, aboutit au développement d'une HTAP hypoxique (Archer *et al.*, 2008) (Figure 21).

Une seconde hypothèse suggère une augmentation de la production d' H_2O_2 par les Nox et la mitochondrie en réponse à une hypoxie persistante, ceci élèverait la concentration calcique intracellulaire par un mécanisme encore inconnu, et activerait le facteur de transcription HIF-1 et la Rho kinase (Figure 21). L'activation de la Rho kinase augmenterait alors la sensibilité de l'appareil contractile au calcium et provoquerait une VHP. En parallèle, l'activation de HIF-1 augmente l'expression de gène et conduirait au remodelage des vaisseaux (Waypa *et al.*, 2006).

Enfin, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), enzyme clé de la glycolyse, pourrait être impliquée dans le développement de l'HTAP hypoxique (Figure 21). En effet, la G6PD utilisant le cofacteur NADPH, son activité altère la biodisponibilité de ce cofacteur. Cependant en cas d'hypoxie, l'activité de la G6PD diminue, élevant donc la biodisponibilité du NADPH. Ceci inactive les canaux potassiques dépendants du voltage conduisant à la dépolarisation membranaire et l'activation des canaux calciques de type L (Gupta *et al.*, 2008).

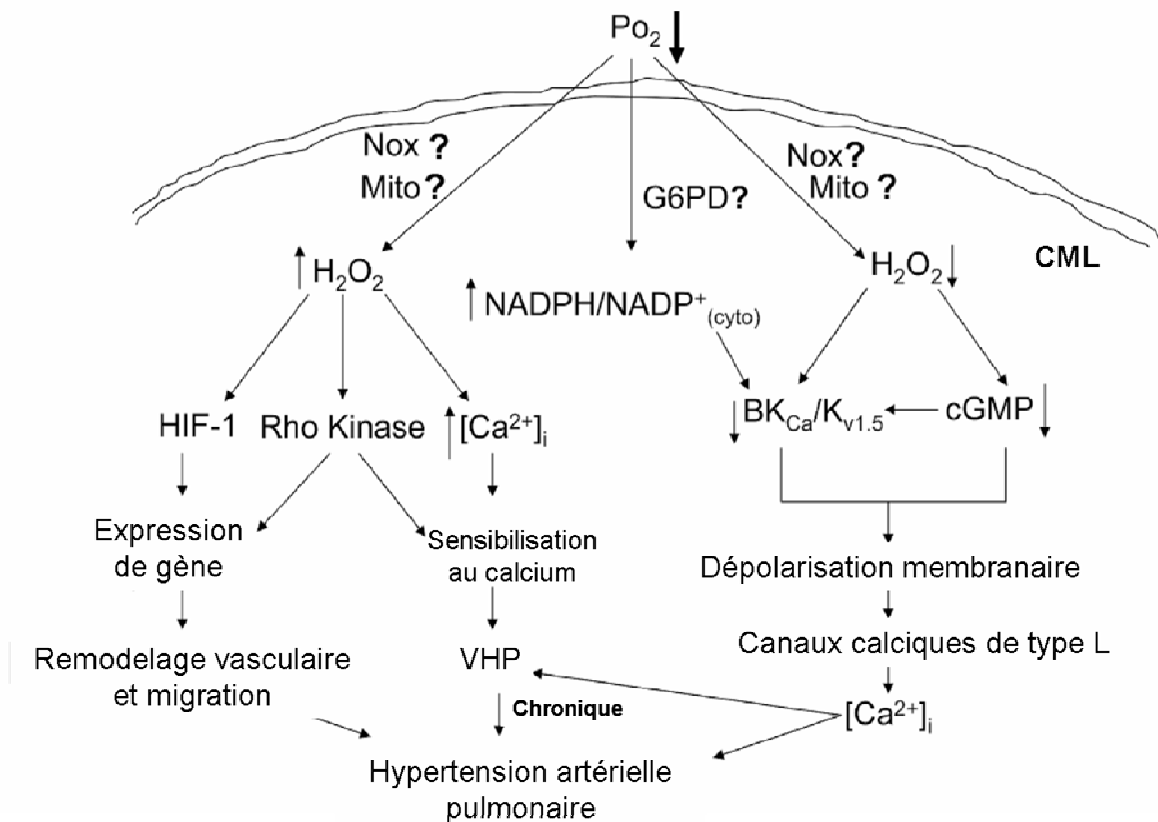


Figure 21 : schéma récapitulatif de l'implication des ROS dans l'HTAP.

(D'après Gupte et al., 2008). Hypothèses permettant d'expliquer le rôle des ROS dans l'HTAP : la production d' H_2O_2 par les Nox ou la mitochondrie est soit diminuée soit augmentée, induisant respectivement une vasoconstriction et un remodelage des artères pulmonaires. Plus récemment, une nouvelle hypothèse faisant intervenir la G6PD et les Nox dans la vasoconstriction est apparue.

L'implication de la NADPH oxydase dans la physiopathologie de l'HTAP hypoxique a été proposée récemment, notamment grâce aux souris KO pour la sous-unité gp91^{phox}. Lorsque ces souris sont soumises à 3 semaines d'hypoxie normobare, elles ne développent pas d'HTAP, ni d'hypertrophie du ventricule droit, ni d'épaississement de la paroi des artères pulmonaires (Liu et al., 2006). D'autre part, les artères pulmonaires issues de ces souris ne présentent pas d'hyperréactivité à la sérotonine. De plus, une étude menée au laboratoire a montré qu'il existe une dysfonction endothéliale au niveau des AIP de souris atteintes d'HTAP hypoxique, mais cette dysfonction endothéliale n'est pas observée au niveau des AIP de souris gp91^{phox} -/- soumises à 3 semaines d'hypoxie chronique (Fresquet et al., 2006). Ainsi, chez la souris, la production d' $O_2^{\bullet-}$ par la NADPH oxydase est à l'origine de la dysfonction endothéliale observée dans l'HTAP.

D'autre part, il a aussi été montré par des approches génétiques, l'implication de la BH₄ dans le développement de l'HTAP. En effet, des souris n'exprimant pas l'enzyme catalysant la première étape de synthèse de BH₄ (cofacteur nécessaire à la production de NO par la eNOS, Cf

2.3. de la partie « les espèces réactives dérivées de l'oxygène ») développe une hypertrophie du ventricule droit ainsi qu'un épaississement de la média des vaisseaux pulmonaires. Ces souris développent une HTAP de façon spontanée, sans exposition à l'hypoxie chronique, mais pas d'hypertension systémique. Cependant, ces phénomènes sont accentués lorsque les animaux sont exposés à une hypoxie chronique (Khoo *et al.*, 2005). Lors de cette même étude, les auteurs ont également utilisé des souris surexprimant l'enzyme à l'origine de la synthèse de BH₄, ces souris ne développent pas d'HTAP lorsqu'elles sont exposées à une hypoxie chronique. Cette étude montre l'importance de la BH₄ dans le développement de l'HTAP hypoxique et suggère un rôle clé du degré de couplage/découplage de la eNOS dans l'apparition de la pathologie.

6. ROS, 5-HT ET CIRCULATION PULMONAIRE

La 5-HT est capable d'activer la production d'O₂[•] *via* l'activation de la sous-unité régulatrice Rac1 de la NADPH oxydase au niveau des CML d'artère pulmonaire de bœuf. Ce phénomène est inhibé à la fois par des antagonistes des récepteurs et des inhibiteurs des transporteurs à la 5-HT. La production d'O₂[•] induite par la 5-HT conduit à l'activation de ERK1/ERK2 (protéines de la famille des MAP kinases) puis à l'activation de l'expression de gènes (Lee *et al.*, 1999). Cette cascade de signalisation a mis en évidence l'implication de l'O₂[•] dans la prolifération des CML bovines, et pourrait expliquer la prolifération des CML observée dans l'HTAP.

D'autre part, au niveau des CML d'artères pulmonaires de souris, la production d'O₂[•] par la 5-HT potentialise la réponse contractile à la 5-HT. Enfin, l'O₂[•] produit par la 5-HT provient également de la NADPH oxydase, mais la sous-unité gp91^{phox} n'intervient pas (Liu *et al.*, 2004a).

MATERIELS ET METHODES

1. ANIMAUX

1.1. Groupe contrôle

Des rats mâles de souche Wistar d'un poids compris entre 300 et 400 g (Janvier, Le Genest-Saint-Isle) ont été utilisés. Les animaux sont élevés dans des conditions constantes de température et d'humidité avec des cycles de 12 heures de jour/12 heures de nuit ; ils reçoivent de l'eau et sont nourris *ad libitum*.

1.2. Modèles animaux d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

1.2.1. Modèle animal : le rat traité à la monocrotaline (MCT)

Les rats sont traités à la monocrotaline grâce à une injection intrapéritonéale de 60 mg/Kg de monocrotaline diluée dans une solution d'un volume équivalent d'HCl 1M et de NaOH 1 M pH 7. En parallèle, un groupe de rats contrôles reçoit une injection du solvant (HCl 1 M + NaOH 1 M, pH 7).

Ce modèle pathologique a été validé dans le laboratoire, grâce à la mesure de différents paramètres mettant en évidence le développement d'une HTAP chez ces animaux. Parmi eux, la mesure de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) qui s'élève à 15 ± 2 mm Hg ($n = 5$) chez les rats du groupe contrôle, et qui atteint $29,8 \pm 1,3$ mm Hg chez les rats MCT ($n = 5$) (Figure 22). L'hypertrophie du ventricule droit est évaluée par le rapport de Fulton. Ce rapport est défini par le rapport du poids du ventricule droit sur le poids du ventricule gauche plus septum. Il s'élève à $0,2 \pm 0,03$ chez les rats du groupe contrôle ($n = 61$), et atteint $0,51 \pm 0,1$ dans le modèle de rat MCT ($n = 53$) (Figure 22).

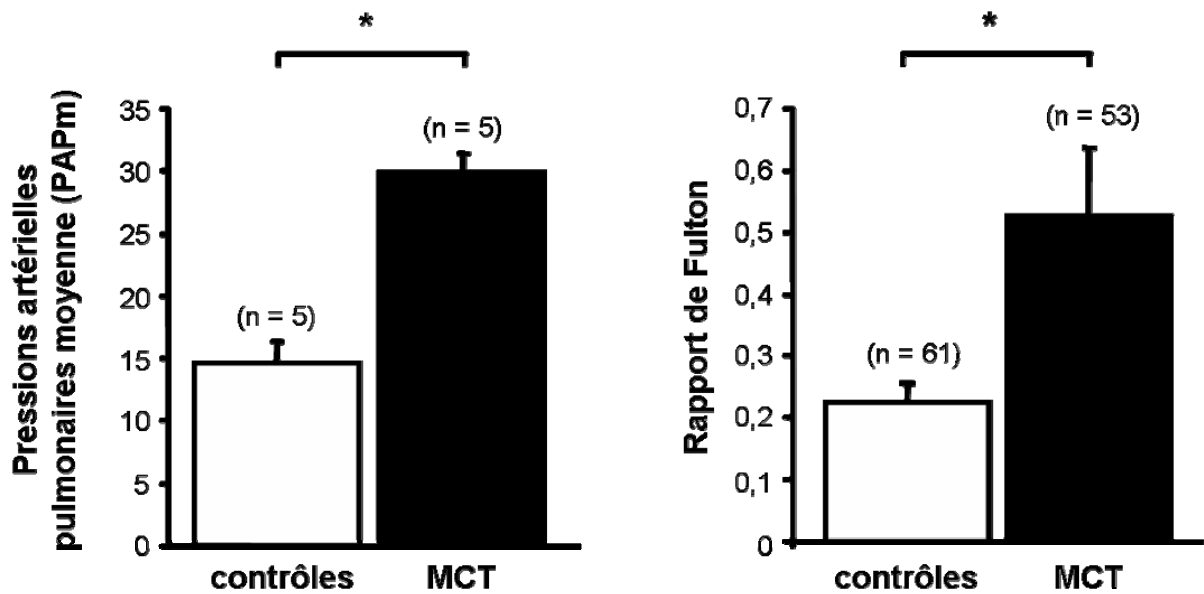


Figure 22 : validation du modèle de rat MCT

*Pressions artérielles pulmonaires moyennes (gauche) et rapport de Fulton (droite) des groupes de rats contrôles et de rats monocrotalines (MCT). * indique une différence significative par rapport au groupe contrôle, $P < 0,05$.*

1.2.2. Modèle animal : le rat hypertendu suite à une hypoxie chronique (HC)

Les rats sont placés dans un caisson hypobare (Minerve, Esternay) (Figure 23) pendant 3 semaines, et subissent une pression barométrique de 380 mmHg équivalent à $\frac{1}{2}$ atmosphère et à une altitude de 5500 m. La pression inspirée en oxygène est donc diminuée de moitié par rapport au groupe contrôle, et s'élève à 80 mmHg.

Le caisson est divisé en plusieurs compartiments, chaque compartiment pouvant recevoir une cage de 4 rats. Chaque compartiment possède un capteur de pression ; ainsi qu'une entrée d'air unique, avec un débit de renouvellement de 10 l/min. Le capteur de pression permet, quant à lui, de maintenir la pression de 380 mmHg constante au sein du compartiment.



Figure 23 : caisson hypobare.

Les animaux sont placés dans une chambre hypobare (gauche) pendant 3 semaines. La pression barométrique est contrôlée grâce à un système de régulation automatique (droite).

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

De la même façon que le modèle de rat MCT, la mise en place de l'HTAP a été vérifiée sur le modèle de rat HC en mesurant les pressions artérielles pulmonaires moyennes et le rapport de Fulton. La PAPm s'élève à $15,6 \pm 0,81$ mm Hg ($n = 5$) chez les rats du groupe contrôle, et atteint $30,4 \pm 1,03$ mm Hg ($n = 5$) chez les rats HC. Quant à la mesure du rapport

de Fulton, il est de $0,27 \pm 0,004$ ($n = 100$) pour le groupe contrôle, et s'élève à $0,51 \pm 0,011$ ($n = 100$) chez les rats HC.

2. ARTERE PULMONAIRE DE RAT

Les rats sont sacrifiés par asphyxie au CO_2 , puis le poumon est prélevé et placé dans une solution de Krebs-Hepes bicarbonate (KHB).

	Concentrations (mM)
Chlorure de sodium (NaCl)	118,4
Chlorure de potassium (KCl)	4,7
Sulfate de magnésium (MgSO_4)	1,2
Sodium hydrogénocarbonate (NaHCO_3)	4
Potassium dihydrogénophosphate (KH_2PO_4)	1,2
Chlorure de calcium (CaCl_2)	2,5
Hepes	10
Glucose	6

Tableau 5 : composition de la solution de Krebs-Hepes bicarbonate.

Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH.

Les artères intrapulmonaires de 1^{er} (AIP1) et 3^{ème} ordre (AIP3) sont ensuite disséquées sous loupe binoculaire (Figure 24).

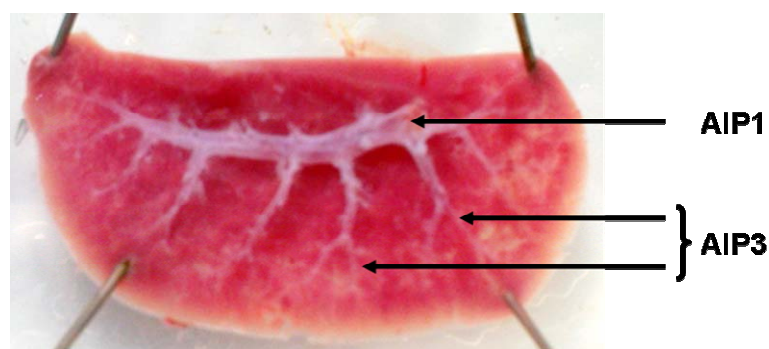


Figure 24 : arbre artériel intrapulmonaire de poumon gauche de rat.

Les AIP3 seront par la suite utilisées pour étudier leur réponse calcique et contractile à la sérotonine, mais également pour la RT-PCR, le Western Blot, l'immunofluorescence, et l'étude de la communication myoendothéliale. La résonance paramagnétique des électrons ainsi que le dosage du GMPc seront réalisés sur l'arbre vasculaire pulmonaire entier.

Quant aux AIP1, elles seront utilisées par la suite pour étudier leurs réponses contractiles à divers agonistes.

3. CELLULES MUSCULAIRES LISSES ARTERIELLES PULMONAIRES

3.1. Dissociation cellulaire

Les AIP3 d'un rat sont disséquées de façon stérile, puis coupées en petits morceaux. Ceux-ci sont ensuite incubés 6 minutes à 37°C dans une première solution enzymatique composée de 1,5 mg/ml de papaïne, 1 mg/ml de DiThioThreitol (DTT) et 2 mg/ml d'albumine sérique de bovin (BSA), le tout dilué dans la solution dite de dissociation (SD, cf. tableau 6). Les vaisseaux sont ensuite récupérés à l'aide d'une pipette pasteur et transférés dans une seconde solution enzymatique composée de 1,5 mg/ml de collagénase H, 1,5 mg/ml d'inhibiteur de trypsine et 2 mg/ml de BSA, le tout dilué dans SD. Après 6 minutes d'incubation à 37°C, les vaisseaux sont transférés dans la solution SD et sont dissociés mécaniquement. Le liquide est ensuite récupéré et centrifugé, puis le culot de cellules dissociées est remis en suspension dans du milieu de culture stérile (milieu Dubelcco modifié par Eagle – DMEM – Gibco) contenant un mélange d'antibiotiques et d'antimycotiques (100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 0,25 µg/ml d'amphotéricine B (Gibco)), 1 % d'acides aminés non essentiels (Sigma), 1 % de sodium pyruvate (Sigma) et 10 % de sérum de veau foetal inactivé (Gibco).

	Concentrations (mM)
Chlorure de sodium (NaCl)	145
Chlorure de potassium (KCl)	4
Chlorure de magnésium (MgCl₂)	1
Chlorure de calcium (CaCl₂)	0,05
Hepes	10
Glucose	10

Tableau 6 : composition de la solution de dissociation (SD).

3.2. Culture cellulaire

Cette suspension cellulaire est ensuite déposée dans des puits de plaque de culture de 6 puits (300 µl par puits), ainsi que sur des lames de culture à 8 puits (chamber's slides – 100 µl par puits), le tout est placé à 37°C, dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Au bout de 24h, 2 ml de milieu sont rajoutés dans les puits de plaque de culture 6 puits, et 200 µl dans les

puits des lames de culture à 8 puits. Le milieu de culture est changé toutes les 48 heures, et la viabilité des cellules est appréciée quotidiennement sous microscope.

Une fois les cellules confluentes, elles sont rendues quiescentes par une incubation de 48h avec un milieu équivalent dont le sérum est remplacé par une solution contenant 10 µg/ml d'insuline, 5,5 mg/ml de transferrine et 5 ng/ml de sélénite de sodium (ITS, Sigma). Cette étape permet de faire évoluer les cellules du phénotype prolifératif au phénotype contractile.

Après ces 48h d'ITS, le phénotype musculaire lisse des cellules ensemencées sur les lames de culture à 8 puits sera vérifié, et la détection des connexines sera réalisée par immunofluorescence.

3.3. Vérification du phénotype musculaire lisse des cellules

Les cellules en culture dans les lames de culture à 8 puits sont rincées au PBS, puis fixées et perméabilisées pendant 15 minutes avec du méthanol froid (-20°C), à -20°C. Après rinçage du méthanol au PBS, les sites de fixation non spécifiques sont bloqués avec du PBS-tween 0,05 % contenant 4 % de BSA pendant 45 minutes. Les cellules sont alors incubées dans l'anticorps primaire dilué dans du PBS tween 0,05 % contenant 1 % de BSA. Deux anticorps primaires sont utilisés pour le phénotypage des CML : un anticorps dirigé contre l' α -actine du muscle lisse (clone 1A4, Sigma), et un anticorps dirigé contre la calponine (Santa Cruz). Ces deux anticorps sont utilisés à 0,2 µg/ml et à 2 µg/ml respectivement et incubés pendant 2 heures à température ambiante.

Après 3 lavages de 5 minutes au PBS tween 0,05 %, les cellules sont incubées pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire correspondant : l'anticorps anti- α -actine du muscle lisse étant produit chez la souris, les cellules sont incubées avec un anticorps reconnaissant les IgG de souris, alors que l'anticorps anti-calponine étant produit chez le lapin, les cellules sont incubées avec un anticorps dirigé contre les IgG de lapin. Dans les deux cas, l'anticorps secondaire est dilué dans du PBS tween 0,05 % contenant 1 % de BSA, et il est couplé au fluorophore Alexa 546® (Molecular Probes). Après 2 lavages au PBS tween 0,05 %, les noyaux des cellules sont marqués pendant 20 minutes à température ambiante dans du Hoechst (45 µM, Molecular Probes) dilué dans du PBS tween 0,05 %. Enfin, les cellules sont lavées au PBS tween 0,05 % puis au PBS seul et les lames sont montées avec du Fluorescent mounting medium (Dako).

Les marquages fluorescents sont ensuite observés avec un microscope confocale (Nikon TE2000) à l'aide d'un objectif plan apochromatique, d'un grossissement de 60, d'ouverture numérique (NA) 1,40 et à immersion à huile (Figure 25). Afin d'observer les noyaux marqués au Hoechst, les cellules sont excitées à l'aide d'un laser diode à 408 nm et la

fluorescence émise en retour est filtrée à 450 ± 35 nm. Quant au marquage immunologique, l'Alexa 546® est observé en excitant les cellules à l'aide d'un laser hélium-néon à 543 nm, et la fluorescence émise est filtrée à 605 ± 75 nm.

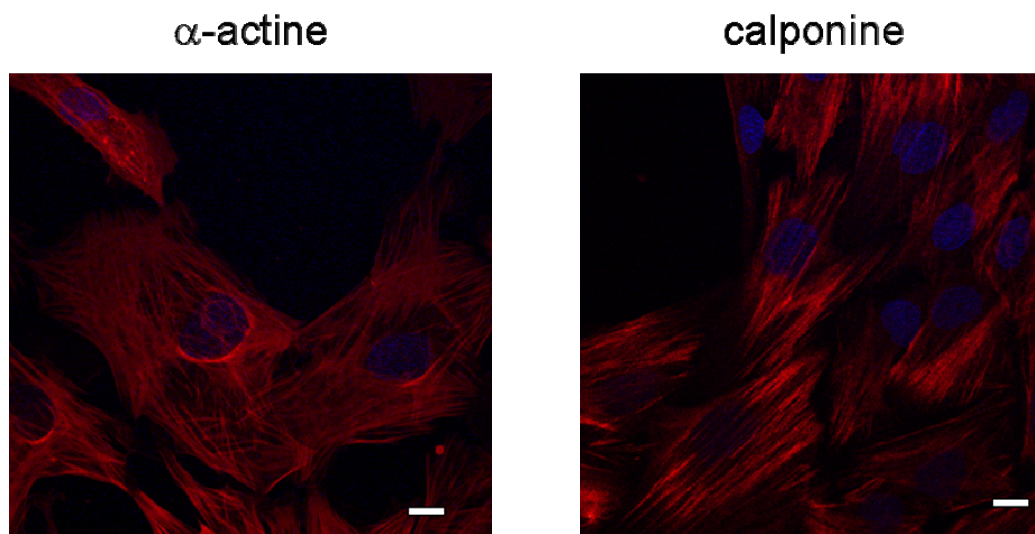


Figure 25 : vérification phénotypique des cellules utilisées.

La barre représente une distance de 15 μ m

Mesure simultanée du calcium et de la contraction

1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

1.1. La sonde calcique

Les premières sondes fluorescentes dépendantes du calcium ont été synthétisées dans les années 1980. Le représentant principal de ces sondes dites de première génération est le Quin-2. Il s'agissait alors d'une sonde composée d'un chélateur de Ca^{2+} (l'EGTA ou le BAPTA) associé à un fluorophore. Cette sonde a rapidement été abandonnée en raison de son faible rendement quantique. Par la suite, des sondes de deuxième génération ont donc été développées telles que le Fura-2 et l'Indo-1 (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Ces sondes sont dites ratiométriques ou à deux longueurs d'onde et permettent de mesurer des variations de concentration de calcium, en s'affranchissant des problèmes liés à

- la sensibilité des appareils de mesure
- la variation de la quantité de lumière émise dans le temps (variation de lumière liée à une extinction naturelle de la fluorescence par l'excitation lumineuse : le « bleaching »)
- la forme de la cellule étudiée
- la variation de la concentration intracellulaire de la sonde

Lors de nos expériences, nous avons utilisé la sonde Fura-PE3 (Figure 26), sonde dérivée du Fura 2, améliorée pour éviter la fuite de la sonde hors des cellules ainsi que la compartimentation de la sonde dans les organelles. De plus, cette sonde est plus brillante et permet d'étudier les variations de concentrations calciques sur des périodes plus longues par rapport au Fura 2 (Vorndran *et al.*, 1995).

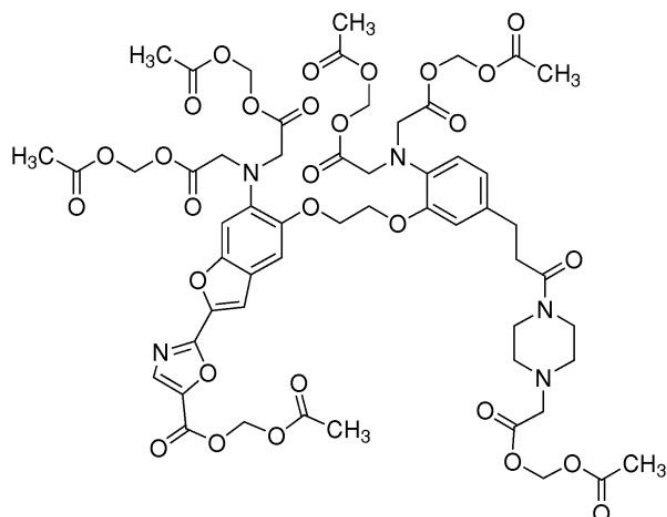


Figure 26 : structure de la sonde calcique Fura-PE3.

(<http://www.sigmaaldrich.com>, produit 17081)

La sonde Fura-PE3 utilisée est une molécule qui a la propriété d'émettre un signal de fluorescence différent lorsqu'elle a chélaté ou non le calcium libre intracellulaire. Elle est excitée alternativement à deux longueurs d'onde différentes : 340 nm pour mesurer l'intensité de fluorescence de la sonde liée au calcium, et 380 nm pour la sonde libre. La fluorescence émise est alors mesurée à 510 nm. Le Fura-PE3 est donc une sonde dite double excitation – mono émission. En absence de calcium, la sonde émet avec une forte intensité lorsqu'elle est excitée à 380 nm. En revanche, plus la concentration en calcium augmente, plus cette intensité diminue, et plus l'intensité de fluorescence augmente lorsque la sonde est excitée à 340 nm. Ainsi, en fonction de la concentration en calcium, et donc de la quantité de sonde liée au calcium, on aura à la fois une modification de l'intensité de fluorescence de la sonde et un déplacement du spectre d'excitation (Figure 27)

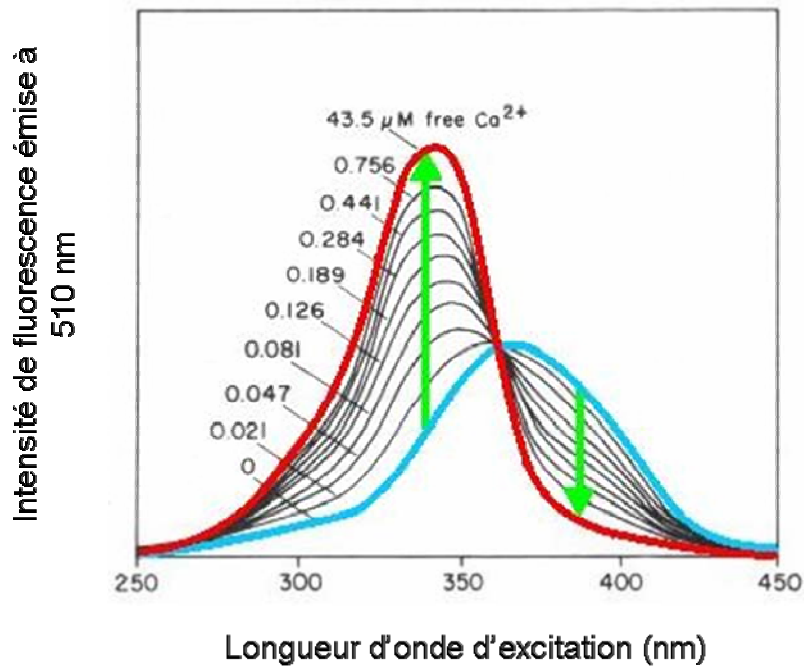


Figure 27 : variation de l'intensité de fluorescence du Fura-PE3 en fonction du spectre d'excitation.

(D'après Vorndran *et al.*, 1995).

D'autre part, le Fura-PE3 a une forte affinité pour le calcium, ce qui permet de mesurer de façon précise de faibles variations de concentration calcique. La constante de dissociation (K_d) est de 290 nM (Vorndran *et al.*, 1995), cette sonde est donc adaptée aux concentrations calciques intracellulaires de nos expériences. De plus, cette sonde présente une bonne sélectivité au calcium par rapport à des cations divalents comme le Mg^{2+} ($K_d = 4 \text{ mM}$) (Vorndran *et al.*, 1995).

1.2. Artériographie

L'artériographe (Figure 28, Danish MyoTechnology, Danemark) permet de se rapprocher des conditions de pressurisation *in vivo*. En effet, ce dispositif permet de faire passer du liquide à l'intérieur du vaisseau, de le pressuriser et de maintenir une pression intraluminale constante grâce à un système de régulation.

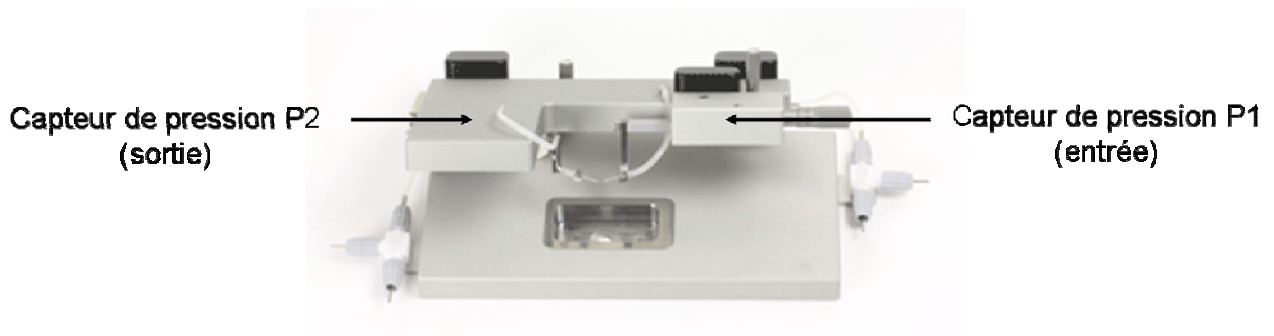


Figure 28 : artériographe utilisé pour pressuriser les artères intrapulmonaires de 3^{ème} ordre de rats.

Les AIP3 sont montées sur des pipettes de verre étirées, et sont maintenues sur celles-ci par du fil de nylon (Figure 29).



Figure 29 : artère intrapulmonaire de 3^{ème} ordre de rat montée sur les pipettes de verre de l'artériographe, et pressurisée à 10 mm Hg.

Le sang résiduel à l'intérieur du vaisseau est ensuite lavé en faisant passer du KHB sur la face intraluminale. Le circuit de circulation intraluminale est alors fermé, ce qui permet de pressuriser les vaisseaux à 10 mm Hg pour les AIP3 provenant de rat contrôle, et à 20 mm Hg pour les AIP3 provenant de rat HC et de rat MCT. L'AIP3 utilisée ne doit pas excéder 1 à 2 mm de long pour éviter toute collatérale, et ne doit pas avoir de trou dans la paroi pour éviter toute fuite du liquide intraluminale, et la formation de turbulences à l'intérieur du vaisseau.

La cuve dans laquelle est placé le vaisseau monté est remplie avec du KHB, celui-ci est bullé à l'air pour les AIP3 provenant de rat contrôle et de rat monocrotaline, et avec un mélange gazeux contenant 9 % d'O₂, 5 % de CO₂ et 86 % de N₂ pour les AIP3 provenant de rat hypoxique chronique. La cuve est maintenue à 37°C grâce à un système de régulation de la température.

1.3. Charge des vaisseaux

Une fois le vaisseau monté et pressurisé dans l'artériographe, il est incubé pendant 1 heure à 37°C dans du KHB contenant 2 µM de Fura-PE3 sous forme acétoxyméthylester (AM).

Ce groupement AM confère à la sonde des propriétés lipophiles lui permettant de traverser la membrane cytoplasmique. Une fois la membrane cytoplasmique traversée, le groupement AM est clivé par les estérases membranaires, la sonde perd alors cette propriété lipophile et ne peut plus traverser la membrane cytoplasmique. Le vaisseau est ensuite lavé quelques minutes avec du KHB afin d'éliminer toute trace de Fura-PE3 dans le bain.

1.4. Vidéomicroscopie

L'artériographe est placé sur un microscope inversé à épifluorescence (Olympus IX70), et le vaisseau pressurisé est observé avec un objectif x 10, NA 0,40, Apochromat à immersion à eau. Afin de suivre les variations de calcium, le vaisseau chargé en Fura-PE3 est excité alternativement à 345 nm et à 380 nm pendant 600 et 300 ms respectivement, et ce, grâce à une roue à filtre (Sutter Instruments) pilotée par ordinateur (logiciel MetaFluor). La source lumineuse est une lampe au Xénon (100 W), la lumière incidente traverse les filtres de la roue à filtre, puis est réfléchiée sur la préparation grâce à un miroir dichroïque (390 nm). La fluorescence émise par la préparation va traverser ce même miroir dichroïque, et seules les longueurs d'onde de 510 ± 23 nm vont être sélectionnées grâce à un filtre. Ce signal va alors être capté et enregistré par une caméra CCD (Coolsnap fx Monochrome, Photometrics) et l'acquisition des images est réalisée toutes les 20 secondes à une résolution de 12 bits et 1030 x 1030 pixels. Les informations sont alors transmises à un ordinateur et l'acquisition se fait avec le logiciel MetaFluor (Ropper Scientifique) (Figure 30).

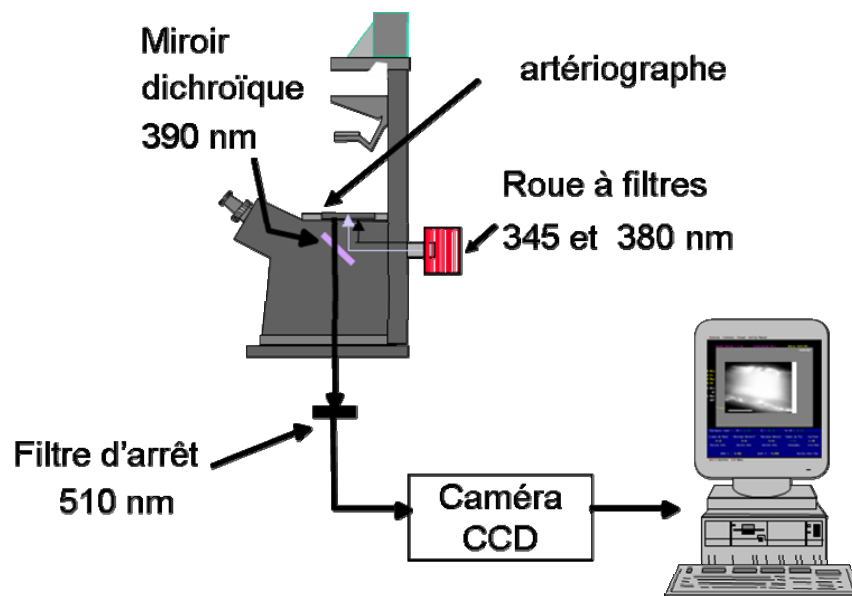


Figure 30 : schéma de l'installation de vidéomicroscopie.

1.5. Analyse des données

1.5.1. Calcium

Les intensités de fluorescences émises suite aux excitations à 345 et 380 nm sont mesurées au niveau de 4 régions dessinées sur la paroi du vaisseau à l'aide du logiciel MetaFluor (Ropper Scientific). Ces intensités sont corrigées en soustrayant le bruit de fond, puis le rapport des deux intensités de fluorescences corrigées est réalisé. On calcule alors les ratio 345 nm / 380 nm en condition basale et en condition stimulée (lors d'une contraction à la 5-HT) puis, la différence entre ces deux ratios. Les résultats sont alors exprimés en delta ratio 345 nm / 380 nm mettant ainsi en évidence la variation de calcium induite par la stimulation.

1.5.2. Contraction

Grâce au logiciel MetaMorph (Ropper Scientific), le bruit de fond est soustrait de toutes les images acquises suites aux excitations à 345 et 380 nm, puis, une nouvelle image ratiométrique correspondant au ratio 345 nm / 380 nm est construite. Sur cette nouvelle image, 3 lignes sont dessinées dans l'axe perpendiculaire au vaisseau, et le nombre de pixels fluorescents présents sur ces lignes est calculé puis moyenné. Au préalable, une calibration a été réalisée, ceci a permis de définir que la taille d'un pixel, à l'objectif utilisé ($\times 10$), est de $1,111 \mu\text{m} \times 1,111 \mu\text{m}$. Cette calibration permet donc de définir le diamètre externe du vaisseau au cours de l'expérience.

Les variations du diamètre externe lors des stimulations à la 5-HT sont comparées au diamètre externe initial, et les résultats sont exprimés en pourcentage de contraction.

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

2.1. Mesure simultanée du calcium et de la contraction en réponse à la 5-HT

2.1.1. Etude de la réponse à la 5-HT sur les AIP3 de rats contrôles

Le vaisseau baigne dans 5 ml de KHB bullé puis, une fois l'acquisition des images démarrée, des doses croissantes de sérotonine sont ajoutées afin de construire une courbe dose - réponse à cet agoniste. Le vaisseau est ensuite lavé, afin qu'il retrouve son diamètre initial au repos. Puis, le vaisseau est mis en présence des différents inhibiteurs à la fois sur la face extraluminale (bain de la cuve, 5 ml) et à la fois sur la face intraluminale (solution à l'intérieur des pipettes de verre). Après 30 minutes à 1 heure d'incubation selon l'inhibiteur en question, une nouvelle acquisition des images est effectuée et une nouvelle courbe doses - réponse à la sérotonine est construite.

Ce protocole présente l'avantage de pouvoir comparer la réponse à la sérotonine en présence et en absence d'un inhibiteur sur le même vaisseau. Auparavant, la reproductibilité de deux réponses successives à la sérotonine a été vérifiée, en respectant un intervalle d'1 heure entre les deux contractions (Figure 31).

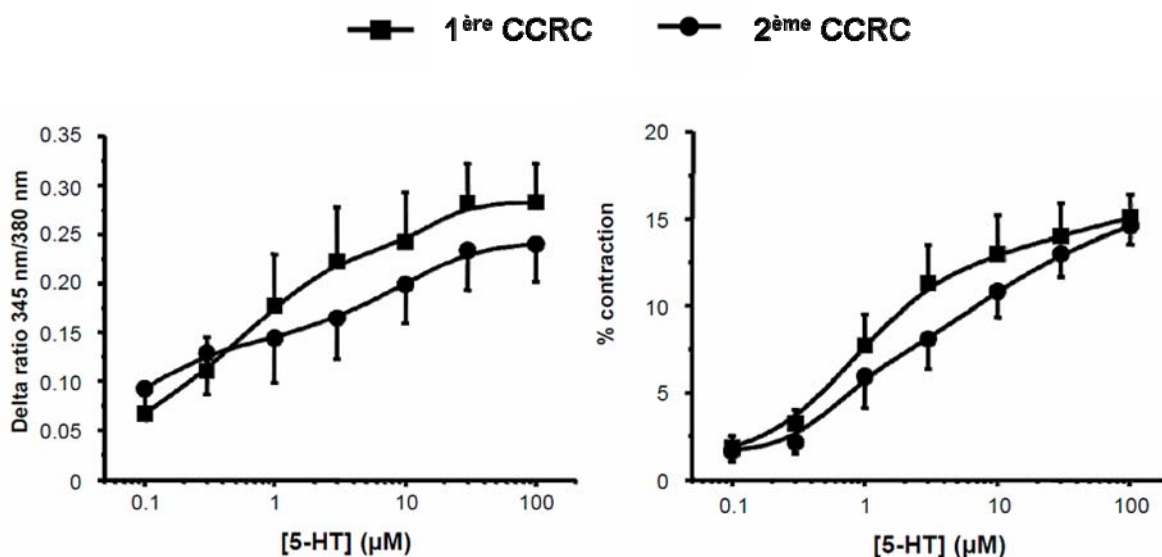


Figure 31 : reproductibilité de deux réponses successives à la sérotonine sur une même AIP3 provenant de rats contrôles.

Gauche : réponse calcique, droite : réponse contractile. CCRC : courbe en réponse à des doses cumulées.

2.1.2. Etude comparative entre les rats contrôles, HC et MCT

Pour cette seconde étude, le protocole décrit précédemment n'était pas réalisable car l'étude de la reproductibilité de deux réponses successives à la sérotonine sur les AIP3 provenant de rats HC et MCT, a révélé que la seconde réponse à la sérotonine est très instable.

Après avoir été chargé en sonde calcique, le vaisseau est donc mis en présence des différents inhibiteurs à la fois sur la face extraluminale et intraluminale, puis la réponse à la sérotonine est enregistrée.

2.2. Inhibition des jonctions communicantes

Le rôle fonctionnel des connexines 37, 40 et 43 a été étudié en utilisant des peptides bloqueurs spécifiques, tels que le ³⁷⁻⁴³Gap 27, le ⁴⁰Gap 27 et le ⁴³Gap 26 (Chaytor *et al.*, 1997) (Figure 32, cf 4.1. de la partie « les jonctions communicantes » de l'introduction).

Le ³⁷⁻⁴³Gap 27 est une séquence de 11 acides aminés (SRPTEKTIFII) qui va empêcher la dimérisation des connexons composés des connexines 37 et/ou 43. Si ce premier inhibiteur a un effet sur la réponse étudiée, le ⁴³Gap 26 (VCYDKSFPIHVVR) sera utilisé dans un deuxième temps afin de discriminer si la connexine 43 est à l'origine de cet effet. Enfin, le ⁴⁰Gap 27 (SRPTEKNVFIV) bloque la formation des jonctions communicantes composées de connexine 40.

Afin de vérifier la spécificité de l'effet de ces peptides bloqueurs, nous avons étudié l'effet du ⁴³Gap 20 (EIKKFKYGC) sur la contraction induite par la sérotonine. Le ⁴³Gap 20 est un analogue inactif du ³⁷⁻⁴³Gap 27, il s'agit en effet d'une séquence peptidique homologue à la boucle intracellulaire des connexines, il n'empêche donc pas la formation des jonctions communicantes.

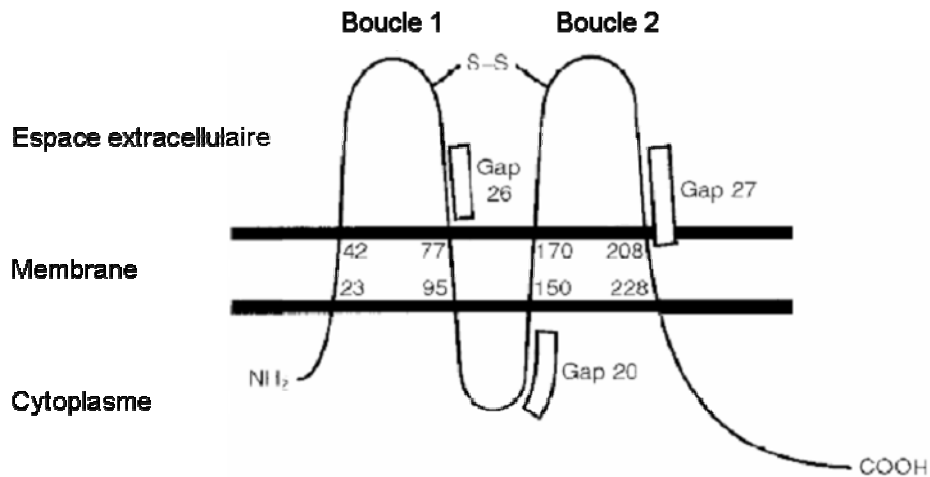


Figure 32 : Localisation des peptides Gap 20, Gap 26 et Gap 27

Les peptides possèdent des homologies avec les boucles extracellulaires et intracellulaires des connexines. (D'après Chaytor et al., 1997).

Mesure de la contraction isométrique

1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Les AIP1 disséquées sont coupées en 4 anneaux de taille équivalente. Ceux-ci sont montés dans des cuves thermostatées à 37°C de 5 ml, alimentées par une solution physiologique de Krebs-Henseleit (Tableau 7).

	Concentrations (mM)
Chlorure de sodium (NaCl)	118,4
Chlorure de potassium (KCl)	4,7
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	1,2
Sodium hydrogencarbonate (NaHCO ₃)	25
Potassium dihydrogénophosphate (KH ₂ PO ₄)	1,2
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	2,5
Glucose	11,1

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

Les anneaux sont ensuite accrochés grâce à deux agrafes passant à l'intérieur de l'anneau (Figure 33) : une première agrafe permet de relier le tissu à la cuve (agrafe inférieure), et une deuxième agrafe relie l'anneau au capteur de force (agrafe supérieure ; IOX, EMKA technologies).

Durant toute l'expérience, la solution est barbotée avec un mélange gazeux composé de 15 % d'O₂, 5 % de CO₂ et 80 % de N₂ pour les anneaux issus de rats contrôles et MCT, et avec un mélange gazeux contenant 9 % d'O₂, 5 % de CO₂ et 86 % de N₂ pour les anneaux issus de rats HC.

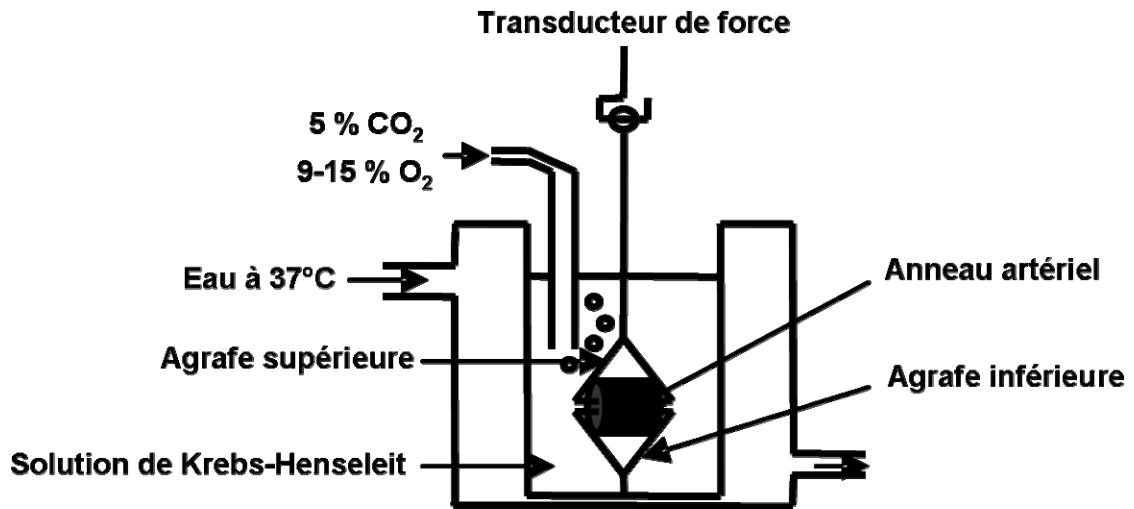


Figure 33 : représentation schématique du montage permettant la mesure de la contraction isométrique des anneaux d'artère pulmonaire de premier ordre.

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les anneaux issus des AIP1 sont équilibrés au début de l'expérience contre une charge initiale de 0,8 g pour les anneaux issus de rats contrôles, et de 1,6 g pour les anneaux issus de rats HC et MCT. Des études préalables ont montré que ces valeurs de charge étiraient les anneaux à leur longueur optimale (L_0), c'est-à-dire la longueur pour laquelle la force isométrique développée après stimulation avec une solution hyperpotassique (KCl 80 mM) est maximale.

Une contraction de référence est effectuée avec du chlorure de potassium 80 mM (KCl) dans le but de normaliser les résultats. La contraction au KCl 80 mM n'est pas significativement différente entre les anneaux d'AIP1 de rats contrôles, HC et MCT. Après relaxation du tissu à sa charge initiale, des courbes en réponse à des concentrations cumulées (CCRC) de divers agonistes sont réalisées en présence ou non de peptides bloqueurs des jonctions communicantes.

Dans le cas où l'étude a été menée en présence de peptides bloqueurs, les anneaux ont été au préalable mis en présence de ce peptide pendant 1 heure avant la contraction à la sérotonine. Les contractions obtenues en réponse aux divers agonistes en présence ou non de peptide bloqueur sont exprimées en pourcentage de contraction au KCl 80 mM.

La fonctionnalité de l'endothélium est vérifiée pour chaque anneau en fin d'expérience. Pour cela, les anneaux sont précontractés à la phényléphrine (0,3 μ M ; Sigma) puis la relaxation est induite par 10 μ M de carbamylcholine (Sigma). Une relaxation supérieure à 30 % de la valeur de précontraction atteste de la présence d'un endothélium fonctionnel.

1. EXTRACTION D'ARN

Les AIP3 de rat sont prélevées, découpées en petits morceaux et dissociées dans 600 µl de solution de TRIzol® (Invitrogen) à l'aide de seringues équipées d'aiguille de calibre décroissant (21 à 26G). L'ajout de 120 µl de chloroforme (Sigma) et de 1,5 µl de glycogène ainsi qu'une centrifugation à 15000 g pendant 15 minutes à 4°C permet d'obtenir en surface une phase aqueuse et incolore, dans laquelle se trouvent les ARN totaux. Cette phase incolore est alors récupérée et l'addition d'un volume équivalent d'isopropanol (Sigma) permet de précipiter les ARN totaux. Le tube est alors centrifugé à 15000 g pendant 15 minutes à 4°C, afin de récolter les ARN totaux précipités qui forment un culot. Ce culot est par la suite lavé avec 800 µl d'éthanol (Sigma) à 80%, puis le culot est séché et resuspendu dans 20 µl d'eau dépourvue de RNase (Promega).

La quantité d'ARN totaux extraite est ensuite mesurée grâce au spectrophotomètre Gene Quant RNA/DNA calculator (Amersham Pharmacia).

L'ADN résiduel est ensuite éliminé en ajoutant 2 unités de DNase I dépourvue de RNase (Roche Molecular Biochemical). Le tout est incubé à 37°C pendant 1 heure, puis l'enzyme est inactivée à 55°C pendant 10 minutes.

2. REVERSE TRANSCRIPTION (RT)

La synthèse d'ADNc s'effectue à partir d'1 µg d'ARN totaux. Ils sont mis en présence de dNTP (1 mM chacun ; Promega), d'oligo dT (0,5 µg ; Promega), d'inhibiteur de ribonucléase (Rnasin® ; 40 unités ; Promega), de Reverse Transcriptase provenant du virus AMV (Avian Myeloblastosis Virus ; 15 unités ; Promega). La synthèse d'ADNc s'effectue pendant 1 heure à 42°C, puis l'enzyme est inactivée à 94°C pendant 3 minutes.

L'amorce d'oligo d(T) utilisée permet de n'amplifier que les ARN messagers et non les ARN ribosomiaux qui ne possèdent pas de queue Poly(A) en 3'.

3. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) EN TEMPS REEL

Les paires d'amorces spécifiques ont été conçues avec le logiciel Oligo 6.6 (Molecular Biology Insights) et synthétisées par Sigma-Genosys.

L'amplification de 4 gènes domestiques (Glyceraldéhyde 3 Phosphate Deshydrogenase : GAPDH ; Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase : HPRT ; Ribosomal Phosphoprotein : PO ; Tyrosine 3-monooxygenase/Tryptophan 5-monooxygenase

Activation Protein, Zeta polypeptide : YWHAZ) et des 3 gènes d'intérêts (Connexines 37, 40 et 43) se fait à partir d'ADNc provenant de 10 ng d'ARN totaux. A ceux-ci sont ajoutés des dNTPs (0,25 mM chacun ; Clontech), du SybR green (1/20000ème ; Molecular Probes, Interchim), les amorces appropriées (Tableau 8), et la Titanium Taq polymerase 1/50ème (Clontech).

L'amplification est ensuite réalisée grâce à l'appareil Rotor Gene 2000 (Corbett Research) dans les conditions suivantes : 15 secondes de dénaturation à 95°C, 15 secondes d'hybridation à une température variable selon le gène amplifié (Tableau 8), 15 secondes d'élongation à 72°C et 15 secondes d'acquisition de la fluorescence du SybR green à une température au moins inférieure de 3,5°C à la température de fusion du produit d'amplification. Ces 4 étapes sont répétées pendant 40 cycles.

A la fin de la PCR, la taille des produits d'amplification est vérifiée sur un gel à 2% d'agarose contenant du bromure d'éthidium, et en comparant leur taille à un marqueur de taille (50 bp, Sigma).

Gène	Séquence (S : sens; AS : antisens)	Taille du produit d'amplification (pb)	Température de fusion du produit d'amplification (°C)	Température d'hybridation utilisée (°C)	Concentration d'amorce utilisée (nM)	N° d'accession
GAPDH	S : ATTCTACCCACGGCAAGTT	153	89.4	70	200	NM_017008
	AS : CGCCAGTAGACTCCACGACATA					
HPRT	S : TGTTGGATATGCCCTTGACTA	178	85.6	70	100	NM_012583
	AS : AGATGGCCACAGGACTAGAAC					
PLRPO	S : AGGTGGGAGCCAGCGAAGC	208	91.7	70	100	NM_022402
	AS : GCAACAGTCGGGTAGCCAATC					
YWHAZ	S : AGCCGAGCTGTCTAACGAG	291	88.4	70	100	NM_013011
	AS : GCCAAGTAGCGGTAGTAGTCA					
Cx 37	S : GGTGGCAGAGGACGGTCGTCT	133	85.3	68	200	NM_021654
	AS : CCATGGTCCAGCCGTAGAGA					
Cx 40	S : GGAAAGAGGTGAACGGGAAG	197	91.3	68	200	NM_01280
	AS : GGGCCTCGAGACATAACAGTT					
Cx 43	S : TCTGCCTTTCGCTGTAACACT	117	87.5	70	200	NM_012567
	AS : GGGCACAGACACGAATATGAT					

Tableau 8 : récapitulatif des amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Cette technique permet de suivre la quantité d'ADNc notamment grâce au SybR green. En exprimant la variation de la fluorescence en fonction du temps, on peut déterminer un paramètre important dans la quantification : le Ct (cycle threshold). Ce paramètre est défini comme étant le cycle d'amplification auquel la fluorescence atteint une valeur significativement différente de la fluorescence de base. Cette valeur est donc déterminée à un moment où

l'amplification est dans une phase linéaire avec une efficacité maximale, d'une valeur de 2, ce qui veut dire qu'un brin d'ADNc est amplifié (doublé) entièrement à chaque cycle.

Au préalable, l'efficacité d'amplification a été vérifiée en déterminant les Ct pour différentes concentrations en ADNc. On considère alors que l'efficacité maximale (E) est de 2 lorsqu'en doublant la concentration en ADNc, le Ct diminue d'un cycle.

4. ANALYSE DES RESULTATS

Les résultats ont été analysés selon la méthode Genorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Cette méthode permet, dans un premier temps, de définir deux gènes domestiques les plus stables entre les différentes conditions d'étude (HC comparés aux contrôles, et MCT comparés aux contrôles). Les gènes domestiques les plus stables permettront alors le calcul d'un facteur de normalisation pour chaque échantillon, reflétant la quantité relative d'ADNc de l'échantillon. Enfin, la quantité relative d'ADNc de chaque gène d'intérêt est rapportée au facteur de normalisation propre à chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm.

1. EXTRACTION DES PROTEINES

Les artères intrapulmonaires de 3^{ème} et 4^{ème} ordre provenant de 4 rats sont regroupées, broyées mécaniquement à 4°C à l'aide d'un piston, dans un tampon de lyse contenant 1 % d'IGEPAL® ; 0,5% de déoxycholate de sodium et 0,1 % de SDS, le tout dilué dans du PBS. À ce tampon de lyse sont ajoutés trois inhibiteurs de protéases (4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) 0,25 mg/ml, aprotinine 10 µg/ml, leupeptine 16 µg/ml). L'homogénat subit une étape de sonication, avant d'être centrifugé à 15000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les protéines récupérées dans le surnageant sont ensuite dosées par la méthode de Lowry en comparaison avec une gamme étalon. Les protéines sont ensuite diluées au 1/2 dans du tampon de Laemmli contenant, entre autres, du glycerol et du β-mercaptoethanol, puis dénaturées à 90°C pendant 6 minutes.

2. WESTERN BLOT

Ensuite, 10 µg de protéines sont déposés sur un gel à 10 % d'acrylamide, la migration des protéines est alors réalisée par une électrophorèse conduite à 50 mA pendant 1h30. Une fois la migration achevée, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (immobilon™ -P) pendant 2h30 à 100 V. La membrane est ensuite saturée pendant 1 heure à température ambiante dans du PBS 1X, tween 0,1 %, contenant 5 % de BSA. Les membranes sont alors mises en présence de l'anticorps primaire dirigé contre une des trois connexines étudiées (Tableau 9) pendant toute la nuit à 4°C. Après 3 lavages dans du PBS 1X, tween 0,1 %, les membranes sont incubées dans l'anticorps secondaire approprié couplé à l'enzyme HRP (horse radish peroxydase, Tableau 9) pendant 2 heures. Enfin, les membranes sont révélées à l'aide du kit Uptilight (Interchim) contenant un substrat chimioluminescent de la peroxydase. L'acquisition de la chimioluminescence se fait à l'aide du Kodak ImageStation 4000MM.

En parallèle, la quantité de protéine déposée est contrôlée par la mesure de la quantité de β-actine présente sur la membrane, car il s'agit d'une protéine dont la quantité ne varie pas lors de l'HTAP. Cependant, la taille de la β-actine étant proche de celle des connexines (environ 42 kDa), la membrane est incubée dans du Stripping buffer (« Restore™ Western Blot Stripping Buffer », Pierce) pendant 15 minutes après la révélation des connexines, ce qui permet d'éliminer le marquage des connexines, puis les membranes sont incubées dans l'anticorps primaire dirigé contre la β-actine pendant 2 heures et le même protocole de révélation que pour les connexines est ensuite utilisé.

La densité des bandes est mesurée grâce à un logiciel permettant d'éviter toute saturation du signal : GeneSnap et GeneTool (SynGene). Les résultats sont ensuite exprimés en rapportant la densité des bandes des connexines à la densité des bandes de β -actine.

Anticorps primaire	Concentration finale	Hôte	Anticorps secondaire	Dilution
Anti Cx 37 (Zymed)	1 $\mu\text{g/ml}$	Lapin	Anti IgG de lapin couplé HRP (Santa cruz)	1/8000
Anti Cx 40 (Zymed)	1 $\mu\text{g/ml}$			
Anti Cx 43 (Zymed)	1 $\mu\text{g/ml}$	Souris	Anti IgG de souris couplé HRP (Santa cruz)	1/8000
Anti β -actine (Sigma)	0,2 $\mu\text{g/ml}$			

Tableau 9 : récapitulatif des anticorps utilisés pour le western blot.

Immunofluorescence

Une fois disséquées, les AIP3 sont fixées pendant 10 minutes dans du Formalin 10 % (Sigma Aldrich), puis rincées au PBS. Ensuite, chaque AIP3 est incluse dans de l'OCT compound (Fischer Scientific) et congelée à -20°C . Des coupes transversales d'AIP3 sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryostat, et les coupes sont fixées par la chaleur sur des lames recouvertes de (3-Aminopropyl)triéthoxysilane (APES, Sigma-Aldrich).

Les coupes sont ensuite entourées d'un trait au crayon hydrophobe (DakoPen, Dako), puis une goutte de solution de PBS contenant 0,1% de Triton X100 et 1% de BSA est ajoutée sur la coupe. Suite à cette étape de saturation / perméabilisation d'1 heure à température ambiante, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre une des trois connexines (concentration finale : $2,5 \mu\text{g/ml}$) pendant toute la nuit à 4°C . Les anticorps primaires utilisés sont les mêmes que ceux utilisés en western blot (tableau 9). Le lendemain, après 3 lavages au PBS contenant 0,1% de Triton X100, les coupes sont mises en présence de l'anticorps secondaire correspondant : anticorps anti-IgG de lapin pour les connexines 37 et 40, et anticorps anti-IgG de souris pour la connexine 43 (dilution 1/200). L'incubation dure 2 heures et est réalisée à température ambiante. Ces anticorps secondaires sont couplés au fluorophore AlexaFluor 546[®] (Molecular Probes). Les noyaux sont ensuite marqués au Hoechst ($45 \mu\text{M}$, Molecular Probes) pendant 20 minutes à température ambiante. Enfin, les coupes sont montées avec du milieu de montage (Dako).

Les coupes sont ensuite visualisées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000, Nikon) muni d'un objectif x 60, NA 1,40, Apochromat à immersion à huile. Les noyaux marqués au Hoechst sont excités à 405 nm à l'aide d'un laser à diode, le fluorophore AlexaFluor 546[®] est excité à 543 nm à l'aide d'un laser hélium-néon. La fluorescence émise par les noyaux est ensuite récupérée par un premier photomultiplicateur filtrant les longueurs d'onde de $450 \pm 35 \text{ nm}$, et la fluorescence de l'AlexaFluor 546[®] est, quant à elle, récupérée par un second photomultiplicateur filtrant les longueurs d'onde de $605 \pm 75 \text{ nm}$. D'autre part, l'élastine présente dans la paroi des artères, et plus précisément dans la lamina élastique interne qui délimite l'endothélium du muscle lisse, a la particularité d'être autofluorescente. Cette élastine est donc excitée à 488 nm à l'aide d'un laser argon, et la fluorescence émise est récupérée par un troisième photomultiplicateur filtrant les longueurs d'onde de $515 \pm 30 \text{ nm}$.

Communication myoendothéliale

La fonctionnalité des jonctions communicantes peut être étudiée dans tous tissus ou tapis de cellules confluentes par la simple observation de la diffusion de sondes fluorescentes à travers ces jonctions communicantes. Pour cela, les sondes les plus utilisées sont la carboxyfluorescéine et la calcéine, deux sondes fluorescentes aux propriétés spectrales très proches et aux poids moléculaires inférieurs à 1 kDa (respectivement 532 et 995 Da). Ces fluorophores sont donc capables de diffuser à travers les jonctions communicantes. Cette diffusion peut être observée dans le temps sur du matériel vivant, comme c'est le cas dans la technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), mais elle peut également être observée après fixation du tissu comme dans notre étude.

Les AIP3 sont montées dans l'artériographe comme décrit précédemment, et la sonde fluorescente carboxyfluorescéine sous forme AM (10 μ M) est introduite à l'intérieur du vaisseau (solution à l'intérieur des pipettes de verre). Cette étape dure 30 minutes et permet de charger les cellules endothéliales en sonde. Une fois la sonde dans le cytoplasme des cellules, le groupement AM est clivé et la sonde est piégée à l'intérieur de la cellule de la même façon que décrit précédemment pour le Fura-PE3-AM. La face luminale du vaisseau est ensuite lavée pour éliminer toute sonde résiduelle, puis le vaisseau est pressurisé à 10 mm Hg pendant 30 minutes, permettant ainsi à la sonde de diffuser dans le muscle lisse adjacent via les jonctions myoendothéliales. Dans une autre série d'expériences, le vaisseau pressurisé a été incubé avec 300 μ M de ³⁷⁻⁴³Gap 27 pendant 1 heure (30 minutes avant la charge et pendant les 30 minutes de charge des cellules endothéliales avec la sonde).

Le vaisseau est ensuite démonté, fixé 20 minutes dans du Formalin à température ambiante, inclus dans l'OCT-compound et coupé de façon transversale à l'aide d'un cryostat.

Les coupes sont ensuite observées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000, Nikon) muni d'un objectif x 60, NA 1,40, Aplanachromat à immersion à huile. La carboxyfluorescéine est excitée à 488 nm à l'aide d'un laser argon, et la fluorescence émise est récupérée par le photomultiplicateur filtrant les longueurs d'onde de 515 \pm 30 nm.

L'étendue de la diffusion de la carboxyfluorescéine est par la suite évaluée de façon qualitative.

Résonance paramagnétique des électrons (RPE)

1. PRINCIPE

La RPE est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique permettant d'obtenir des informations concernant la nature des espèces magnétiques d'un échantillon, ainsi que des informations sur leurs concentrations. Son principe est analogue à celui de la résonance magnétique nucléaire (RMN), à la différence près qu'en RPE, ce sont les électrons qui sont excités plutôt que les noyaux atomiques.

Grâce à sa spécificité et sa grande sensibilité, elle permet une détection directe des espèces magnétiques (radicaux libres, sels et complexes de métaux de transition etc.) caractérisées par la présence d'un électron non apparié sur la couche de valence.

1.1. Rappels de physique quantique

Chaque électron d'un atome est en rotation selon deux axes :

- rotation de l'électron autour du noyau atomique
- rotation de l'électron sur lui-même : le spin.

La rotation des électrons sur eux-mêmes (spin) crée un champ magnétique, les électrons sont donc des petits aimants. Dans une molécule, les électrons s'apparient et les champs magnétiques qui leur sont associés s'annulent, cependant, si le nombre d'électrons est impair - c'est le cas des radicaux libres - il existe un électron non apparié. Les radicaux libres sont donc des petits aimants.

1.2. Effet Zeeman

Le principe de la RPE repose sur l'effet Zeeman. Soumis à l'action d'un champ magnétique extérieur intense B_0 , les niveaux d'énergie d'un spin S se séparent en plusieurs états ; c'est la séparation énergétique ou effet Zeeman (Figure 34).

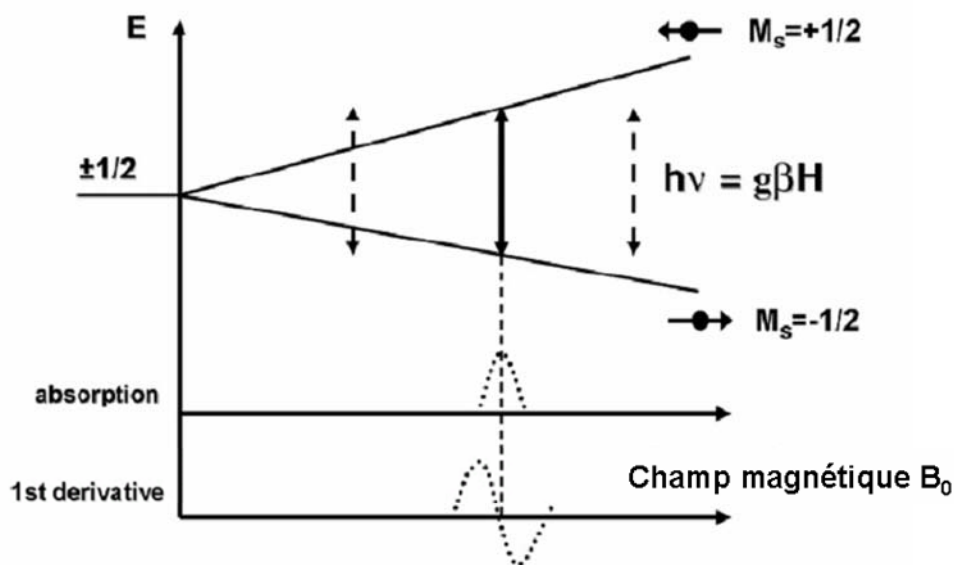


Figure 34 : principe général de la RPE.

Le schéma représente la séparation des niveaux d'énergie en présence d'un champ magnétique externe B_0 (pour le cas d'un spin $S = 1/2$). C'est l'effet Zeeman. (Kleschyov et al., 2007)

Ainsi, pour le cas d'un ion magnétique ne présentant qu'un seul électron célibataire (donc pour lequel le spin S équivaut à $1/2$) la présence du champ magnétique extérieur (B_0) donne lieu à 2 états correspondant à $m_s = -1/2$ et $m_s = +1/2$. Les électrons vont donc s'aligner sur le champ magnétique B_0 de manière parallèle ($m_s = +1/2$) et anti parallèle ($m_s = -1/2$) et vont effectuer des rotations autour de ce dernier, on parle de mouvement de précession.

Les électrons alignés de manière parallèle auront une énergie $E_+ = +1/2 g \mu B_0$ alors que les électrons alignés de manière anti-parallèle auront une énergie $E_- = -1/2 g \mu B_0$, où

- g est le facteur g (constante sans dimension)
- μ est le magnéton de Bohr (constante)
- B_0 est la valeur du champ magnétique (que l'on fera varier lors de l'expérience)

La différence $E_+ - E_- = g \mu B_0$ correspond à la séparation énergétique de Zeeman.

1.3. Condition de résonance

La transition entre ces deux états d'énergie peut avoir lieu sous l'action d'un second champ magnétique perpendiculaire à B_0 et d'amplitude beaucoup plus faible (micro-ondes), ayant une fréquence ν . Cette transition n'aura lieu que si l'énergie de ce second champ

magnétique ($= h \nu$ où h est la constante de Planck) est équivalente à la séparation énergétique de Zeeman ($g \mu B_0$).

Lorsque $g \mu B_0 = h \nu$, les électrons entrent en résonance. Ceux-ci vont en fait absorber des photons du champ magnétique perpendiculaire (micro-ondes d'énergie $h \nu$) afin d'effectuer la transition entre les états parallèles et anti-parallèles. Le spectromètre mesurera alors le second champ magnétique perpendiculaire après absorption des photons par l'échantillon (Weil *et al.*, 2007).

2. UTILISATION DE PIEGEUR DE SPIN (SPIN TRAP)

La plupart des espèces radicalaires ont une demi-vie trop courte pour pouvoir être détectées directement et nécessitent une stabilisation préalable à leur étude en RPE, c'est le cas pour le NO et l' O_2^{\bullet} . La technique dénommée spin trapping permet de stabiliser le radical libre à l'aide d'un piègeur moléculaire, appelé spin trap. La réaction de piégeage produit un nouveau composé paramagnétique, appelé adduit, résultant de la liaison covalente du spin trap avec le radical libre concerné, plus stable et d'une durée de vie considérablement augmentée. Cet adduit, lui aussi radicalaire, est détectable en spectroscopie RPE.

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

- il doit réagir rapidement avec l'espèce étudiée ;
- il doit être en quantité suffisante près du site de production de l'espèce étudiée ;
- il doit former un adduit stable ;
- le spin trap, ainsi que l'adduit ne doit pas interférer avec la production et la dégradation de l'espèce étudiée.

Concernant la mesure du NO, le colloïde $Fe(DETC)_2$ composé de fer Fe^{2+} et de Diéthylthiocarbamate (DETC) répond à tous ces critères. Il a en effet la particularité d'être liposoluble, le $Fe(DETC)_2$ permet donc de mesurer à la fois le NO extra et intracellulaire (Kleschyov *et al.*, 2007).

Concernant la mesure de l'anion superoxyde, le spin trap de la famille des nitrons 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde (DMPO) est l'un des plus fréquemment utilisés. Toutefois son adduit (DMPO-OOH) est de durée de vie limitée à pH physiologique (~ 1 min à pH 7,4) et se décompose spontanément en l'adduit du radical hydroxyle (DMPO-OH) dont les caractéristiques spectrales sont sensiblement différentes. De plus, les adduits DMPO-OOH et DMPO-OH sont rapidement transformés en espèces silencieuses suite à leur réaction avec

divers réducteurs présents dans les tissus (ascorbate, glutathion etc.). Ces inconvénients ont mené au développement de sondes ou « spin probes » (Munzel *et al.*, 2002).

3. UTILISATION DE SONDE (« SPIN PROBE »)

Récemment, des sondes de la famille des hydroxylamines ont été développées, dont le 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl -2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine ou CMH (Figure 35). Les hydroxylamines présentent l'avantage de réagir beaucoup plus rapidement avec l'anion superoxyde que les spin trap de la famille des nitrons (Dikalov *et al.*, 2007b). De plus, cette sonde a la propriété d'être liposoluble, elle permet donc de mesurer l'anion superoxyde extra et intracellulaire. Le radical nitroxyde produit (CM) est par ailleurs très stable et présente l'avantage de produire un signal en spectroscopie RPE (Figure 35).

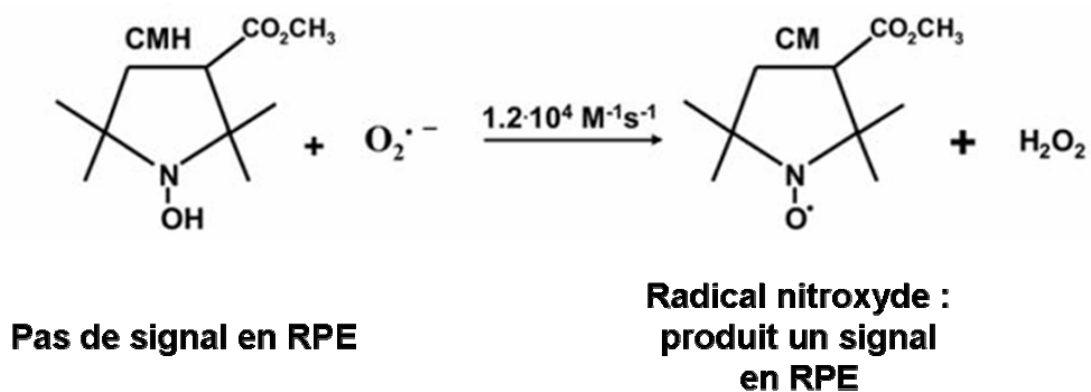


Figure 35 : réaction spontanée entre la sonde CMH et l'anion superoxyde aboutissant à la production de radical nitroxyde (CM)

(Dikalov *et al.*, 2007b).

4. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

4.1. Appareil

L'appareil utilisé est un spectromètre à bande X Miniscope MS200 (Magnettech, Berlin) (Figure 36).



Figure 36 : Miniscope MS200 (Magnettech)

L'appareil possède un aimant permettant de créer des champs magnétiques B_0 d'intensités comprises entre 50 et 450 mT. D'autre part, l'appareil est dit à bande X, ce qui correspond à la bande de fréquence à laquelle est soumis l'échantillon dans le but de faire entrer les électrons en résonance (il s'agit du second champ magnétique perpendiculaire à B_0). L'appareil produit donc des ondes perpendiculaires à B_0 dont la fréquence est de 9 GHz, ce qui correspond à des micro-ondes.

L'échantillon est refroidi à 77°K et est placé dans un dewar, lui-même introduit dans un résonateur. Enfin, les micro-ondes après absorption des photons par l'échantillon sont détectées par un électroaimant, et l'acquisition du spectre d'absorption se fait grâce au logiciel Miniscopecontroler2.0 (Magnettech) (Figure 37).

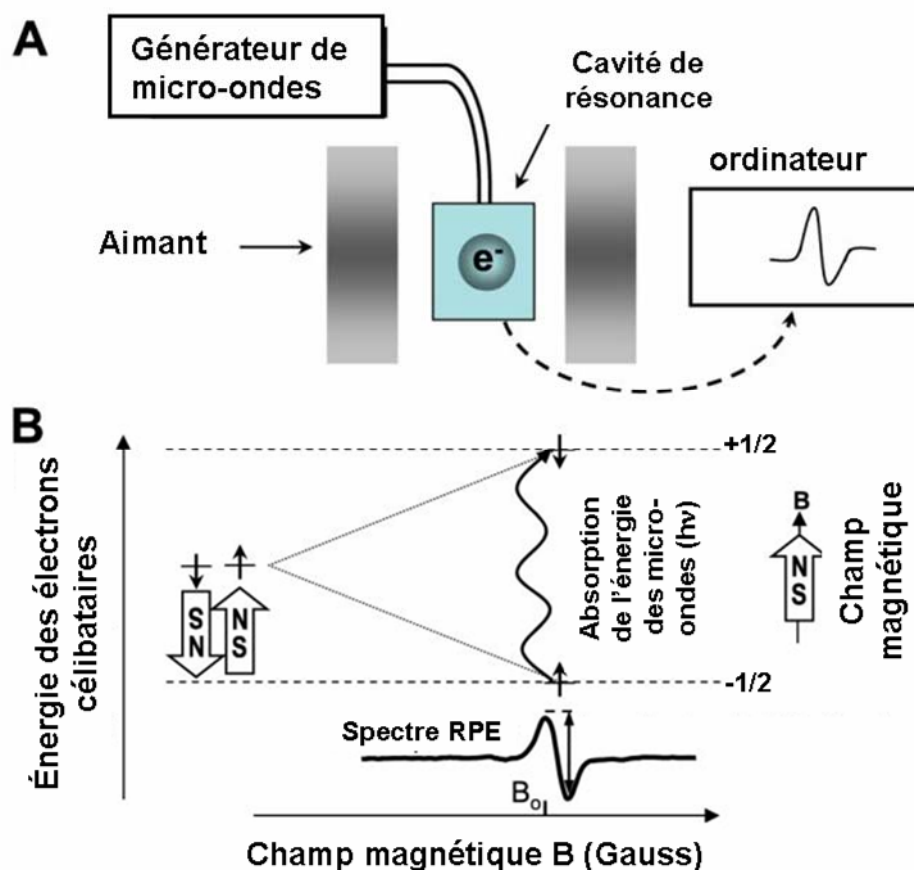


Figure 37 : principe de la spectrométrie par RPE.

(A) L'échantillon est placé dans la cavité du résonateur. Il est soumis à un champ magnétique variable B_0 et à des micro-ondes perpendiculaires à B_0 , de fréquence fixe (9 GHz). (B) Lorsque B_0 atteint la valeur à laquelle $h \nu = g \mu B_0$, les électrons de l'échantillon vont entrer en résonance et absorber des photons du champ micro-onde (Dikalov et al., 2007a).

4.2. Spectres d'absorption

Chaque spectre d'absorption ainsi enregistré est caractéristique de l'élément magnétique en présence. Le paramètre principal permettant d'identifier cet élément est la valeur du champ B_0 à laquelle l'échantillon entre en résonance, qui informe sur le facteur g , caractéristique de l'ion magnétique en question.

Ainsi, pour l'anion superoxyde, le radical nitroxyde (CM) entre en résonance lorsque B_0 a une intensité aux alentours de 335 mT (Figure 38).

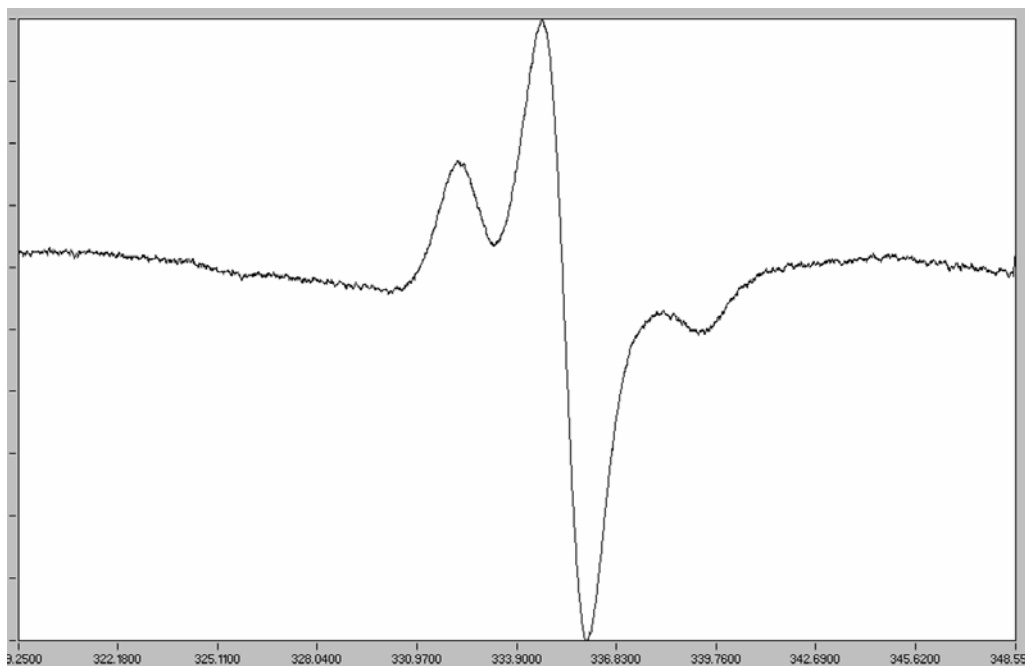


Figure 38 : spectre d'absorption du radical nitroxyde obtenu sur un échantillon d'artère pulmonaire de rat.

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

Quant au NO, le complexe NO-Fe(DETC)_2 entre en résonance lorsque B_0 a une intensité d'environ 330 mT (Figure 39).

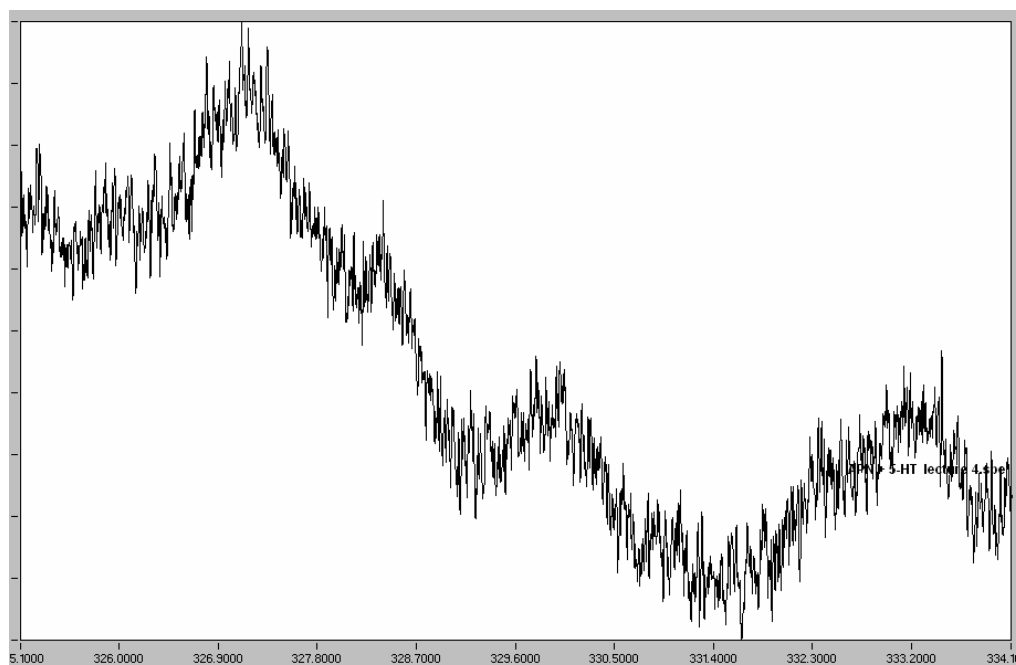


Figure 39 : spectre d'absorption du complexe NO-Fe(DETC)_2 obtenu sur un échantillon d'artère pulmonaire de rat.

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

5. PROTOCOLE

5.1. Mesure de l'anion superoxyde

L'oxydation du CMH par l'anion superoxyde étant le marqueur de la quantité d'anion superoxyde en présence, le CMH ne doit pas être oxydé par d'autres voies. Les expériences se déroulent donc en présence de deux antioxydants : la deferoxamine et le DETC. La deferoxamine étant un chélateur de fer, elle va empêcher l'auto oxydation du CMH catalysée par les traces de métaux de transition présents dans la préparation. Quant au DETC, il s'agit d'un chélateur de cuivre, il va donc également empêcher l'auto oxydation du CMH mais va aussi inhiber la dégradation de l'O₂[•] par la Cu/Zn-SOD présente dans les tissus. Les 3 substances composant le mélange doivent être préparées dans la glace et les poudres doivent impérativement être dissoutes dans du KHB bullé à l'azote, gaz inerte qui va éliminer toute trace d'oxygène dans le KHB. Ces précautions doivent être prises pour éviter toute auto oxydation du CMH.

Les AIP1, 2 et 3 sont incubées dans le mélange contenant le CMH (500 µM, Noxygen), la deferoxamine (25 µM, Sigma) et le DETC (5 µM, Sigma) pendant 45 minutes à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Les AIP sont stimulées ou non avec 0,1 mM de 5-HT pendant l'incubation dans le mélange contenant le CMH. Dans certaines expériences, la PEG-SOD est ajoutée à raison de 300 UI/ml pendant 1h avant l'incubation avec la sonde. A la fin de l'expérience, les AIP et le milieu d'incubation sont congelés à l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à la lecture au spectromètre.

5.2. Mesure du NO

Le fer et le DETC composant le piègeur de spin sont pesés et dissous séparément dans du KHB filtré et bullé à l'azote placé dans la glace. Les deux composants sont mélangés précautionneusement et de façon extemporanée afin de former le colloïde Fe(DETC)₂. Les AIP1, 2 et 3 sont placées dans 0,5 ml de KHB (auparavant filtré et bullé à l'azote), puis, 0,5 ml de piègeur de spin y sont ajoutés pendant 45 minutes à 37 °C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

Pendant les 45 minutes d'incubation avec le piègeur de spin, les AIP sont stimulées ou non avec 0,1 mM de 5-HT. Dans certaines expériences, le L-NAME (0,1 mM) est ajouté 30 minutes avant puis pendant l'incubation avec le piègeur de spin. A la fin de l'expérience, les AIP sont congelées à l'azote liquide puis stockées à -80°C jusqu'à la lecture au spectromètre.

6. ANALYSE DES RESULTATS

La quantité d'anion superoxyde et de NO présents dans l'échantillon est proportionnelle à l'intensité d'absorption des photons. On mesure donc l'amplitude des 3 pics correspondant au radical nitroxyde (Figure 40) et on mesure l'amplitude du pic correspondant au complexe NO-Fe(DETC)₂ (Figure 41) grâce au logiciel analysis 2.0 (Magnettech).

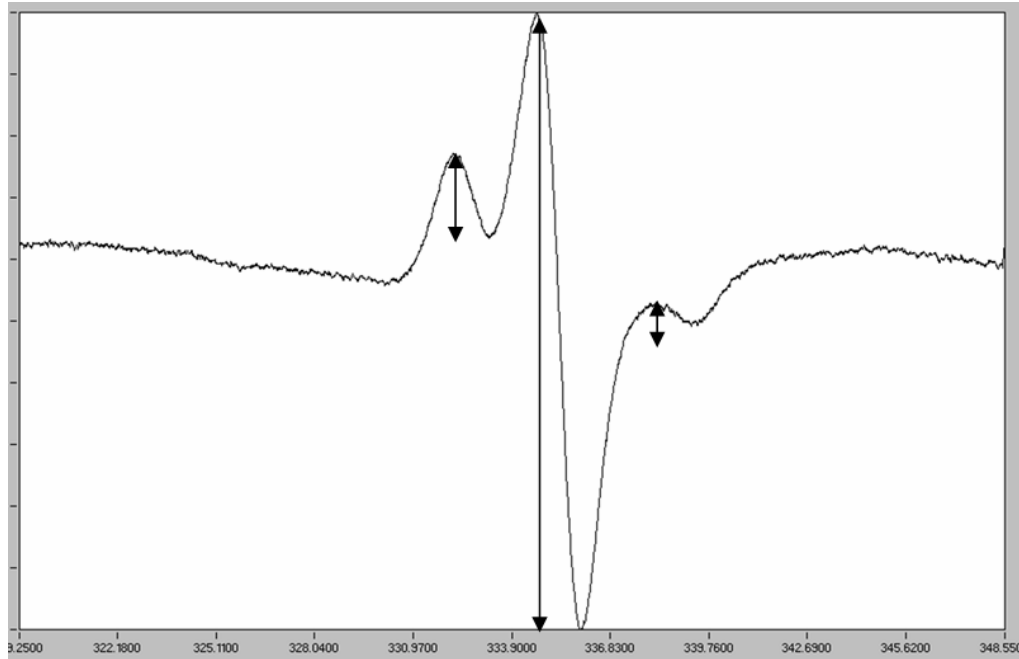


Figure 40 : mesure de l'amplitude (unité arbitraire) des 3 pics correspondant au spectre du radical nitroxyde.

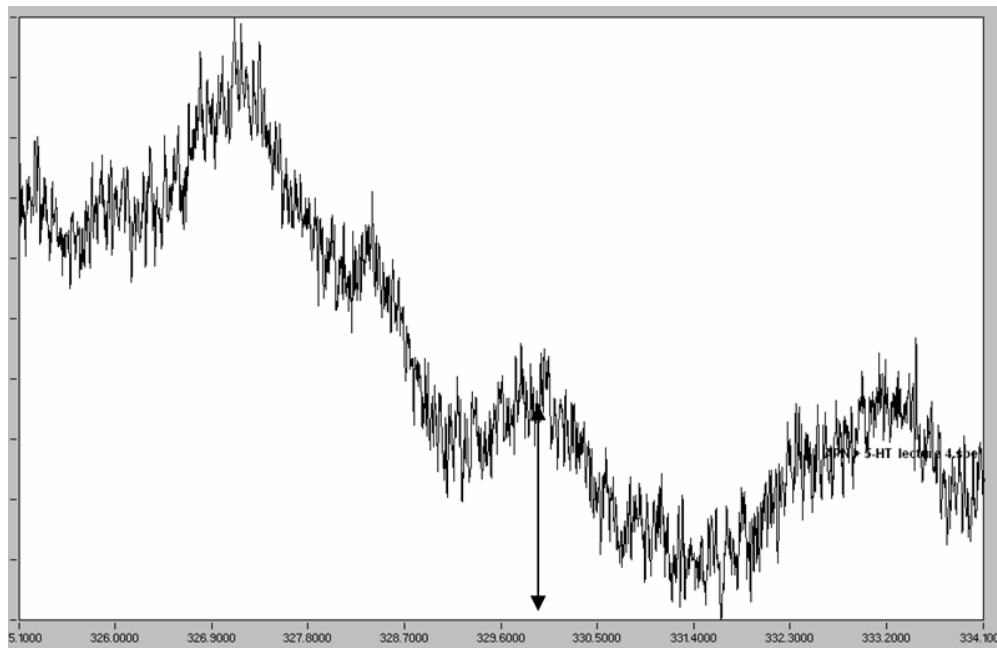


Figure 41 : mesure de l'amplitude (unité arbitraire) du pic correspondant au NO-Fe(DETC)₂.

Après avoir soumis l'échantillon à la spectrométrie par RPE, l'échantillon est décongelé et les protéines sont extraites puis dosées (cf partie « Western Blot ».). L'amplitude du signal est alors normalisée par rapport à la quantité de protéine de l'échantillon et les résultats sont exprimés en $A/(\text{mg/ml de protéine})$ où A correspond à l'amplitude du signal en unité arbitraire.

Mesure du GMPc

Les AIP1, 2 et 3 sont disséquées et mises en présence des différentes substances (³⁷⁻⁴³Gap 27 ou PEG-SOD + PEG-catalase) pendant 1 heure à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Les tissus sont ensuite stimulés avec 0,1 mM de sérotonine puis congelés à l'azote liquide. Toutes ces étapes se déroulent en présence d'un inhibiteur des phosphodiesterases empêchant ainsi toute dégradation du GMPc produit (3-Isobutyl-1-méthylxanthine, IBMX 0,1 mM).

Le GMPc est ensuite extrait des tissus en broyant ceux-ci à l'aide d'un potter dans 0,5 ml d'une solution contenant 5 % d'acide trichloroacétique. L'homogénat est ensuite centrifugé à 1500 g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré, et le culot est repris dans 240 µl d'un mélange contenant 1 volume de NaOH 1 M pour 5 volumes de PBS 1X. La concentration protéique de cet homogénat est dosée selon la méthode de Lowry en comparaison à une gamme étalon. L'acide trichloroacétique que contient le surnageant est extrait à l'aide d'éther saturé en eau. Enfin, l'éther est évaporé en plaçant les échantillons dans un bain-marie chauffé à 60 °C jusqu'à évaporation totale de l'éther.

Le GMPc de ces différents extraits est ensuite dosé grâce à un kit ELISA (Cayman chemical company). Ce kit est basé sur la compétition entre le GMPc libre présent dans l'échantillon et un GMPc appelé traceur, couplé à une acétylcholinestérase (AChE). Les puits d'une plaque de 96 puits sont recouverts d'anticorps anti-IgG de lapin que l'on recouvre d'anticorps anti-GMPc produits chez le lapin. Ensuite, l'échantillon (50 µl) est ajouté ainsi que le traceur (50 µl), il y a alors compétition entre le GMPc de l'échantillon et le GMPc du traceur sur les anticorps anti-GMPc. Après 18 h d'incubation, la quantité de traceur est révélée grâce au réactif d'Ellman, composé d'acétylthiocholine couplé à un chromogène. L'AChE du traceur va alors libérer la thiocholine qui va agir avec le chromogène et aboutir à la formation d'un chromophore : l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque. Ce dernier est détectable par spectrophotométrie à 412 nm. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de traceur présent dans le puits, et donc inversement proportionnelle à la quantité de GMPc présent dans l'échantillon.

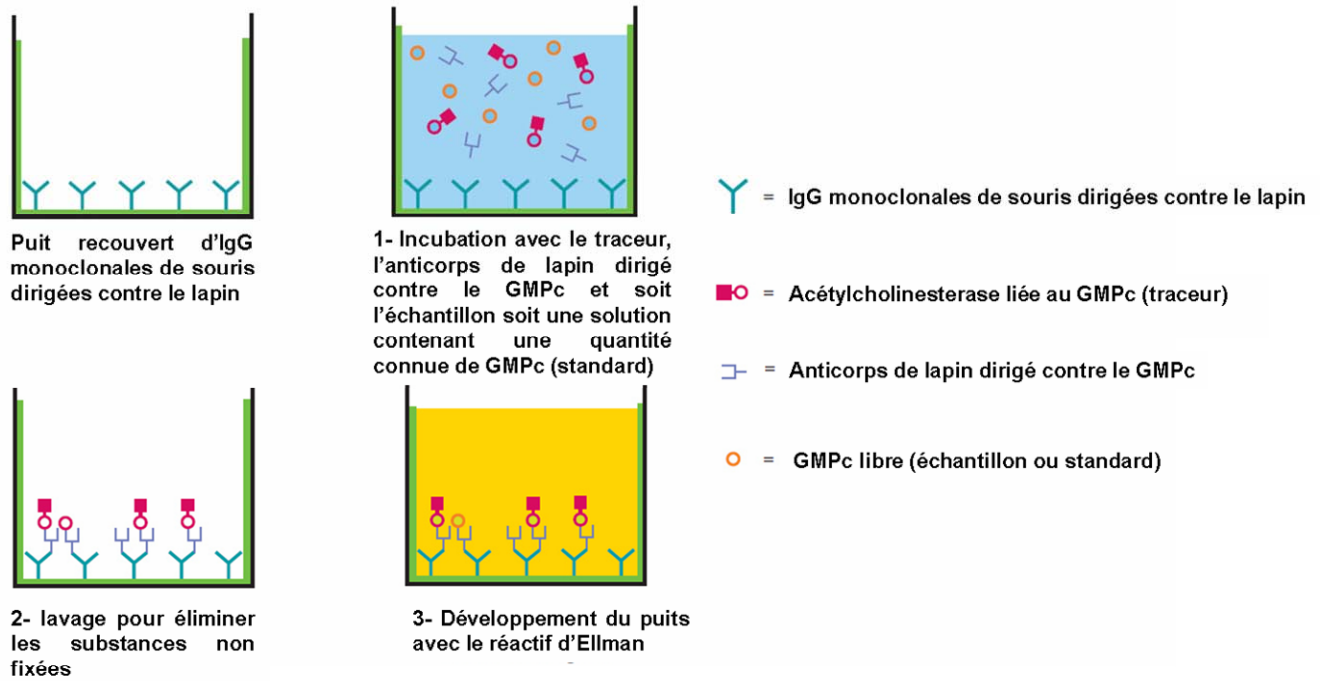


Figure 42 : principe du kit de dosage du GMPc (Cayman chemical)

En parallèle, une gamme étalon de GMPc est réalisée, on peut ainsi déterminer la quantité de GMPc présente dans l'échantillon en se reportant à cette gamme étalon.

Enfin, la quantité ainsi déterminée est rapportée à la quantité de protéine de l'échantillon déterminée auparavant, et les résultats sont exprimés en pmol/(mg/ml de protéine).

Analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne. n indique le nombre d'AIP3 pour l'étude des réponses calciques et contractiles, l'étude des jonctions myoendothéliales ainsi que pour l'immunofluorescence. Pour les expériences de contraction isométrique, n indique le nombre d'anneaux d'AIP1. Pour les expériences de RT-PCR, RPE et dosage du GMPc, n indique le nombre de rats. Enfin, n indique le nombre d'expériences menées sur 3 lots de protéines extraites des AIP3 de rat (4 rats par lot) pour le Western Blot.

Concernant la mesure simultanée des réponses calciques et contractiles sur les AIP3 et les mesures de contraction isométrique des AIP1, les CCRC à la 5-HT ont été lissées grâce au logiciel Origin 6.0, selon l'équation logistique :

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

Où E, E_{\max} et E_0 représentent respectivement l'amplitude de l'effet (contraction ou delta ratio 345 nm / 380 nm), l'effet maximal et minimal pour une concentration d'agoniste donnée, notée x. EC_{50} est la concentration d'agoniste qui produit la moitié de l'effet maximal et p est la pente de la sigmoïde.

Par la suite, dans la première partie (étude des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire saine), un test non paramétrique pour échantillons dépendants (Wilcoxon) a été réalisé sur les E_{\max} et EC_{50} des 1^{ère} et 2^{ème} CCRC. Dans la seconde partie (étude des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire pathologique), un test non paramétrique pour échantillons indépendants (Kruskall-Wallis) a été réalisé sur les E_{\max} et EC_{50} des CCRC effectuées sur les AIP1 issues de rats contrôles, HC et MCT. Ce même test a été appliqué sur les E_{\max} et EC_{50} des CCRC effectuées en absence ou en présence de ³⁷⁻⁴³Gap 27 ou de ⁴⁰Gap 27 pour chaque groupe de rat (contrôles, HC, MCT).

Les analyses statistiques de toutes les autres données ont été réalisées en utilisant un test non paramétrique pour échantillons indépendants (Mann-Withney en cas de comparaison de 2 groupes, Kruskall-Wallis en cas de comparaison de plus de 2 groupes). Les différences sont considérées comme significatives lorsque $P < 0,05$, quel que soit le test statistique utilisé.

RESULTATS

Etudes des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire saine

Les études portant sur l'expression des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire de rat sont peu nombreuses. Comme indiqué dans la synthèse bibliographique, ces études ont été menées essentiellement sur les artères extrapulmonaires et ont rapporté la présence de 3 isoformes de connexines Cx 37, Cx 40 et Cx 43. Les petites artères intrapulmonaires étant les premières touchées par l'HTAP, il nous a paru intéressant dans un premier temps d'étudier le profil d'expression des 3 isoformes Cx 37, 40 et 43 dans les petites artères intrapulmonaires de 3^{ème} ordre (AIP3, diamètre externe 300 µm).

La 5-HT a un rôle prépondérant dans la vasoconstriction artérielle pulmonaire et est au centre du concept « d'hypothèse de la 5-HT » dans l'HTAP. Or, les jonctions communicantes interviennent dans les processus de contraction, le second objectif de ce travail a donc été d'identifier les mécanismes impliquant les jonctions communicantes dans la contraction à la 5-HT au niveau de la circulation pulmonaire saine. La 5-HT a la particularité d'agir sur des récepteurs présents à la fois sur les cellules endothéliales mais également sur les cellules musculaires lisses au niveau vasculaire. Plus précisément, la 5-HT induit une vasoconstriction en agissant sur des récepteurs situés sur les CML, mais induit une vasodilatation dépendante du NO en agissant sur des récepteurs situés sur les CE (Murdoch *et al.*, 2003). L'effet résultant de la 5-HT étant une vasoconstriction, ceci laisse à penser qu'il existe une balance où l'effet de la 5-HT sur les CML prévaut sur l'effet de la 5-HT sur les CE. Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'implication des jonctions communicantes, et plus particulièrement des jonctions myoendothéliales dans cette balance.

1. ÉTUDE CHEZ LE RAT

Cette étude a donné lieu à une publication dans le journal PLoS ONE.

Vascular Smooth Muscle Modulates Endothelial Control of Vasoreactivity via Reactive Oxygen Species Production through Myoendothelial Communications

Marie Billaud^{1,2}, Roger Marthan^{1,2}, Jean-Pierre Savineau^{1,2}, Christelle Guibert^{1,2*}

1 INSERM, U885, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, Bordeaux, France, **2** Université de Bordeaux, Bordeaux, France

Abstract

Background: Endothelial control of vascular smooth muscle plays a major role in the resulting vasoreactivity implicated in physiological or pathological circulatory processes. However, a comprehensive understanding of endothelial (EC)/smooth muscle cells (SMC) crosstalk is far from complete. Here, we have examined the role of gap junctions and reactive oxygen species (ROS) in this crosstalk and we demonstrate an active contribution of SMC to endothelial control of vasomotor tone.

Methodology/Principal Findings: In small intrapulmonary arteries, quantitative RT-PCR, Western Blot analyses and immunofluorescent labeling evidenced connexin (Cx) 37, 40 and 43 in EC and/or SMC. Functional experiments showed that the Cx-mimetic peptide targeted against Cx 37 and Cx 43 (^{37,43}Gap27) (1) reduced contractile and calcium responses to serotonin (5-HT) simultaneously recorded in pulmonary arteries and (2) abolished the diffusion in SMC of carboxyfluorescein-AM loaded in EC. Similarly, contractile and calcium responses to 5-HT were decreased by superoxide dismutase and catalase which, catabolise superoxide anion and H₂O₂, respectively. Both Cx- and ROS-mediated effects on the responses to 5-HT were reversed by L-NAME, a NO synthase inhibitor or endothelium removal. Electronic paramagnetic resonance directly demonstrated that 5-HT-induced superoxide anion production originated from the SMC. Finally, whereas 5-HT increased NO production, it also decreased cyclic GMP content in isolated intact arteries.

Conclusions/Significance: These data demonstrate that agonist-induced ROS production in SMC targeting EC via myoendothelial gap junctions reduces endothelial NO-dependent control of pulmonary vasoreactivity. Such SMC modulation of endothelial control may represent a signaling pathway controlling vasoreactivity under not only physiological but also pathological conditions that often implicate excessive ROS production.

Citation: Billaud M, Marthan R, Savineau J-P, Guibert C (2009) Vascular Smooth Muscle Modulates Endothelial Control of Vasoreactivity via Reactive Oxygen Species Production through Myoendothelial Communications. PLoS ONE 4(7): e6432. doi:10.1371/journal.pone.0006432

Editor: Neeraj Vij, Johns Hopkins School of Medicine, United States of America

Received: March 24, 2009; **Accepted:** June 26, 2009; **Published:** July 30, 2009

Copyright: © 2009 Billaud et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR06 - Physio - 015 - 01) and the Fondation de France (2008002719). Marie Billaud received a grant from GRRC (Groupe de Reflexion sur la Recherche Cardiovasculaire) to improve her technical skills. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: christelle.guibert@u-bordeaux2.fr

Introduction

In vessels, smooth muscle cell (SMC) responses are controlled by endothelial cells (EC) via complex intercellular signaling processes. Regarding vascular tone, the best described interaction is the endothelial-dependent vascular relaxation through the release of nitric oxide (NO) and vasoactive prostanoids [1]. Another pathway is associated with the hyperpolarization of both the EC and SMC and mediated by an endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Whereas EDHF identity is still under debate and may differ among species and vascular segments, there is evidence that EDHF-mediated responses involve epoxyeicosatrienoic acids (EETs) [2], potassium ions and channels [3], reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂) [4] and myoendothelial junctions [5].

In the pulmonary circulation, endothelial control of smooth muscle tone is of critical importance to maintain low pressure and low resistance. In this connection, most of the medical treatments used in pulmonary hypertension (e.g., NO, prostacyclin...) mimic

and amplify the physiological control of EC on SMC. For instance, serotonin (5-HT), a potent vasoconstrictor whose concentration is increased in pulmonary arterial hypertension (PAH) [6,7], acts on both SMC and EC. On one hand, 5-HT can generate NO in pulmonary arterial EC [8]. On the other hand, 5-HT produces ROS in bovine and mice pulmonary arterial SMC and the production of superoxide anion (O₂^{•-}) facilitates 5-HT-induced pulmonary vasoconstriction [9,10]. O₂^{•-} can interact with NO to produce peroxynitrite which decreases endothelial NO synthase (eNOS) expression and/or loss of eNOS substrate L-arginine or cofactors tetrahydrobiopterin (BH₄) [11]. We thus hypothesized an EC/SMC crosstalk through NO and O₂^{•-}. Gap junctions mediate intercellular communication between EC and SMC (myoendothelial gap junctions) and allow direct exchange of ions and small molecules in various tissues including pulmonary arteries [5,12]. Whereas gap junctions are expressed in pulmonary artery [13,14], participate to vascular tone in general [12] and are stimulated by 5-HT in coronary and mesentery SMC [15], no study has been performed on the role of gap junctions in the

pulmonary arterial vasoreactivity to 5-HT. Such communication may well participate to the EC/SMC crosstalk. Interestingly, resistance vessels are very important for blood flow regulation and the incidence of myoendothelial gap junctions is higher in resistance than in conduit arteries [16].

In the present study, we have therefore addressed, in small intrapulmonary arteries (IPA), the issue of expression, localization and function of the connexins (Cx) 37, 40 and 43 which are the Cx usually expressed in small vessels. Peptides homologous to the gap 26 and 27 domains of the extracellular loops of Cx 43 (⁴³Gap 26) or Cx 37 and 43 (^{37,43}Gap 27) respectively, interrupt intercellular communications in a Cx-specific manner and attenuate the calcium and contractile responses to 5-HT. Such effect was reversed by (1) the removal of the endothelium-dependent NO function or (2) the decrease of ROS production. Electronic paramagnetic studies demonstrated that ROS and more specifically O₂[•] was produced by the smooth muscle in response to 5-HT. In the same way, the NO and cyclic GMP content were assessed in response to 5-HT.

Altogether, the findings suggest that 5-HT produces O₂[•] in the smooth muscle and NO in the endothelium. O₂[•] passes through the myoendothelial junctions to decrease endothelial NO production and thus strengthen pulmonary vasoreactivity. This is the first time that a negative control of the endothelial NO function by the smooth muscle is demonstrated. Since ROS production is increased in many cardiovascular diseases, such process could be of great importance under pathological conditions.

Materials and Methods

Ethics Statement

All animal work has been conducted according to relevant international and national guidelines in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research". All the protocols used were approved by our local ethics committee named Comité d'éthique régional d'Aquitaine. The protocol number is AP 2/11/2005.

Tissue Preparation

Male Wistar rats (10–15 weeks old, weighing 300–400 g) were sacrificed using CO₂ asphyxia according to the animal care and use local committee (Comité d'éthique régional d'Aquitaine – AP 2/11/2005). The left lung was rapidly removed and rinsed in Krebs–HEPES–bicarbonate containing (in mM): 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 4 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) and 6 D-glucose, pH 7.4 with NaOH. Intrapulmonary arteries with an external diameter of 300–350 μm (IPA) were then dissected free from surrounding connective tissues under binocular control.

Intracellular Calcium and External Diameter Recording

IPA were cannulated as previously described [17] in an arteriograph (DMT, Denmark). Residual blood was removed by perfusing the vessels with Krebs–HEPES solution, and then vessels were maintained in a no-flow state and held at a constant transmural pressure of 10 mmHg and at a constant temperature of 37°C. Vessels were incubated 1 h in 2 μM Fura-PE3-AM at 37°C and rinsed for 10 min with Krebs–HEPES solution. The arteriograph was then placed on the stage of an inverted epifluorescence microscope (Olympus IX70) equipped with a x10, UPlanApo/0.40 W water-immersion objective (Olympus). The source of excitation light was a xenon arc lamp (175 W), and excitation wavelengths were selected by a wheelfilter (Sutter

Instrument Co.) composed of 345 nm and 380 nm filters. Digital images were sampled at 12-bit resolution by a fast-scan, cooled charge-coupled device camera (CoolSNAP fx Monochrome, Photometrics). Preparation was then alternately excited at 345 and 380 nm and emission fluorescence at 510 nm of both excitation wavelengths was imaged every 20 seconds. As previously described, regions of interest were drawn on the vascular wall to determine calcium signal from smooth muscle cells and background was subtracted using MetaFluor (Universal Imaging Software) [17]. External diameter of the vessels was measured on these images using MetaMorph (Universal Imaging Software). Contraction was expressed as a percentage related to the percentage of decrease of the initial external diameter.

Either 10 μM or cumulative concentrations of 5-HT (Sigma) were added to the bath, which was bubbled with air. After recording of this first contraction, vessels were washed and pharmacological substances were added both to the bath and to the perfusion solution inside the vessel for one hour. We inhibited gap junction communications through Cx 37 and Cx 43, Cx 40, or Cx 43 with synthetic connexin-mimetic peptides: ^{37,43}Gap 27 (SRPTEKTIFII), ⁴⁰Gap 27 (SRPTEKNVFIV) and ⁴³Gap 26 (VCYDKSFPISHVR) respectively (Genscript). Specificity of these peptides was checked with an inactive homologous peptide: ⁴³Gap 20 (EIKKFKYGC). The role of superoxide anion was investigated with 300 U/ml poly-ethylene glycol-superoxide dismutase (PEG-SOD, Sigma) combined to 600 U/ml poly-ethylene glycol-catalase (PEG-catalase; Sigma). Once substances added, a second contraction with either 10 μM or cumulative concentrations of 5-HT was performed. We performed time-matched controls to check that we can produce two similar cumulative concentration-response curves (CCRC) to 5-HT with one hour of delay between the two CCRC (Figure S1). When indicated, vessels were perfused before contraction protocol with 100 μl of 0.3% 3-((3-cholamidopropyl)-diethylammonio)-1-propane sulphonate (CHAPS, Sigma) in order to remove endothelium, as previously described [18].

We checked that such protocol suppressed endothelial function by testing the absence of a relaxation with 10 μM carbamylcholine of 40 mM KCl-induced precontracted pulmonary arteries (Figure S2). CHAPS on its own had no deleterious effect on the contraction and calcium signal induced by high potassium solution (KCl 40 mM) (Figure S3).

Isometric Contraction Measurements

Isometric contraction was recorded in intrapulmonary arterial rings with an external diameter of 1.5–2 mm as reported previously [19,20]. Briefly, mechanical properties were assessed using organ bath and transducer systems, coupled to IOX software (EMKA Technologie). As determined in preliminary experiments, tissues were set at optimal length by equilibration against a passive load of 0.8 g. At the outset of each experiment, K⁺-rich (80 mM) solution, obtained by substituting an equimolar amount of KCl for NaCl from Krebs–HEPES solution, was applied in order to obtain a reference contraction used to normalize subsequent contractile responses. Contractile properties were tested by constructing a CCRC to 5-HT (10 nM to 100 μM) for each ring. When indicated, ^{37,43}Gap 27 was incubated during 1 hour before CCRC to 5-HT.

Endothelial function was tested by relaxation with 10 μM carbamylcholine of 0.3 μM phenylephrine-induced precontracted pulmonary arterial rings. All experiments were performed at 37°C.

Quantitative RT-PCR

RNA Extraction. IPA from one rat was homogenized using 600 μl of Trizol (Invitrogen), then, 120 μl of chloroform (Sigma)

was added. The RNA was extracted from the aqueous phase after centrifugation at 15,000 *g* for 15 min. RNA was precipitated in the presence of isopropanol (Sigma) at -20°C overnight. The pure RNA was obtained by centrifugation at 15,000 *g* for 15 min and was washed with 80% ethanol (Sigma). The concentration of RNA was measured spectrophotometrically by GeneQuant RNA/DNA calculator (Amersham Pharmacia). The total RNA (1 μg) was reverse transcribed into cDNA by using AMV reverse transcriptase (Promega), RNase inhibitor, and oligo d(T) as a primer at 42°C for 60 min followed by heating at 94°C for 3 min.

Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR). Real-time quantitative PCR was performed with a Rotor-Gene 2000 (Corbett Research). Triplicate PCR reactions were assembled in 0.1-ml strip tubes containing cDNA from 10 ng of total RNA, 0.2 μl of $50\times$ Titanium *Taq* DNA Polymerase combined to its buffer (Clontech Laboratories), 1 mM dNTP, each of the appropriate primer (Sigma Genosys; see table 1 for concentrations and sequences), and $0.5\times$ SYBR Green (Molecular Probes).

The PCR was performed under the following conditions: denaturation at 95°C for 15 s, annealing temperature ($68\text{--}70^{\circ}\text{C}$) depending on specific primers for 15 s, and extension at 70°C for 15 s, these steps were repeated during 40 cycles. Data collection was performed after each extension step, at a temperature of at least 3.5°C lower than the melting temperature of the amplicon (generally between $80\text{--}85^{\circ}\text{C}$) to eliminate non-specific fluorescence signal. PCR negative controls were systematically made by using water instead of cDNA. All specific primers were designed by using the primer analysis software (Oligo 6.6, Molecular Biology Insights). The efficiency of the PCR reactions was always more than 90%. Specificity of the amplified PCR products was checked with melting curve analysis and by electrophoresis analysis on a 2% agarose gel containing SYBR Green.

Western Blot

IPA from 4 rats were homogenized on ice in lyses buffer containing 1% IGEPAL, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM amino-ethyl-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSEF), 1.5 μM aprotinin and 0.1 mM leupeptin (Sigma-Aldrich). After 10 minutes of centrifugation at 15,000 *g*, supernatant is reduced in Laemmli buffer and heated at 90°C for 6 min. Protein extract were subjected to electrophoresis on a 10% acrylamid

reducing gel, and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore). The immunoblots were then incubated using either rabbit anti-Cx 37, rabbit anti-Cx 40 or mouse anti-Cx 43 (Zymed) overnight at 4°C . After incubation with appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (HRP, Santa Cruz) for 2 h at room temperature, immunoblots were then revealed by enhanced chemiluminescence acquired using Kodak Image Station 4000 MM. Band densities were quantified using GeneTool software (SynGene). Immunoblots were then stripped and revealed with mouse anti- β -actin for 1 h at room temperature.

Immunofluorescence

IPA were fixed in Formalin (Sigma) for 10 min and then embedded in OCT-Compound, frozen at -20°C and cut in 10 μm sections with a cryostat. Sections were first incubated in 0.1% Triton X-100 (Sigma) and 1% bovine serum albumin in PBS for 1 h at room temperature, and then in the primary antibodies (same antibodies as the ones used for Western Blot) overnight at 4°C . Sections were then incubated with the appropriate secondary antibodies coupled to Alexa 546 (Molecular Probes) for 2 h at room temperature. Nuclei were labeled with 45 μM Hoechst 33342 (Molecular Probes). Sections were then observed with a laser scanning confocal microscope TE2000 (Nikon) with a x 60, 1.40 NA plan apochromat oil-immersion objective. Excitation was obtained with a diode laser at 408 nm to observe nuclei, an argon laser at 488 nm to observe autofluorescence of the internal elastic lamina and a helium-neon laser at 543 nm to observe Cx labeling. The emitted light was filtered as appropriate: 450 ± 35 nm for nuclei (blue), 515 ± 30 nm for internal elastic lamina (green), and 605 ± 75 nm for Cx labeling (red).

Dye Transfer

IPA were mounted in an arteriograph as previously described (see Intracellular calcium and external diameter recording). The vessels were allowed to equilibrate and pressurized at 10 mmHg for 30 min, and then lumen was loaded with 10 μM carboxyfluorescein-AM (Molecular Probes) for 30 min before washout with Krebs-HEPES for 30 min. Where indicated, vessels were perfused with 300 μM ^{37,43}Gap 27 for 1 h before carboxyfluorescein loading. Vessels were subsequently removed from the

Table 1. Sequences of the primer pairs (S: sense; AS: antisense) for housekeeping genes (GAPDH, HPRT, PLRPO and YWHAZ) and genes of interest (Cx 37, Cx 40 and Cx 43) are shown as well as GenBank accession number, product length, product Tm and concentrations.

Gene	Sequence	GenBank accession number	Product length (pb)	Product Tm ($^{\circ}\text{C}$)	Concentration (nM)
GAPDH	S: ATTCTACCCACGGCAAGTT AS: GCCCAGTAGACTCCACGACATA	NM_017008	153	89.4	200
HPRT	S: TGTTGGATATGCCCTTGACTA AS: AGATGGCCACAGGACTAGAAC	NM_012583	178	85.6	100
PLRPO	S: AGGTGGGAGCCAGCGAAGC AS: GCAACAGTCGGGTAGCCAATC	NM_022402	208	91.7	100
YWHAZ	S: AGCCGAGCTGTCTAACGAG AS: GCCAAGTAGCGGTAGTAGTCA	NM_013011	291	88.4	100
Cx 37	S: GGTGGCAGAGGACGGTCTCT AS: CCATGGTCCAGCCGTAGAGA	NM_021654	133	85.3	200
Cx 40	S: GGAAGAGGTGAACGGGAAG AS: GGGCCTCGAGACATAACAGTT	NM_01280	197	91.3	200
Cx 43	S: TCTGCCTTTCGCTGTAACACT AS: GGGCACAGACAGGAATATGAT	NM_012567	117	87.5	200

doi:10.1371/journal.pone.0006432.t001

arteriograph and fixed in Formalin for 20 min at room temperature before cryopreservation in OCT compound at -20°C . Cryosections ($10\ \mu\text{m}$ thick) were prepared and mounted in Fluorescent mounting medium (Dako) and imaged with laser scanning confocal microscope TE2000 (Nikon) with a $\times 60$, 1.40 NA plan apochromat oil-immersion objective. Preparation was excited with an argon laser at 488 nm, and fluorescence emission was filtered at $515\ \text{nm}\pm 30$.

Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Recordings

Intrapulmonary arteries with an external diameter of 0.3–2 mm were used for EPR studies and cGMP measurements.

Superoxide Anion Spin Trapping. Pulmonary arteries were incubated in the spin trap solution containing $500\ \mu\text{M}$ 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH, Noxygen), $25\ \mu\text{M}$ deferoxamine (Sigma) and $5\ \mu\text{M}$ *N,N*-diethyldithiocarbamate (DETC, Sigma) in Krebs-HEPES at 37°C for 45 min. 5-HT $0.1\ \text{mM}$ was added during the spin trap incubation; PEG-SOD $300\ \text{U/mL}$ was incubated during 45 min before spin trap incubation. Reaction was stopped by freezing the sample in liquid nitrogen. Samples were then analyzed by EPR spectrometry on a tabletop x-band spectrometer miniscope (MS200, Magnetech). Spectra of the oxidized product of CMH (CM•) were recorded at 77°K using a flask Dewar. Acquisition parameters were as followed: Bo Field: $3341\pm 150\ \text{G}$, microwave power: 10 dB, amplitude modulation: 5 G, sweep time: 60 sec, gain: 300 and 3 scans [21]. Signals were quantified by measuring the total amplitude, after correction of baseline and normalized to the protein quantity of the sample in mg/ml.

NO Spin Trapping. Detection of NO production was performed using the technique with Fe^{2+} -DETC as spin trap. IPA were placed in 0.5 ml of Krebs-HEPES and then treated with 0.5 ml of colloid $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ as previously described and incubated for 45 min at 37°C [22]. When indicated, $0.1\ \text{mM}$ 5-HT was added during $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ incubation. NO measurements were performed at 77°K using EPR spectrometry. Instrument settings were: Bo Field: $3285\pm 80\ \text{G}$, microwave power: 10 dB, amplitude modulation: 7 G, sweep time: 150 sec, gain: 900 and 3 numbers of scan. Signals were quantified by measuring the total amplitude, after correction of baseline and normalized to the protein quantity of the sample in mg/ml.

cGMP Measurements

Intrapulmonary arteries were incubated in Krebs-HEPES with or without 5-HT $0.1\ \text{mM}$ and with or without PEG-SOD + PEG-catalase ($300\ \text{U/ml}$ and $600\ \text{U/ml}$ respectively) at 37°C for 15 min, cooled in liquid nitrogen and then stored at -80°C . Arteries were homogenized in ice-cold trichloroacetic acid (5%, Sigma) to extract cGMP. cGMP content was assayed as described in the procedure of an ELISA kit obtained from Cayman Chemical & Co. cGMP level was normalized to tissue protein content in mg/ml.

Statistical Analysis

All results are expressed as means \pm SEM, n indicates the number of IPA for the calcium and contractile studies, dye transfer and immunofluorescence, the number of rats for quantitative RT-PCR, EPR and cGMP measurements, and the number of experiments from 3 pools of rats (4 rats per pool) for Western Blot. Cumulative concentration response curves to 5-HT were fitted to the logistic equation with Origin 6.0 software to determine the maximum effect of 5-HT for each experiment, and a non parametric test for paired samples (Wilcoxon test) was performed on the maximum effect of 5-HT with or without drug.

Quantitative RT-PCR results were analyzed with the GeNorm method [23]. Statistical analyses were performed on all other data using a non parametric test for unpaired samples (Mann-Witney test). Values of $P<0.05$ were considered significant.

Results

Connexins 37, 40 and 43 are expressed and functional in the pulmonary arterial wall

Although very few studies have been performed with controversial results in pulmonary arteries, the three Cx 37, 40 and 43 have been observed in pulmonary arteries [13,14]. Quantitative RT-PCR and Western Blot experiments evidenced the presence of the mRNA and proteins for the three Cx 37, 40 and 43 in small intrapulmonary arteries (IPA) (Figure 1A and B). Immunofluorescent labeling studies confirmed the presence of the Cx 37, 40 and 43 proteins (Figure 1C). The autofluorescence of the external and internal elastic lamina in green has been previously observed in various vessels [24,25] and is useful to delimit the smooth muscle layers from the endothelial cells and the adventitia. Some punctate labeling was observed for the Cx 37, 40 and 43 in the endothelium and similar labeling was observed in the smooth muscle for the Cx 37 and 40 (Figure 1C). Punctate staining is characteristic of connexins labeling and has been previously shown in various tissues including vessels [4,24,25]. Since (1) Cx 37 and 43 are expressed in IPA, (2) they have a functional role in both the calcium and contractile signal and (3) they are localized in the endothelium, we then addressed the functional role of the Cx 37 and 43 in the myoendothelial communications and/or the communications between endothelial cells. After loading endothelial cells with a fluorescent dye (carboxyfluorescein), the dye diffused to the smooth muscle cells in control conditions (Figure 1D left) whereas it stayed in the endothelium when the vessels were pretreated with $^{37,43}\text{Gap 27 300}\ \mu\text{M}$ (Figure 1D right).

Altogether, it can be concluded that the myoendothelial communications are functional and involve the Cx 43 and/or Cx 37.

Vasoreactivity to 5-HT is controlled by gap junctions and endothelium

We then examined if gap junctions had any influence on (1) the intracellular calcium concentration in smooth muscle and (2) the contraction in IPA. Consequently, we checked if any of these connexins had any role in the simultaneously recorded calcium and contractile signals in response to the agonist 5-HT in IPA. Incubation of the vessels with $^{40}\text{Gap 27 300}\ \mu\text{M}$, the Cx-mimetic peptide used as a specific blocker of the Cx 40, had no effect on both calcium and contractile signals (Figure S4). In contrast, incubation with $^{37,43}\text{Gap 27 300}\ \mu\text{M}$, the Cx-mimetic peptide used as a specific blocker of the both Cx 37 and 43, strongly decreased both calcium and contractile signals to 5-HT (Figure 2A and B left). Incubation with $^{43}\text{Gap 26 300}\ \mu\text{M}$, the specific blocker of the Cx 43 alone, had similar effects on calcium and contractile signals to those of the $^{37,43}\text{Gap 27}$ (Figure S5) suggesting that the Cx 43 is involved in the response to 5-HT. Since $^{43}\text{Gap 20}$ is a peptide homologous to the intracellular loop of the Cx 43, it can be used as an inactive analog of the Gap 27 specific of the Cx 43 [26]. We observed that $^{43}\text{Gap 20 300}\ \mu\text{M}$ had no effect on the calcium and contractile signals to 5-HT confirming the specificity of these Cx-mimetic peptides (Figure S6).

Since gap junctions are localized in between smooth muscle cells and/or in between endothelial cells and/or in between smooth muscle and endothelial cells (myoendothelial junctions), we removed the endothelium of the vessels to discriminate the role

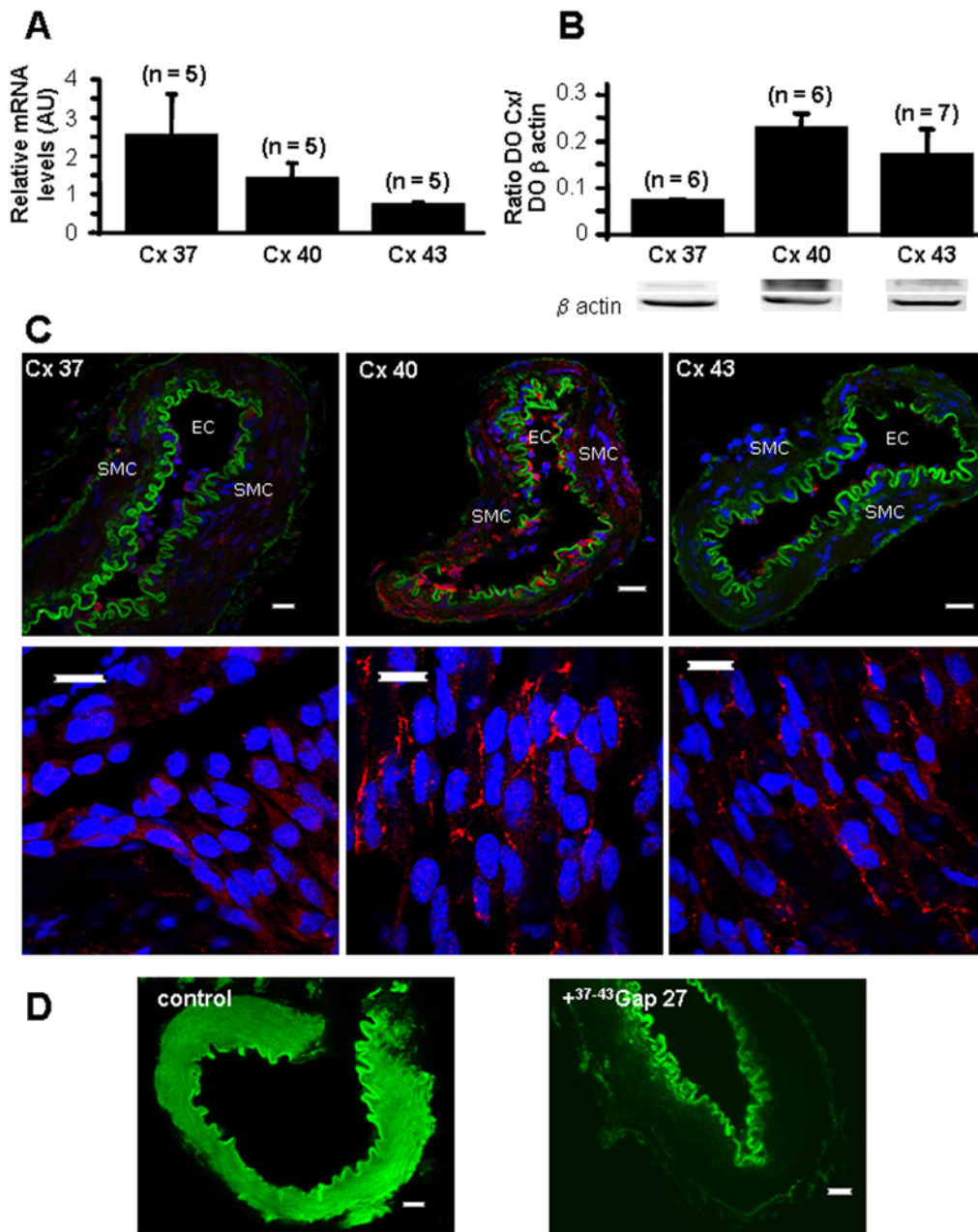


Figure 1. Expression and function of connexins 37, 40 and 43. A shows mean values \pm S.E.M. of relative mRNA expression levels measured by quantitative RT-PCR. B shows protein expression measured by Western Blot and normalized to β actin expression level. C shows immunofluorescent labeling demonstrating the presence of Cx (red) 37 (left), 40 (middle) and 43 (right). Green shows the autofluorescent signal of the vessels and blue the nuclei (C). C bottom are pictures of the endothelial side of opened vessels. SMC means smooth muscle cells and EC means endothelial cells. D shows diffusion of a green fluorescent dye from the endothelium to the smooth muscle via cell-to-cell communications in basal conditions (left) and such diffusion was blocked following one hour incubation with 300 μ M ³⁷⁻⁴³Gap 27 (right). Scale bars are 15 μ m. n indicates the number of rats for quantitative RT-PCR and the number of experiments performed for Western Blot. doi:10.1371/journal.pone.0006432.g001

of these different types of communications. The blocking effect of the ^{37,43}Gap 27 300 μ M was absent in endothelium-denuded vessels (Figure 2B right) suggesting that the myoendothelial and/or the endothelial junctions are important for the calcium and contractile signals to 5-HT.

Isometric tension recordings showed that whereas ^{37,43}Gap 27 300 μ M blocked the CCRC to 5-HT (0.01–100 μ M), it had no effect on the CCRC to phenylephrine (0.1 nM–3 μ M), to endothelin-1 (0.1–5000 nM) and to high potassium solutions (4.7–

100 mM, Figure S7). Moreover, in systemic vessels such as renal arteries, the CCRC to 5-HT were identical in the presence or in the absence of ⁴³Gap 26 300 μ M (Figure S8A) whereas in aorta, ⁴³Gap 26 300 μ M partially inhibited the CCRC to 5-HT (Figure S8B).

NO and O₂⁻ are involved and interconnected in the calcium and contractile responses to 5-HT

Since NO is a major element contributing to the endothelial control of vasoreactivity, we checked the effect of L-NAME, a NO

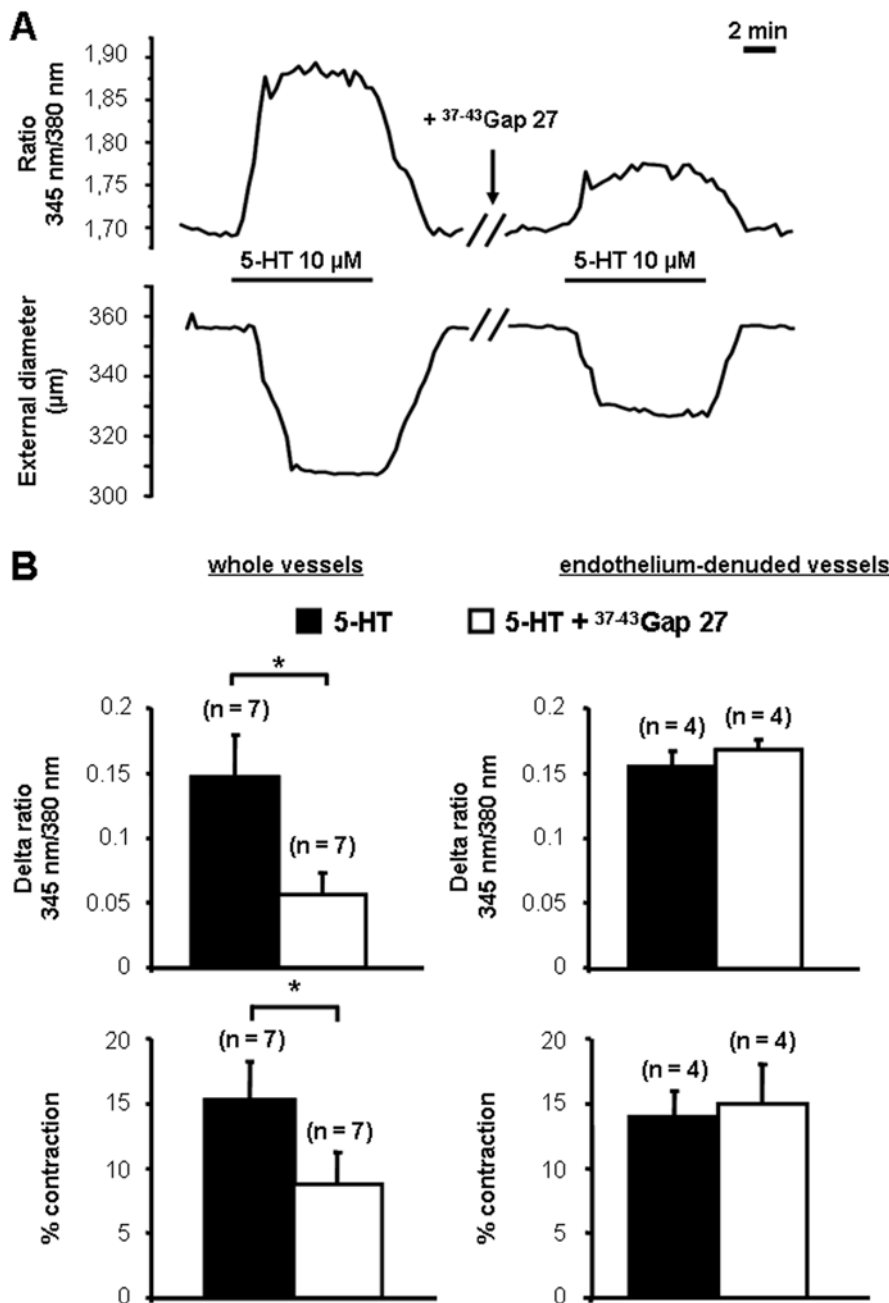


Figure 2. Myoendothelial and/or endothelial gap junctions participate to the calcium and contractile responses to 5-HT. Typical traces of simultaneous recordings of intracellular calcium (top panel) and contraction (bottom panel) induced by 5-HT 10 µM are shown in A. 300 µM ³⁷⁻⁴³Gap 27 was introduced into the bath where indicated. B shows the mean values ± S.E.M. for the effect of ³⁷⁻⁴³Gap 27 on both the amplitude of the calcium response to 5-HT 10 µM (top) and the percentage of contraction (bottom) in whole vessels (left) and in endothelium-denuded vessels (right). Black columns show the responses to 5-HT in the absence of ³⁷⁻⁴³Gap 27 and white columns are the same responses in the presence of ³⁷⁻⁴³Gap 27. Data are expressed as a delta ratio (345 nm/380 nm) for calcium signal and the percentage of contraction is related to the percentage of decrease of the initial external diameter. n indicates the number of vessels studied. * indicates a significant difference when P<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0006432.g002

synthase inhibitor, on the blocking effect of ^{37,43}Gap 27 previously observed on the simultaneously recorded calcium and contractile signals to 5-HT. L-NAME 100 µM reversed the blocking effect of ^{37,43}Gap 27, 300 µM, on both the intracellular calcium concentration and contraction to 5-HT (Figure 3A) whereas L-NAME 100 µM alone had no effect (Figure S9) confirming the importance of NO in the endothelial control of the vasoreactivity through gap junctions. We hypothesized that O₂⁻ production by 5-HT could

account for a reduction of the endothelial NO production leading to an increased contraction since O₂⁻ is a small element which likely passes the membranes through gap junctions and is able to scavenge NO and/or reduce its production thus decreasing its relaxant effect [11,27]. Indeed, poly-ethylene glycol-superoxide dismutase (PEG-SOD) 300 U/ml and poly-ethylene glycol-catalase (PEG-catalase) 600 U/ml, two substances which catabolise O₂⁻, reduced calcium and contractile responses to 5-HT and

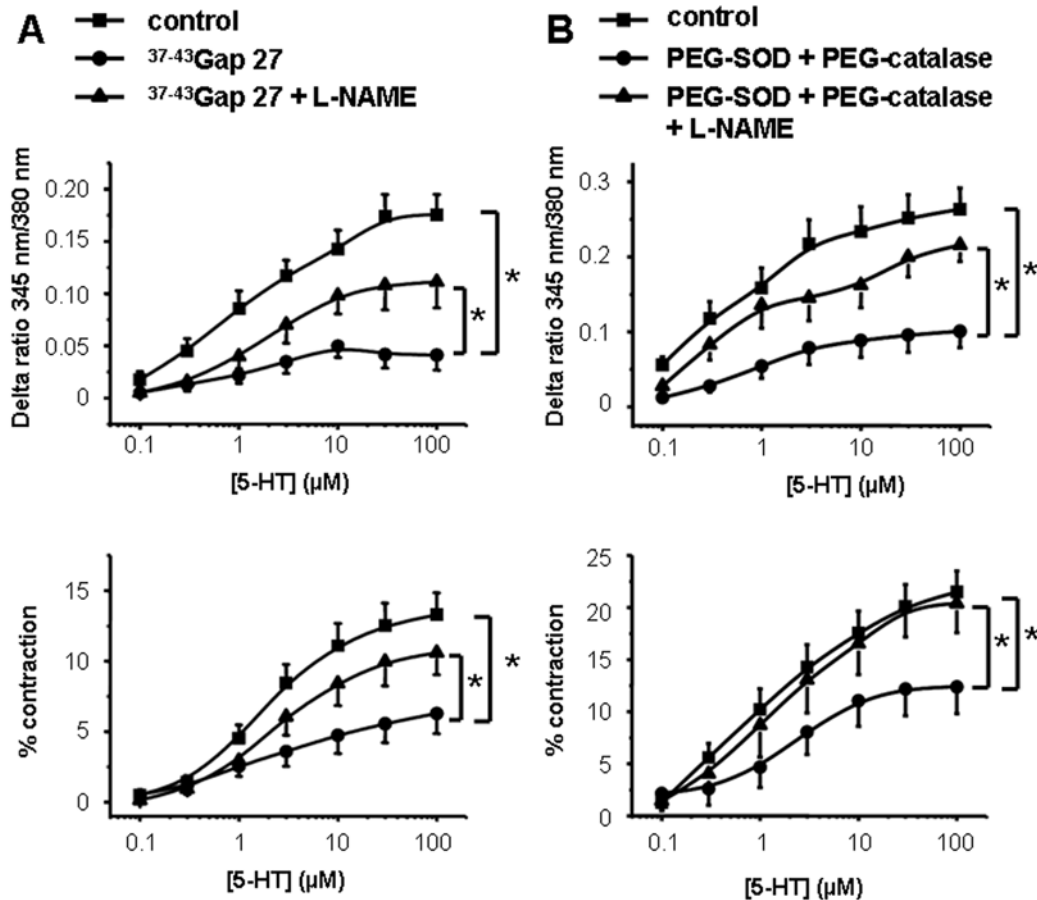


Figure 3. Contribution of gap junctions, O_2^{\bullet} and NO in the calcium and contractile responses to 5-HT. Concentration response curves to 5-HT (0.1–100 μ M) were performed simultaneously on the calcium signal (top panels) and the contraction (bottom panels). Data points are means \pm S.E.M. A, 300 μ M $^{37-43}$ Gap 27 strongly blocked the calcium and contractile signals to 5-HT (black circles, $n = 7$ vessels). B, PEG-SOD (300 U/ml) and PEG-catalase (600 U/ml) also inhibited the calcium and contractile responses to 5-HT (black circles, $n = 7$ vessels). Both $^{37-43}$ Gap 27 and PEG-SOD plus PEG-catalase effects were reversed by L-NAME 100 μ M (A and B respectively, black triangles, $n = 6$ and 9 vessels respectively). Black squares are control dose-response curves to 5-HT ($n = 13$ –16 vessels). * indicates a significant difference when $P < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0006432.g003

such effect was reversed by L-NAME 100 μ M (Figure 3B). Electron paramagnetic resonance (EPR) recordings demonstrated that 5-HT produced O_2^{\bullet} (Figure 4A). This O_2^{\bullet} production was prevented by PEG-SOD 300 U/ml and unchanged when the endothelium was removed by CHAPS 0.3% (Figure 4A). We checked that CHAPS 0.3% had no effect on its own on basal O_2^{\bullet} levels (Figure S10). Consequently, 5-HT produced O_2^{\bullet} originating from smooth muscle. Moreover, we also directly detected the production of NO by 5-HT with EPR experiments (Figure 4B). When the vessels were endothelium-denuded by CHAPS or treated with L-NAME 100 μ M, the production of NO by 5-HT was abolished (Figure 4B) showing respectively that 1) NO produced by 5-HT originates from the endothelium and 2) the product detected by EPR is linked to NO synthases.

Finally, since, on one hand, 5-HT produced NO that induced relaxation via cGMP production in SMC and, on the other hand, it also produced O_2^{\bullet} that antagonized NO, we measured the cGMP content in order to determine if the overall result was in favor of a relaxant or a contractile effect. Whereas 5-HT significantly reduced the basal cGMP content, in the additional presence of PEG-SOD 300 U/ml and PEG-catalase 600 U/ml, it did increase the cGMP content (Figure 4C). This result indicates that O_2^{\bullet} produced by 5-HT in SMC decreases the NO produced

by 5-HT in EC, thus decreasing cGMP level leading to an increased vascular contraction (Figure 5A). To the best of our knowledge, this is the first description of a negative feedback of smooth muscle on endothelial relaxant control of vasoreactivity.

Discussion

Our findings provide the first direct evidence of a smooth muscle negative feedback on NO-dependent endothelial vasodilatation thus maintaining some contraction in vessels under physiological pressures. In particular, we showed that the Cx 43 is expressed and functional in IPA and is necessary to develop a sustained agonist-mediated contraction in an integrated vascular model. Our data also support that such process involves agonist-induced production of O_2^{\bullet} in the smooth muscle and NO in the endothelium. O_2^{\bullet} , via myoendothelial junctions, reduces NO-induced cGMP production in smooth muscle and the resulting vessel relaxation (Figure 5).

In small vessels, gap junctions are usually mainly involved in spontaneous oscillations of membrane potential, intracellular calcium concentration and contraction [24,28,29]. Gap junctions have also been shown to be largely implicated in the mediators- and endothelium-related relaxation [5,30]. Few studies have

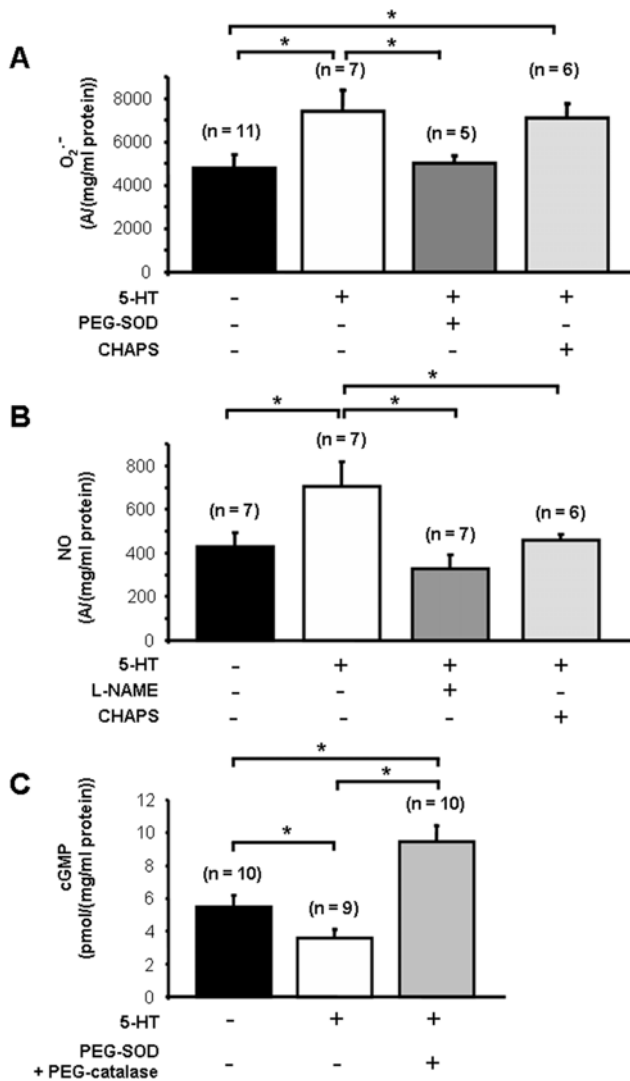


Figure 4. Production of O₂⁻, NO and cyclic GMP by 5-HT. A, O₂⁻ production was measured by EPR spectrometry in the absence or in the presence of 5-HT 100 μM (black column and white column respectively). The production of O₂⁻ by 5-HT was reduced by PEG-SOD (A, grey column) whereas it was unchanged when vessels were endothelium-denuded by CHAPS (A, light grey column). B, EPR spectrometry also showed an increase in NO production by 5-HT 100 μM (white column) and an absence of NO production by 5-HT 100 μM when vessels were endothelium-denuded by CHAPS (light grey column) or treated with L-NAME 100 μM (grey column). C, as measured by Elisa kit, basal cyclic GMP content (black column) was decreased by 5-HT (white column) whereas it was increased when PEG-SOD and PEG-catalase were added to 5-HT (light grey column). Data from EPR spectrometry are expressed as a ratio of the amplitude of the pic (A) out of the protein concentration of each pool of vessels in mg/ml. cGMP contents are expressed as a ratio of the quantity of cGMP in picomoles out of the protein concentration of each pool of vessels in mg/ml. Values are means ± S.E.M. and n indicates the number of rats tested. * indicates a significant difference when P < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0006432.g004

addressed the role of gap junctions in agonist-induced contraction and the results vary according to studies. Indeed, gap junction blockers either increase or decrease the contraction and intracellular calcium to phenylephrine in rat mesenteric arteries [24,29]. Interestingly, arteries that express Cx 43 to a high degree, such as the rat aorta, are more sensitive to adrenergic agonists than those

expressing Cx 43 at a low level such as the caudal artery [30,31]. Altogether, these results are consistent with our study namely stimulation of gap junctions, and especially Cx 43, is important to strengthen the agonist-related vascular contraction. However, the mechanisms involved in this regulation of the vascular tone by gap junctions remain elusive.

Gap 26 and Gap 27 connexin-mimetic peptides have been largely used as specific blockers of the gap junctions [24,32]. In our hands, ³⁷⁻⁴³Gap 27 and ⁴³Gap 26, firstly, inhibited the calcium and contractile signals to 5-HT whereas the inactive analog ⁴³Gap 20 had no effect and, secondly, ³⁷⁻⁴³Gap 27 prevented the diffusion of a fluorescent dye from the endothelial cells to the smooth muscle cells demonstrating the specificity of these blockers on the connexins.

In vessels, Ca²⁺ and inositol 1, 4, 5 trisphosphate (IP₃) are intercellular messengers that pass through the intercellular communications and especially the myoendothelial communications [28,33]. In a model of cocultured endothelial and smooth muscle cells, both IP₃ and calcium originating in the vascular SMC appear to cross myoendothelial communications to induce a secondary calcium increase in endothelial cells whereas only calcium, and not IP₃, originating from EC crosses myoendothelial junctions to generate a calcium dependent response in the vascular SMC [33]. In an integrated model of pressurized mesenteric arteries, such regulation by surrounding SMC via myoendothelial gap junctions, even under basal conditions, has also been described [28]. However, under those conditions, IP₃ from SMC increases calcium in EC and, consequently, enhances endothelium-related relaxation rather than contraction. In our study, the negative control of this secondary endothelial calcium signal linked to relaxation allows the smooth muscle to produce a sustained rather than a transient contraction.

There are some lines of evidence from the literature that O₂⁻ (1) is produced by 5-HT in mice and bovine pulmonary arterial SMC and (2) participates to the contraction or proliferation of SMC [10,34]. Although, Liu and Folz [10] used an integrated model of mouse intrapulmonary arteries, they did not address the role of gap junctions in the contraction to 5-HT. In pulmonary artery, 5-HT is well known to induce contraction via stimulation of 5-HT receptors and SMC proliferation via stimulation of 5-HT transporter and/or 5-HT receptors [6]. O₂⁻ production in mice intrapulmonary arteries is insensitive to GR 127935, a selective inhibitor of 5-HT_{1B/D} receptor and it is sensitive to 5-HT transporter in bovine pulmonary arterial SMC [10,35]. We did not address the role of 5-HT transporter and/or receptor in our model as this issue deserves future study. In the same way, Liu and Folz suggested that O₂⁻ was produced via a NADPH oxidase pathway [10] and this hypothesis could apply to our study.

O₂⁻ is increased in several models of hypertension including pulmonary arterial hypertension [36,37]. Moreover, it has been observed that increased contraction to 5-HT in aortic strips of hypertensive rats is inhibited by the blockade of the gap junctions [38]. Finally, pulmonary arterial hypertension is linked to an endothelial dysfunction [39]. These data suggest that the process we propose, namely the negative regulation of the endothelial relaxation by the smooth muscle, could also be of great interest in vascular pathophysiological conditions.

In conclusion, we evidenced vascular smooth muscle can negatively control the endothelial relaxation in order to produce a sustained contraction in small vessels at physiological pressures. This control involves O₂⁻, myoendothelial junctions and regulation of endothelial NO function. In that respect, modifications of this process could potentially be involved in vascular pathologies and need to be further investigated.

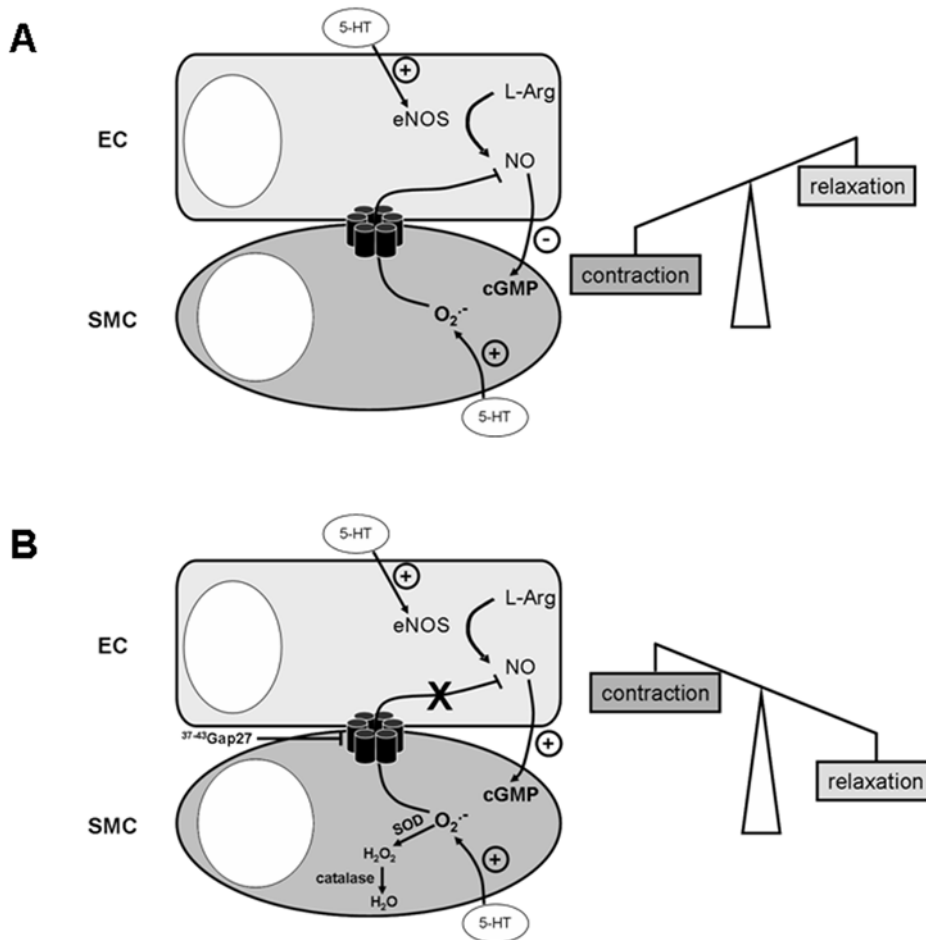


Figure 5. Proposed mechanism for the negative feedback of smooth muscle on endothelial relaxant control of vasoreactivity. 5-HT can act on both SMC and EC. Calcium increase in SMC in response to 5-HT leads to contraction whereas in EC it stimulates NO synthase and leads to NO production. NO will stimulate guanylate cyclase which will increase cGMP production in SMC and then induce relaxation. In normal conditions, 5-HT produces O₂⁻ in SMC. O₂⁻ passes through myoendothelial gap junctions and scavenges NO in EC thus decreasing cGMP content in SMC. Consequently, 5-HT effect on SMC prevails over 5-HT effect on EC and will induce a contraction (A). If (1) O₂⁻ is degraded by SOD and catalase, and/or (2) gap junctions are blocked, NO scavenging by O₂⁻ in EC will be prevented. Consequently, NO and cGMP levels will be increased thus inducing a relaxant effect leading to a lower contraction to 5-HT in the whole vessels (B).
doi:10.1371/journal.pone.0006432.g005

Supporting Information

Figure S1 Reproducibility of two cumulative concentration-response curves to 5-HT on the same vessel. Two CCRC to 5-HT (0.1–100 μM) recorded on the same vessel with a delay of one hour in between the two curves were similar for both calcium signal (top) and contraction (bottom). Black squares indicate the first CCRC and the black circles indicate the second CCRC. Data are means ± S.E.M. for 8 vessels and are expressed as a delta ratio (345 nm/380 nm) for calcium signal and a percentage of contraction (top and bottom respectively). The percentage of contraction is related to the percentage of the initial external diameter.
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s001 (0.30 MB TIF)

Figure S2 Effect of endothelium removal on the relaxant effect of carbamylcholine. Intrapulmonary arteries were precontracted with high potassium solution (KCl 40 mM) and then stimulated with 10 μM carbamylcholine. Calcium and contractile signals were simultaneously recorded (top and bottom respectively). The experiments were performed in control vessels (black column) and in vessels whose endothelium has been denuded with CHAPS (white column). Data are means ± S.E.M. and are expressed as a

percentage of the delta ratio (345 nm/380 nm) or a percentage of the contraction in response to carbamylcholine 10 μM from precontracted vessels with KCl 40 mM (top and bottom respectively). n indicates the number of vessels tested. * indicates a significant difference when P < 0.05.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s002 (0.21 MB TIF)

Figure S3 Effect of endothelium removal on the calcium and contractile responses to high potassium solution. The calcium and contractile signals simultaneously recorded in response to high potassium solution (KCl 40 mM) were similar in control vessels (black column) and in vessels whose endothelium has been denuded with CHAPS (white column). Data are means ± S.E.M. and are expressed as a delta ratio (345 nm/380 nm) for calcium signal and a percentage of contraction (top and bottom respectively). n indicates the number of vessels tested.
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s003 (0.19 MB TIF)

Figure S4 Effect of 40Gap 27 on the calcium and contractile signals in response to 5-HT. The calcium and contractile signals were simultaneously recorded in response to 5-HT 10 μM in the absence (black column) or in the presence of 300 μM 40Gap 27,

the Cx-mimetic peptide targeted against Cx 40 (white column). Data are means \pm S.E.M. and are expressed as a delta ratio (345 nm/380 nm) for calcium signal and a percentage of contraction (top and bottom respectively). n indicates the number of vessels tested.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s004 (0.18 MB TIF)

Figure S5 Effect of 43Gap 26 on the calcium and contractile signals in response to 5-HT. Cumulative concentration-response curves to 5-HT (0.1–100 μ M) were performed in the absence or in the presence of 300 μ M 43Gap 26, the Cx-mimetic peptide targeted against Cx 43 (black squares and circles respectively). Data are means \pm S.E.M. for 7 vessels and are expressed as a delta ratio (345 nm/380 nm) for calcium signal and a percentage of contraction (top and bottom respectively). * indicates a significant difference when $P < 0.05$.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s005 (0.30 MB TIF)

Figure S6 Effect of 43Gap 20 on the calcium and contractile signals in response to 5-HT. CCRC to 5-HT (0.1–100 μ M) were performed in the absence or in the presence of 300 μ M 43Gap 20, an inactive analog of the Cx-mimetic peptide targeted against Cx 43 (black squares and circles respectively). Data are means \pm S.E.M. for 7 vessels and are expressed as a delta ratio (345 nm/380 nm) for calcium signal and a percentage of contraction (top and bottom respectively).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s006 (0.30 MB TIF)

Figure S7 Effect of 37-43Gap 27 on the contractile responses to 5-HT, phenylephrine, endothelin-1 and high potassium solutions. Isometric tension measurements were recorded on intrapulmonary arterial rings in response to cumulative concentrations of 5-HT (A) or phenylephrine (B) or endothelin-1 (C) or in response to increasing concentrations of potassium (KCl 4.7 - 100 mM) (D). Contractions were recorded in the absence (black squares) or in the presence (black circles) of 300 μ M 37-43Gap 27. Data are means \pm S.E.M. for 7 - 21 vessel rings and are expressed as a percentage of the contraction to high potassium solution (KCl 80 mM). * indicates a significant difference when $P < 0.05$.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s007 (0.41 MB TIF)

Figure S8 Effect of 43Gap 26 on the contractile responses to 5-HT in renal arteries and aorta. Isometric tension measurements were recorded on arterial rings in response to cumulative

concentrations of 5-HT in renal arteries (A) or aorta (B). Contractions were recorded in the absence (black squares) or in the presence (black circles) of 300 μ M 43Gap 26. Data are means \pm S.E.M. for 8 - 16 vessel rings and are expressed as a percentage of the contraction to high potassium solution (KCl 80 mM). * indicates a significant difference when $P < 0.05$.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s008 (0.29 MB TIF)

Figure S9 Effect of L-NAME on the simultaneously recorded calcium and contractile signals in response to 5-HT. Cumulative concentration-response curves to 5-HT (0.1–100 μ M) were performed in the absence or in the presence of L-NAME 100 μ M, a NO synthase inhibitor (black squares and circles respectively). Data are means \pm S.E.M. for 6 vessels and are expressed as a delta ratio (345 nm/380 nm) for calcium signal and a percentage of contraction (top and bottom respectively).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s009 (0.29 MB TIF)

Figure S10 Effect of endothelium removal and xanthine plus xanthine oxidase treatment on superoxide anion production. O₂[•] was measured by using CMH spin trapping method and EPR spectrometry on control vessels (black column), vessels whose endothelium was denuded with CHAPS 0.3% (white column, top panel) and vessels treated with xanthine 50 μ M plus xanthine oxidase 0.02 U/ml (white column, bottom panel). Data are means \pm S.E.M. and are expressed as a ratio of the amplitude of the pic (A) out of the protein concentration of each pool of vessels in mg/ml. n indicates the number of vessels tested.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006432.s010 (0.24 MB TIF)

Acknowledgments

We thank Huguette Crevel for her technical assistance in performing isometric contraction experiments. We also thank Dr Martinez MC and Dr Andriantsitohaina R (CNRS, UMR 6214, INSERM, U771, Universite d'Angers - France) for their helpful advices regarding Electron Paramagnetic Resonance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MB CG. Performed the experiments: MB CG. Analyzed the data: MB CG. Wrote the paper: MB RM JPS CG.

References

- Furchgott RF, Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 3: 2007–2018.
- Quilley J, McGiff JC (2000) Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci* 21: 121–124.
- Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH (1998) K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396: 269–272.
- Chaytor AT, Edwards DH, Bakker LM, Griffith TM (2003) Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H₂O₂ in NO-independent relaxations of rabbit arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15212–15217.
- Morio Y, Carter EP, Oka M, McMurtry IF (2003) EDHF-mediated vasodilation involves different mechanisms in normotensive and hypertensive rat lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1762–1770.
- Dempsey Y, MacLean MR (2008) Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *Br J Pharmacol* 155: 455–462.
- Rodat L, Savineau JP, Marthan R, Guibert C (2007) Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflugers Arch* 454: 41–51.
- Jahnichen S, Glusa E, Pertz HH (2005) Evidence for 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371: 89–98.
- Lee SL, Simon AR, Wang WW, Fanburg BL (2001) H₂O₂ signals 5-HT-induced ERK MAP kinase activation and mitogenesis of smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L646–652.
- Liu JQ, Folz RJ (2004) Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L111–118.
- Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, et al. (2007) Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH₄) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH₄. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15081–15086.
- Figuerola XF, Isakson BE, Duling BR (2004) Connexins: gaps in our knowledge of vascular function. *Physiology (Bethesda)* 19: 277–284.
- Ko YS, Yeh HI, Rothery S, Dupont E, Coppen SR, et al. (1999) Connexin make-up of endothelial gap junctions in the rat pulmonary artery as revealed by immunofluorescence and triple-label immunogold electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 47: 683–692.
- Nakamura K, Inai T, Nakamura K, Shibata Y (1999) Distribution of gap junction protein connexin 37 in smooth muscle cells of the rat trachea and pulmonary artery. *Arch Histol Cytol* 62: 27–37.
- Moore LK, Burt JM (1995) Gap junction function in vascular smooth muscle: influence of serotonin. *Am J Physiol* 269: H1481–1489.
- Sandow SL, Hill CE (2000) Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* 86: 341–346.
- Guibert C, Marthan R, Savineau JP (2004) 5-HT induces an arachidonic acid-sensitive calcium influx in rat small intrapulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L1228–1236.

18. Robert R, Savineau JP, Norez C, Becq F, Guibert C (2007) Expression and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat intrapulmonary arteries. *Eur Respir J* 30: 857–864.
19. Guibert C, Savineau JP, Crevel H, Marthan R, Rousseau E (2005) Effect of short-term organoid culture on the pharmaco-mechanical properties of rat extra- and intrapulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 146: 692–701.
20. Bonnet S, Dumas-de-La-Roque E, Begueret H, Marthan R, Fayon M, et al. (2003) Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9488–9493.
21. Meziani F, Kremer H, Tesse A, Baron-Menguy C, Mathien C, et al. (2007) Human serum albumin improves arterial dysfunction during early resuscitation in mouse endotoxic model via reduced oxidative and nitrosative stresses. *Am J Pathol* 171: 1753–1761.
22. Kleschyov AL, Mollnau H, Oelze M, Meinertz T, Huang Y, et al. (2000) Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 672–677.
23. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
24. Matchkov VV, Rahman A, Bakker LM, Griffith TM, Nilsson H, et al. (2006) Analysis of effects of connexin-mimetic peptides in rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H357–367.
25. Saliez J, Bouzin C, Rath G, Ghisdal P, Desjardins F, et al. (2008) Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca²⁺ signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation* 117: 1065–1074.
26. Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM (1997) Peptides homologous to extracellular loop motifs of connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. *J Physiol* 503 (Pt 1): 99–110.
27. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1620–1624.
28. Kansui Y, Garland CJ, Dora KA (2008) Enhanced spontaneous Ca²⁺ events in endothelial cells reflect signalling through myoendothelial gap junctions in pressurized mesenteric arteries. *Cell Calcium* 44: 135–146.
29. Schuster A, Oishi H, Beny JL, Stergiopoulos N, Meister JJ (2001) Simultaneous arterial calcium dynamics and diameter measurements: application to myoendothelial communication. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1088–1096.
30. Rocha ML, Kihara AH, Davel AP, Britto LR, Rossoni LV, et al. (2008) Blood pressure variability increases connexin expression in the vascular smooth muscle of rats. *Cardiovasc Res* 80: 123–130.
31. Rummery NM, Hickey H, McGurk G, Hill CE (2002) Connexin37 is the major connexin expressed in the media of caudal artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1427–1432.
32. Griffith TM, Chaytor AT, Taylor HJ, Giddings BD, Edwards DH (2002) cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6392–6397.
33. Isakson BE, Ramos SI, Duling BR (2007) Ca²⁺ and inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction. *Circ Res* 100: 246–254.
34. Lee SL, Wang WW, Finlay GA, Fanburg BL (1999) Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol* 277: L282–291.
35. Lee SL, Wang WW, Fanburg BL (1998) Superoxide as an intermediate signal for serotonin-induced mitogenesis. *Free Radic Biol Med* 24: 855–858.
36. Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS, Folz RJ (2006) Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L2–10.
37. Lyle AN, Griendling KK (2006) Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* 21: 269–280.
38. Watts SW, Webb RC (1996) Vascular gap junctional communication is increased in mineralocorticoid-salt hypertension. *Hypertension* 28: 888–893.
39. Coggins MP, Bloch KD (2007) Nitric oxide in the pulmonary vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1877–1885.

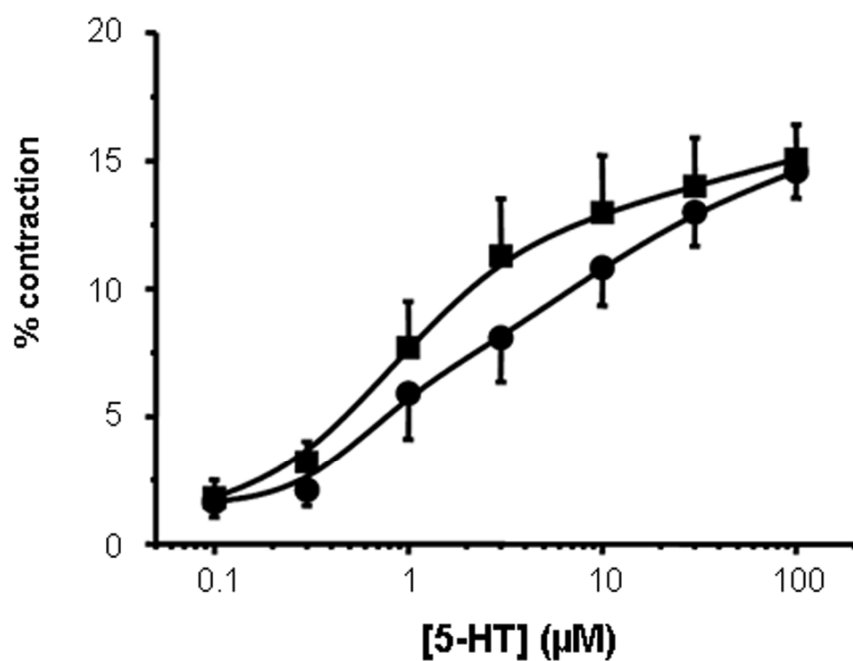
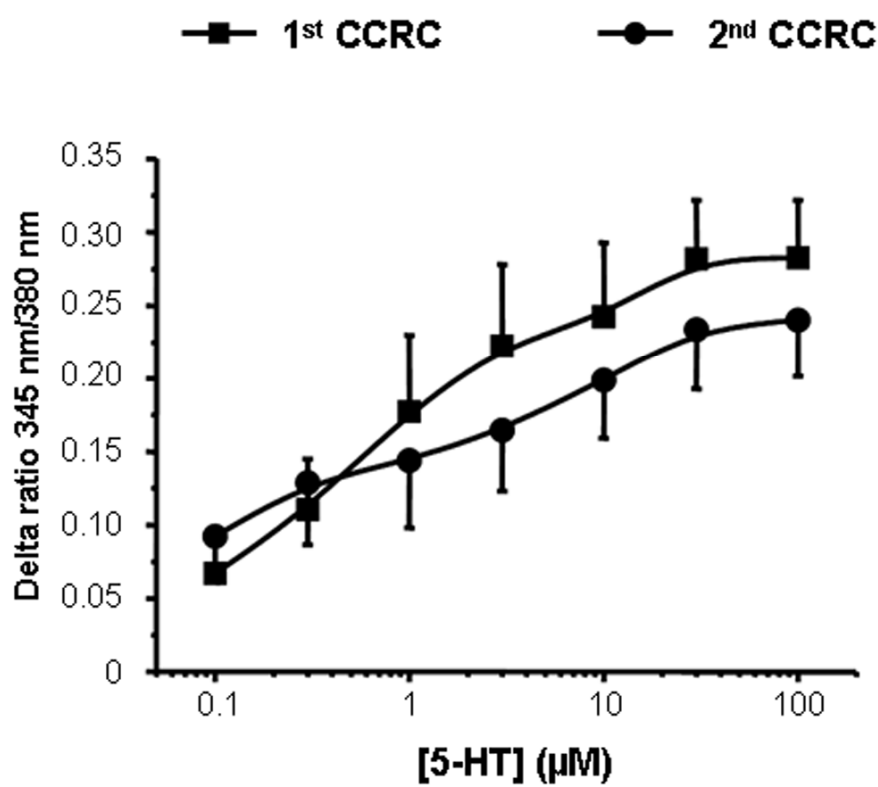


Figure S1

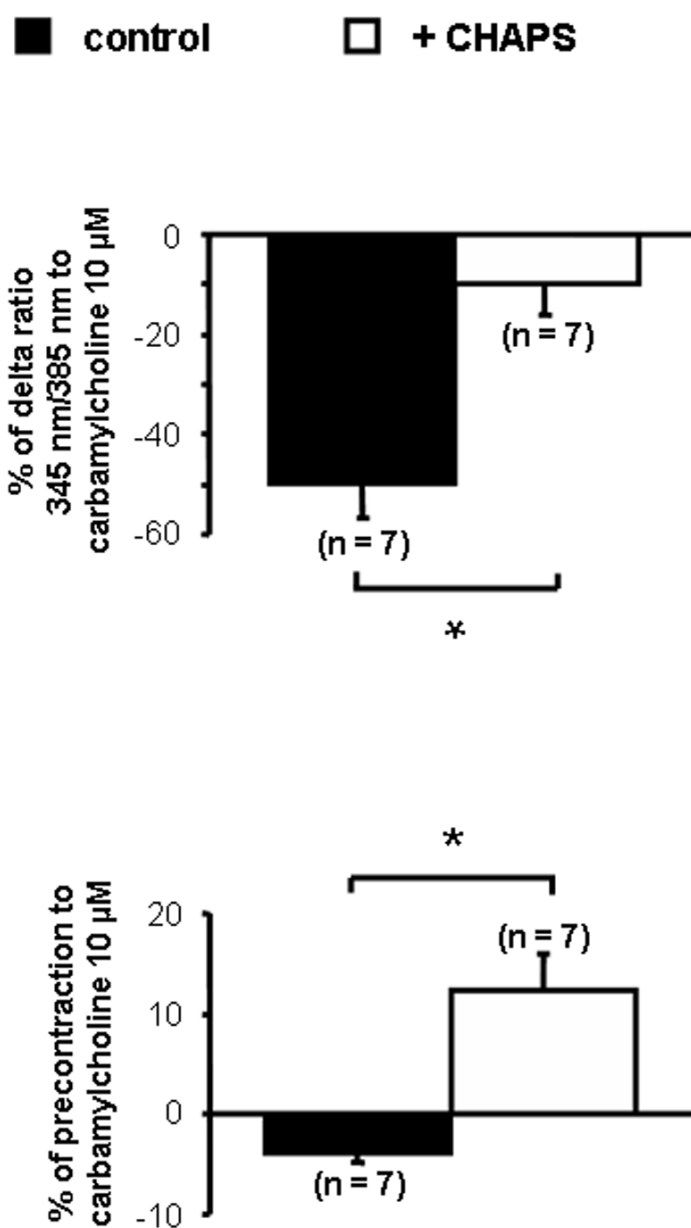


Figure S2

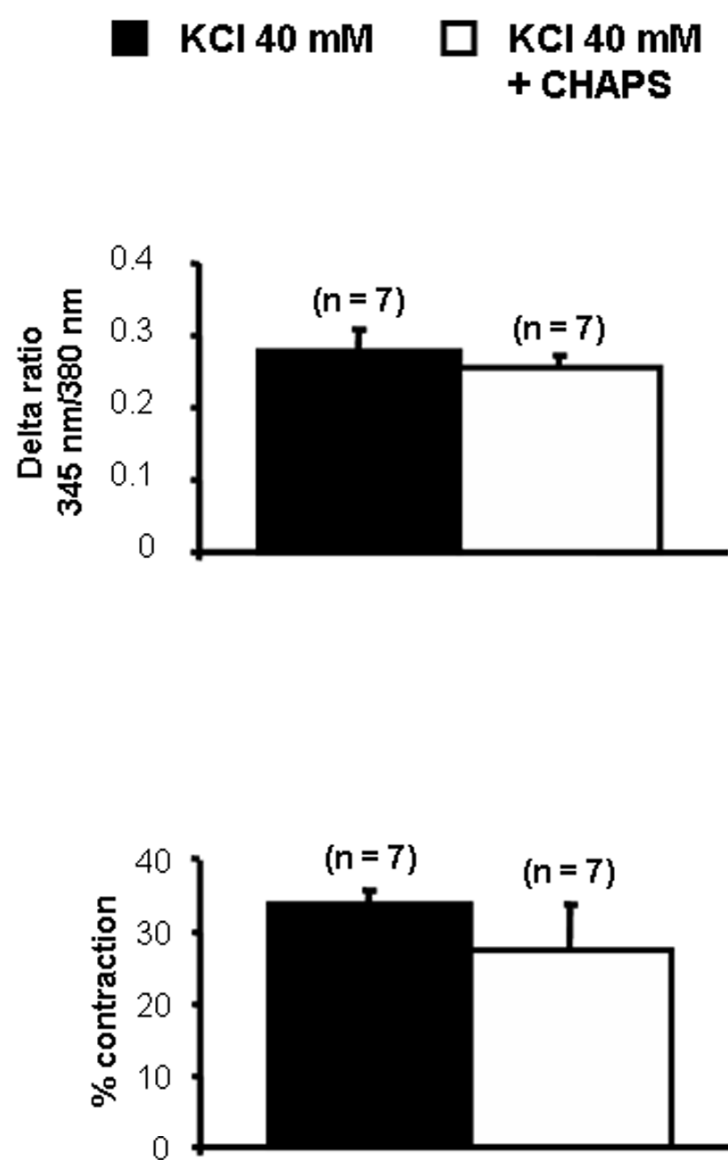


Figure S3

■ 5-HT 10 μ M □ 5-HT 10 μ M + ⁴⁰Gap 27

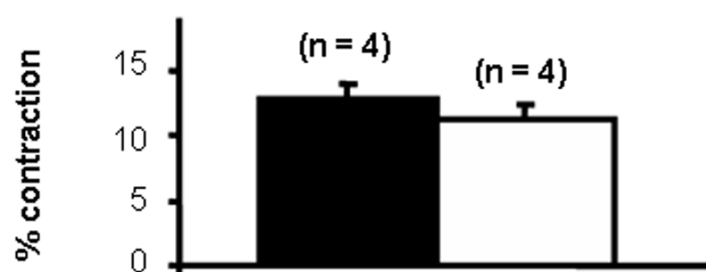
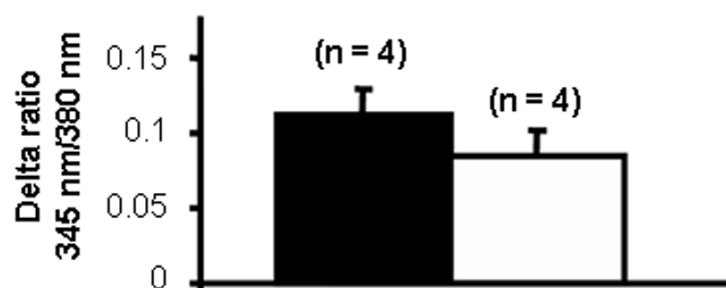


Figure S4

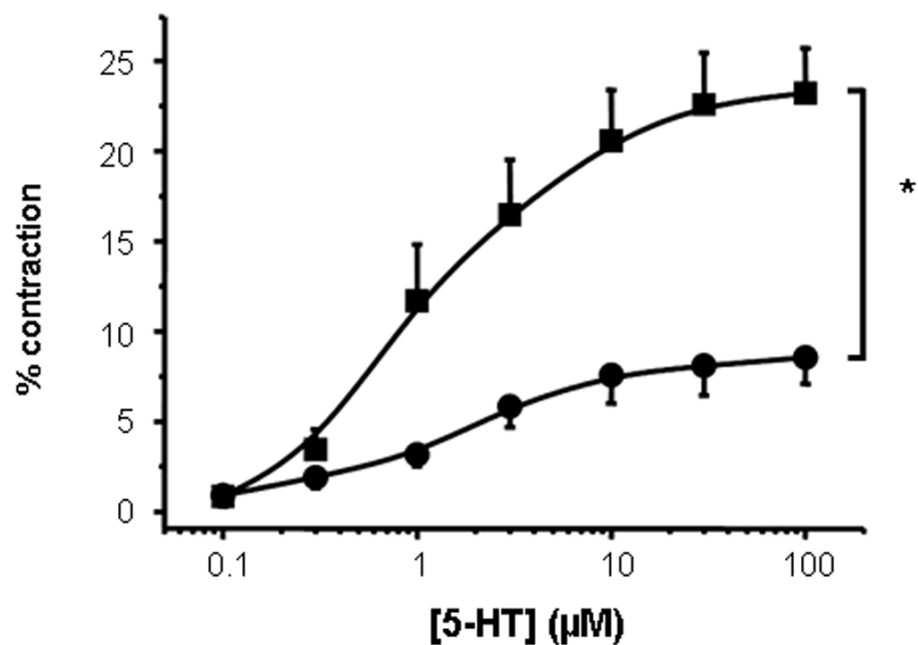
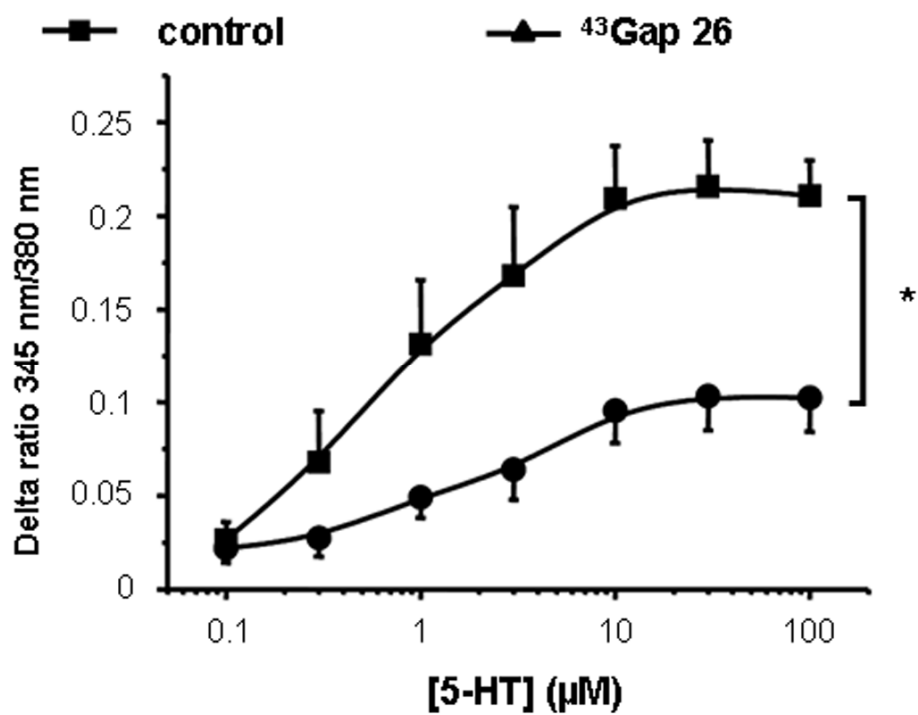


Figure S5

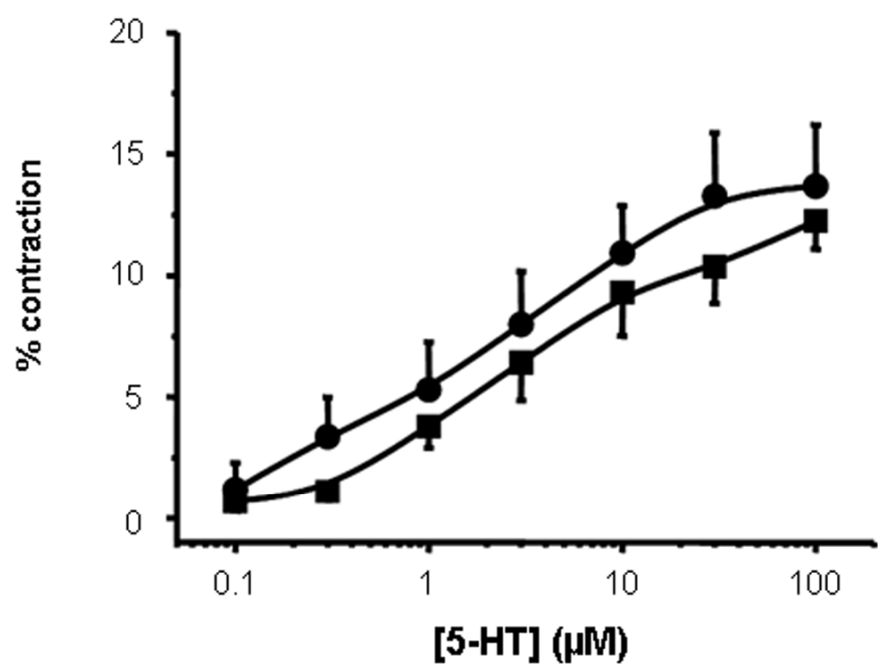
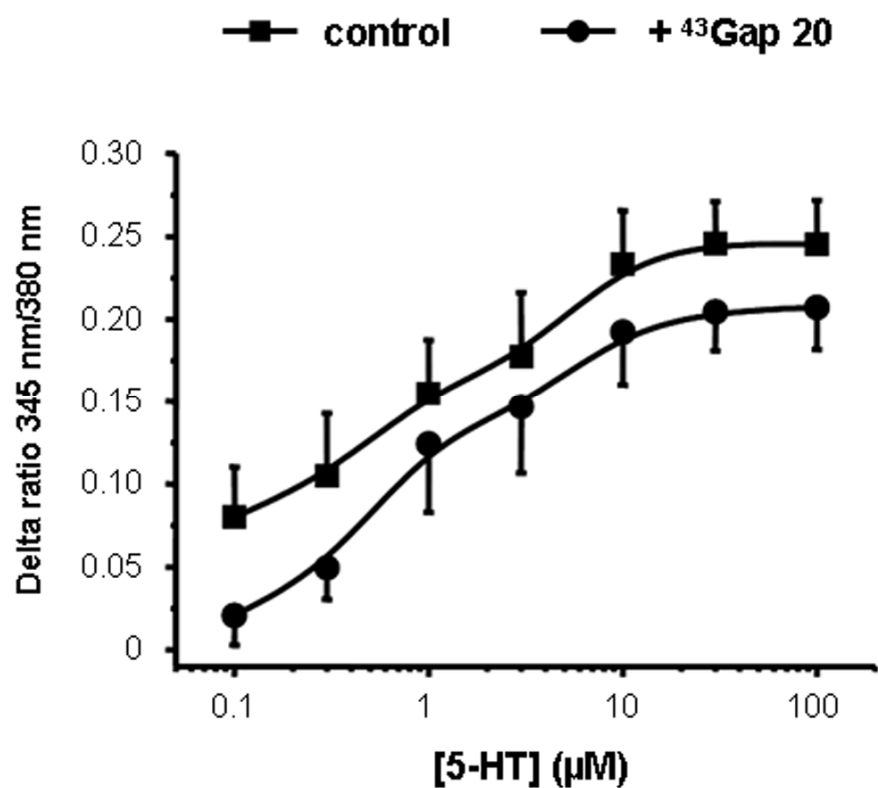


Figure S6

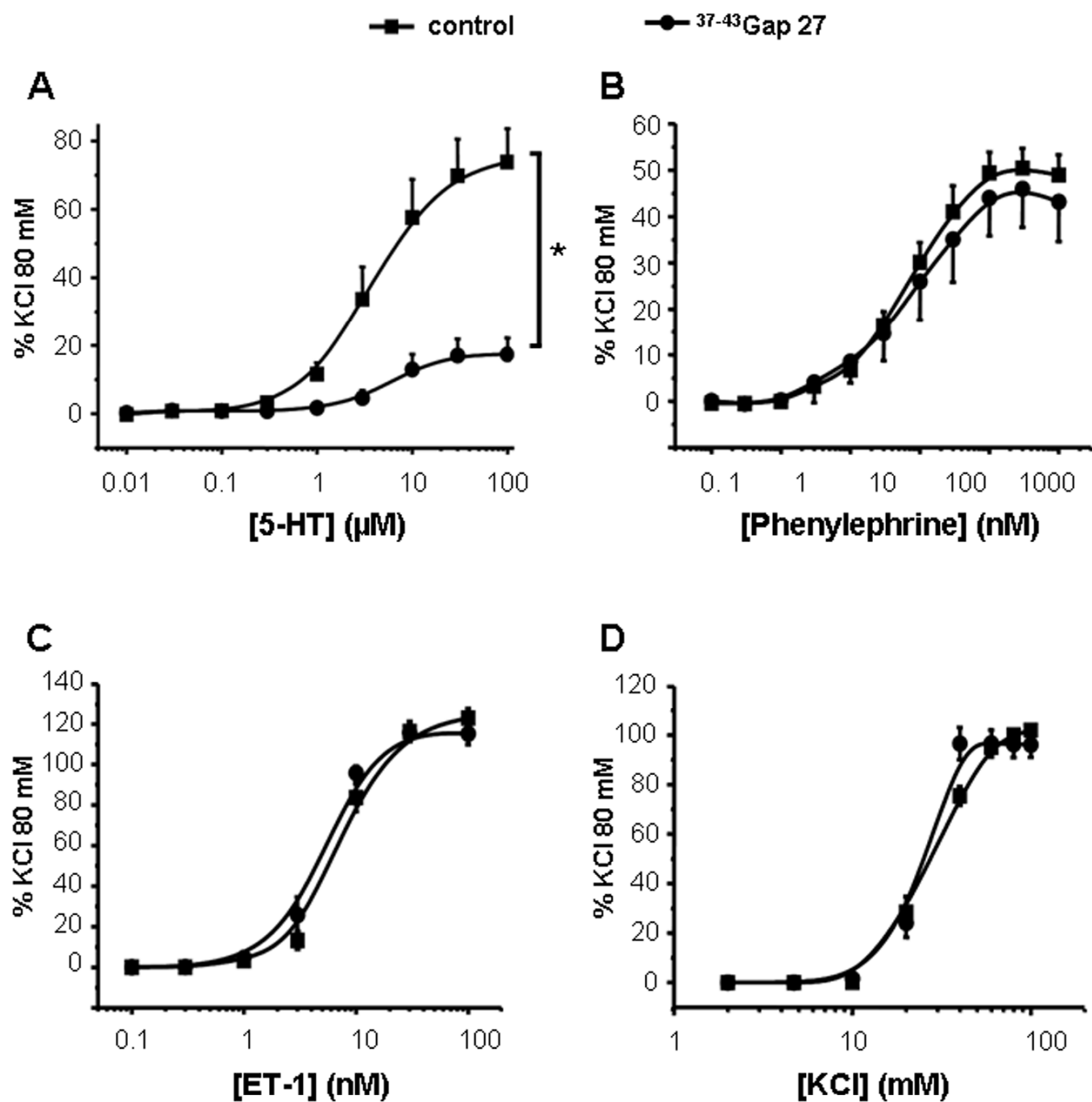


Figure S7

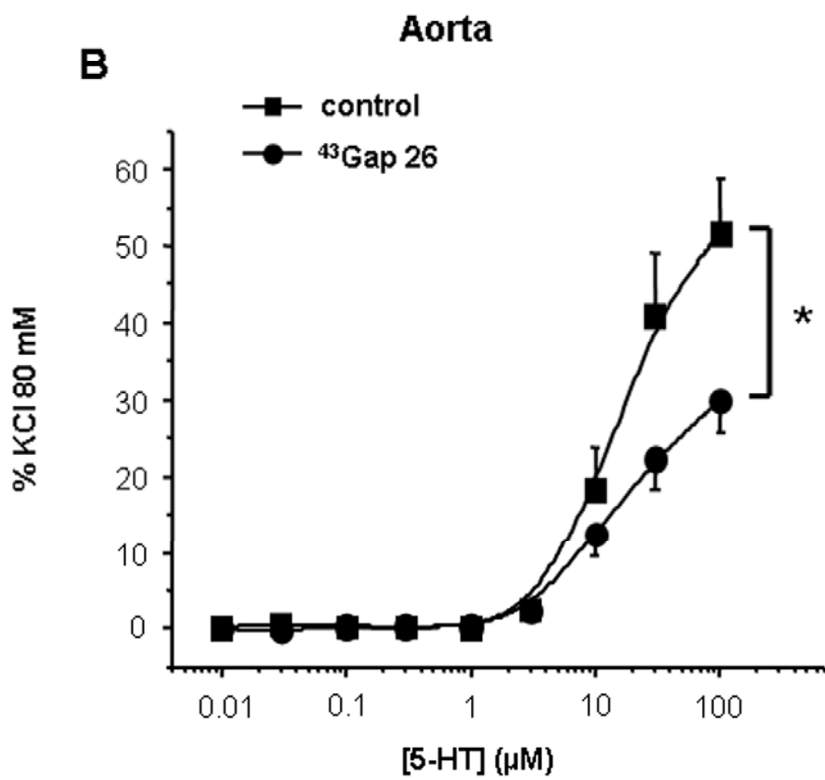
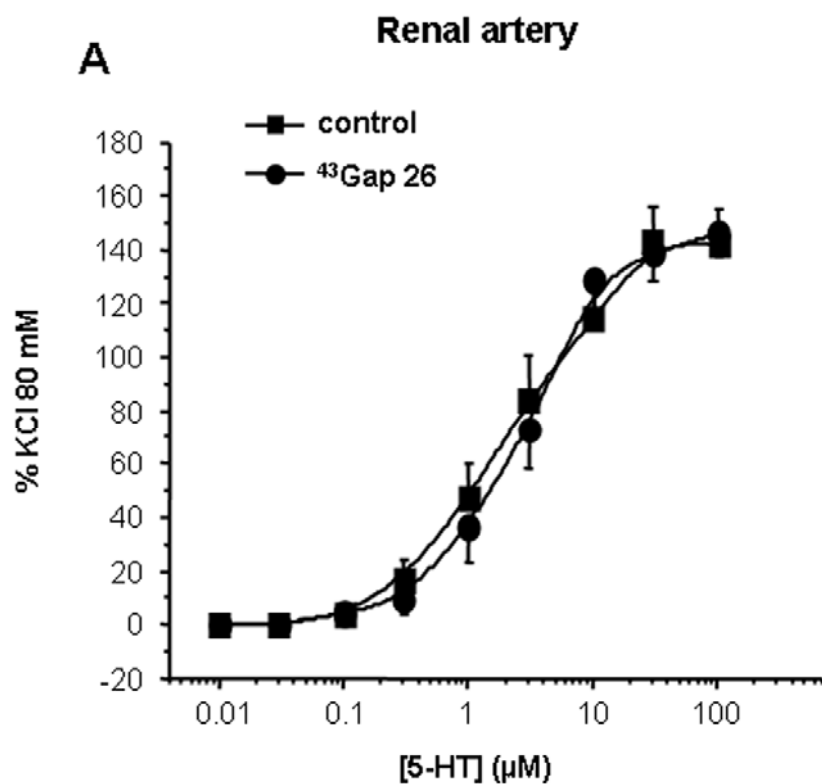


Figure S8

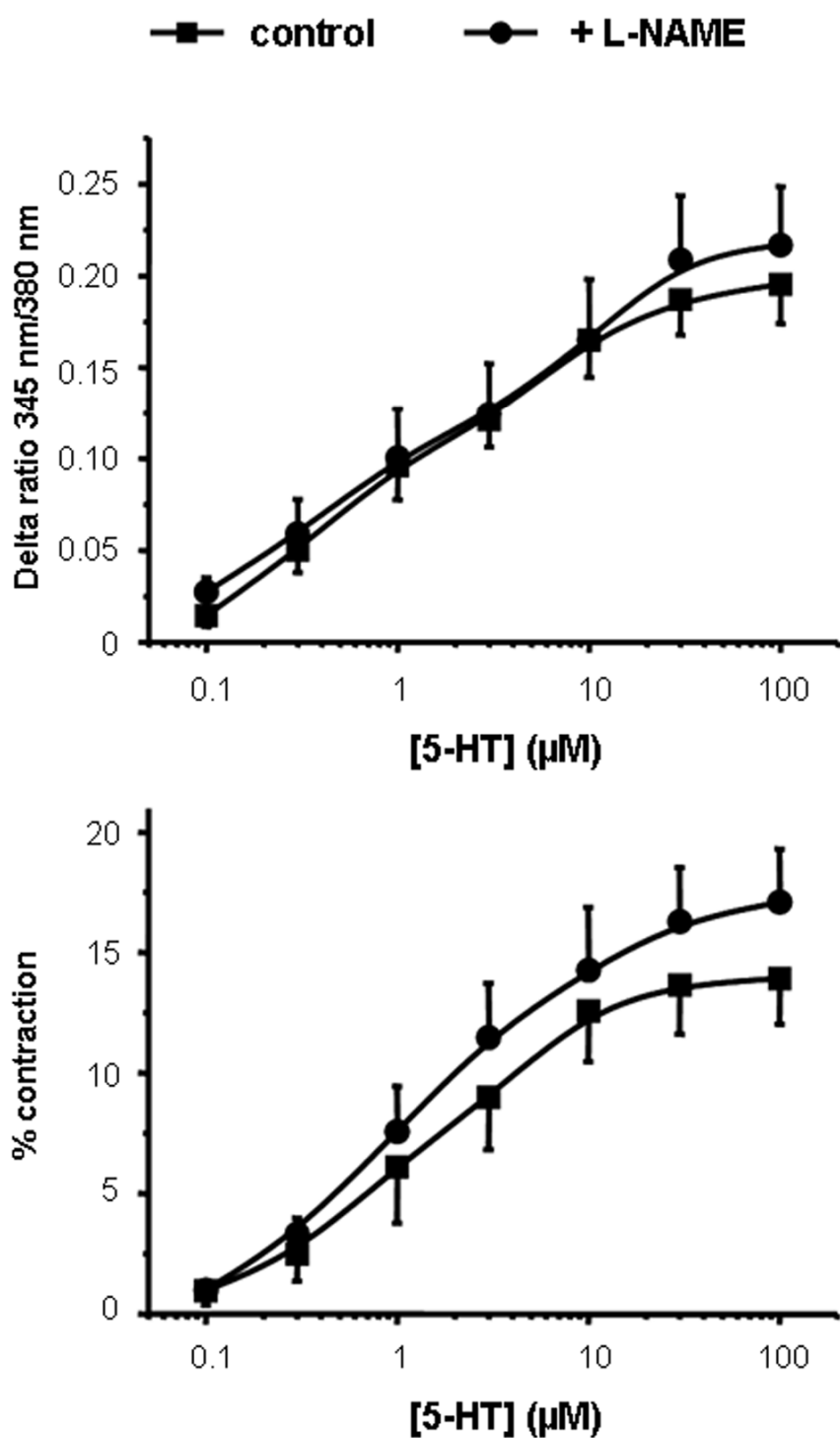


Figure S9

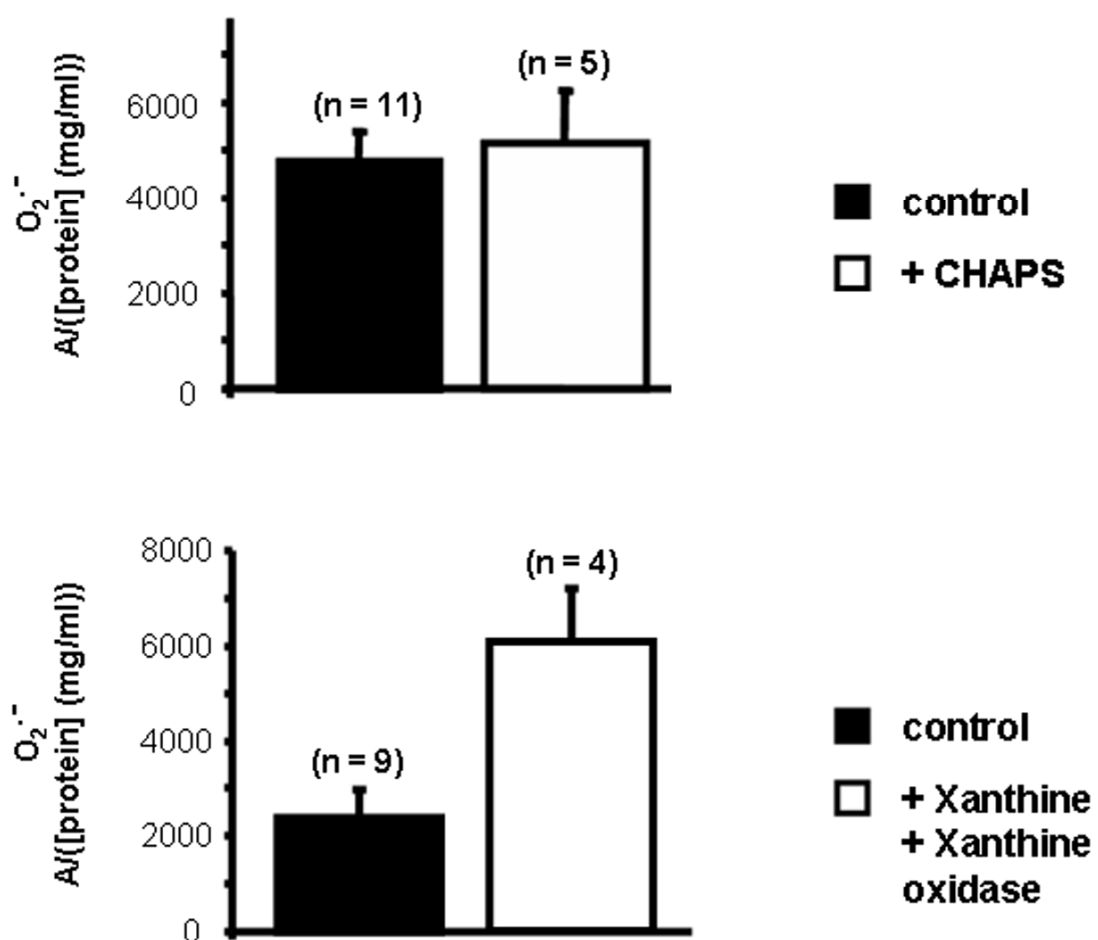


Figure S10

En conclusion, cette étude nous a permis d'établir le profil d'expression des connexines dans les AIP3 de rat. Les 3 isoformes de connexines sont présentes dans les AIP3. Les Cx 37, 40 et 43 sont localisées au niveau de l'endothélium et la Cx 40, et dans une moindre mesure la Cx 37, sont exprimées au niveau du muscle lisse. Cette étude a également permis de vérifier la fonctionnalité des jonctions myoendothéliales (JME) au niveau des AIP3.

D'autre part, ce travail a permis d'identifier les mécanismes impliquant les JME dans la contraction à la 5-HT. Les JME seraient en effet le siège d'une voie de signalisation permettant de réguler la balance de l'effet vasodilatateur induit par une stimulation des CE par la 5-HT face à l'effet vasoconstricteur induit par une stimulation des CML par la 5-HT. Sous l'influence de la 5-HT, les CML produisent de l' O_2^{\bullet} qui traverse les JME, principalement constituées de Cx 43, ce qui altère la relaxation dépendante du NO produite par la 5-HT au niveau des CE. Ainsi, ce processus permet à la 5-HT de maintenir un certain niveau de contraction.

De plus, nous avons montré que l'implication de la Cx 43 dans la contraction des AIP3 est dépendante de la stimulation appliquée. En effet, la Cx 43 intervient dans la contraction à la 5-HT, mais n'intervient pas dans les contractions induites par la phényléphrine, l'endothéline et par des solutions hyperpotassiques.

Enfin, ce travail montre également que la Cx 43 n'intervient pas toujours dans la contraction à la 5-HT en fonction du territoire vasculaire. Ainsi, chez le rat, la Cx 43 joue un rôle dans la contraction à la 5-HT des artères pulmonaires et de l'aorte, mais n'intervient pas dans la contraction à la 5-HT de l'artère rénale.

2. ÉTUDE CHEZ LA SOURIS

Après avoir détaillé le rôle des jonctions communicantes dans la réponse à la 5-HT au niveau des AIP3 de rat, nous avons recherché à vérifier ce modèle chez des souris contrôles et dans un modèle de souris déficientes en NO synthase endothéliale (eNOS). L'utilisation de la souris présente un intérêt certain puisqu'il existe des modèles de souris transgéniques où l'expression des connexines est modifiée.

Actuellement, aucune étude n'a été menée sur les jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire de souris. Nous avons donc tout d'abord recherché la présence de la voie de signalisation impliquant la Cx 43 dans la réponse à la 5-HT au niveau des artères intrapulmonaires de souris (diamètre interne 500 μ m).

Contrairement à ce que nous avons observé chez le rat, le ^{43}Gap 26 n'a pas d'effet sur la réponse contractile à la 5-HT au niveau des AIP de souris (Figure 43).

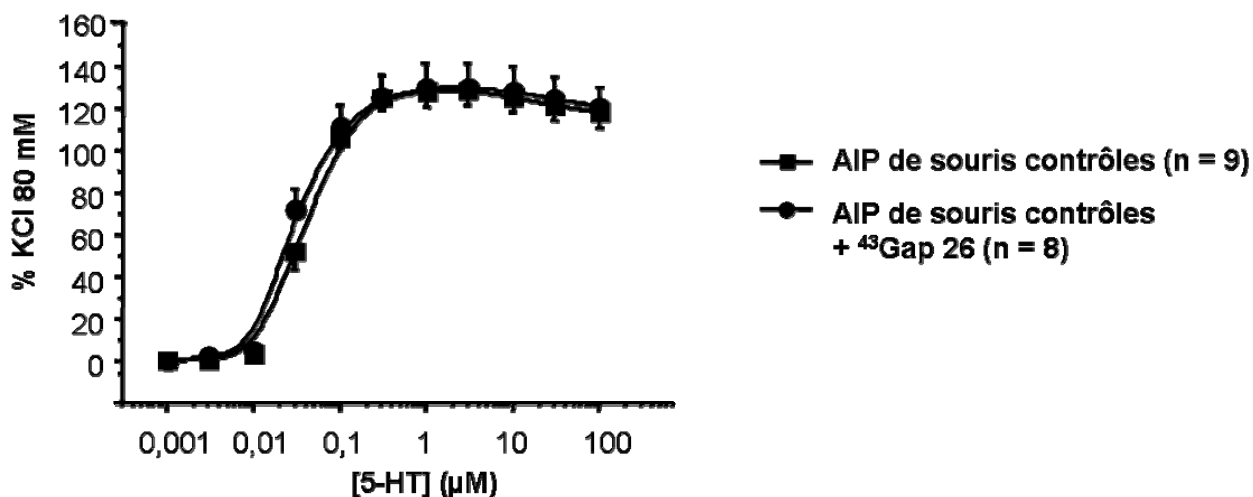


Figure 43 : effet du ⁴³Gap 26 sur la contraction à la 5-HT d'artères intrapulmonaires de souris contrôles.

CCRC à la 5-HT d'AIP de souris contrôles en absence (carrés noirs) ou en présence de ⁴³Gap 26 300 μM (ronds noirs).

De la même façon, le ⁴³Gap 26 n'a pas d'effet sur la réponse contractile à la 5-HT au niveau des AIP de souris déficientes en eNOS (Figure 44).

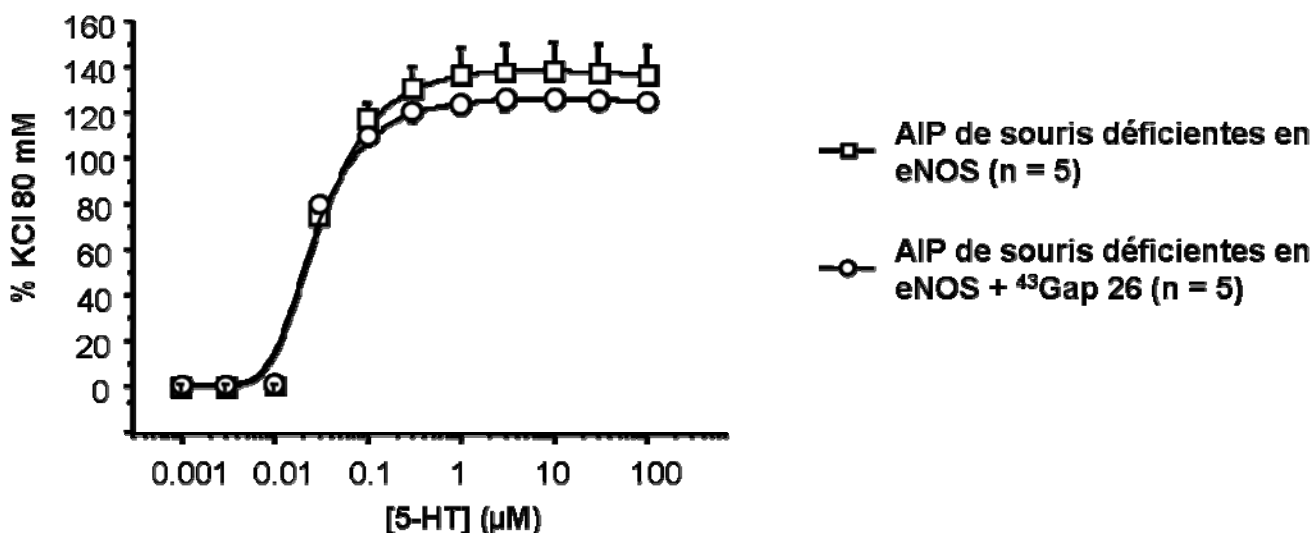


Figure 44 : effet du ⁴³Gap 26 sur la contraction à la 5-HT d'artères intrapulmonaires de souris déficientes en eNOS.

CCRC à la 5-HT d'AIP de souris déficientes en eNOS en absence (carrés blancs) ou en présence de ⁴³Gap 26 300 μM (ronds blancs).

D'autre part, la réponse contractile à la 5-HT est similaire entre les souris sauvages et les souris déficientes en eNOS (Figure 45).

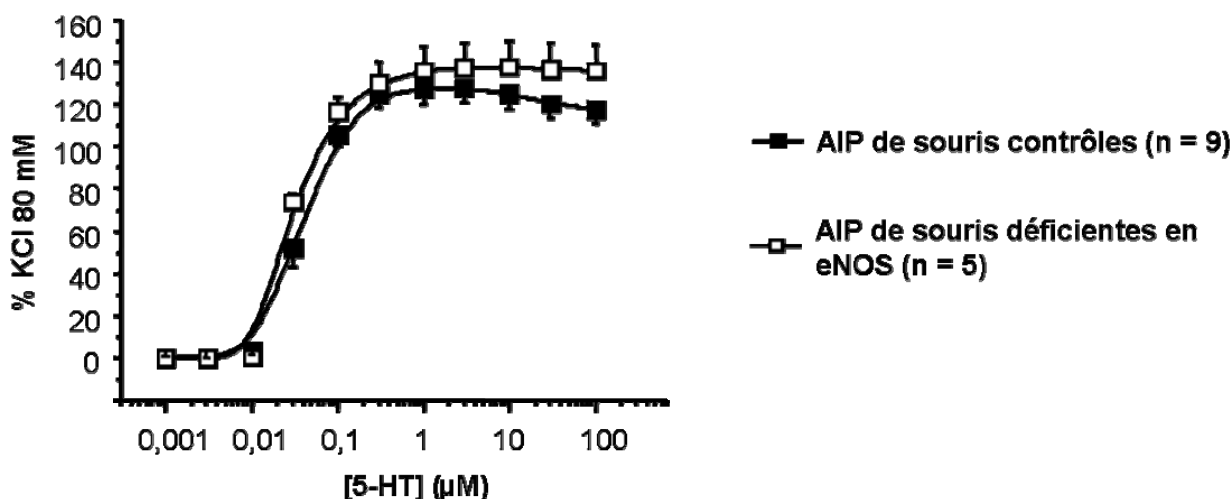


Figure 45 : réactivité à la 5-HT d'artères intrapulmonaires de souris contrôles (carrés noirs) et déficientes en eNOS (carrés blancs).

En conclusion, le mécanisme observé au niveau des AIP3 de rat n'a pas été mis en évidence dans la circulation pulmonaire de souris. Cependant, on ne peut pas exclure la présence d'un mécanisme similaire impliquant une autre connexine que la Cx 43.

3. ETUDE SUR DES CML EN CULTURE

Après avoir étudié les connexines 37, 40 et 43 dans la circulation pulmonaire de rat sur un modèle intégré (vaisseau entier), et dans la perspective d'approfondir cette étude à l'échelle cellulaire, nous avons recherché la présence des 3 isoformes de connexines (Cx 37, 40 et 43) par immunofluorescence sur des CML d'AIP3 de rat en culture.

Cette étude a été menée sur des CML en phénotype prolifératif (en présence de 10 % de sérum de veau foetal, SVF) et sur des CML en phénotype contractile (en absence de SVF, et en présence de 1% d'ITS). Les 3 isoformes de connexines ont été détectées au niveau des CML en culture en présence de SVF, et seules les Cx 40 et 43 sont exprimées par les CML en culture en absence de SVF (Figure 46). L'intensité du marquage semble plus important pour la 43 en phénotype prolifératif (+ SVF) par rapport au phénotype contractile (- SVF). En ce qui concerne la Cx 40, sa localisation est différente entre les deux conditions : le marquage est diffus en phénotype prolifératif alors qu'il est localisé au niveau du noyau des CML en phénotype contractile (Figure 46).

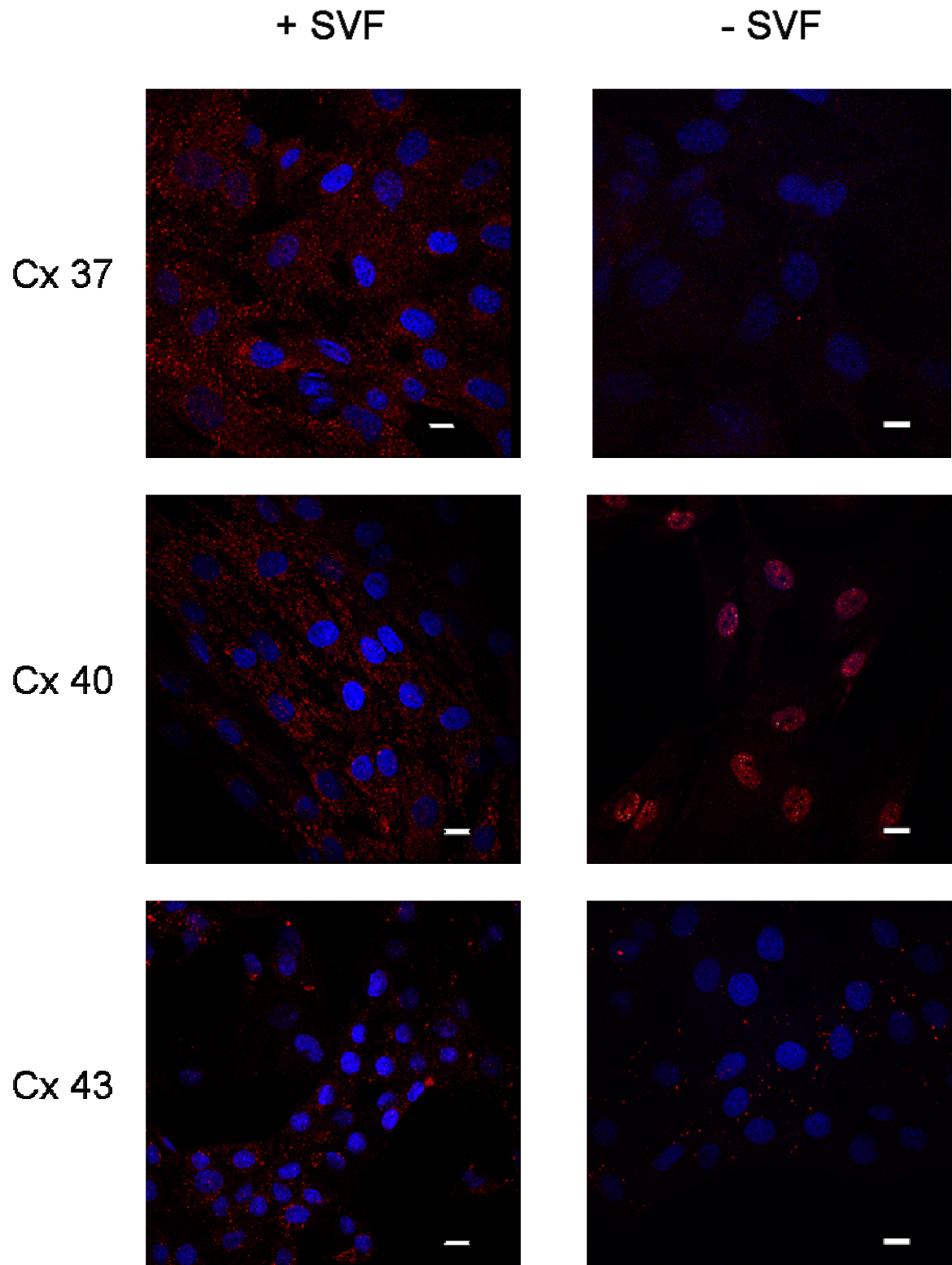


Figure 46 : expression des Cx 37, 40 et 43 au niveau de CML d'AIP3 de rat.

Images en microscopie confocale de CML d'AIP3 de rats contrôles en phénotype prolifératif (gauche, + SVF) et en phénotype contractile (droite, - SVF). Les Cx 37 (haut), 40 (milieu) et 43 (bas) sont détectées par immunofluorescence (rouge) ; les noyaux des cellules sont marqués au Hoechst (bleu). La barre représente une distance de 15 μ m.

4. CONCLUSION

Chez le rat contrôle, nous avons mis en évidence la présence des 3 isoformes de connexines au niveau des CE des AIP3, les Cx 37 et 40 sont, également, exprimées au niveau des CML. D'un point de vue fonctionnel, contrairement aux Cx 37 et 40, la Cx 43 intervient dans les réponses calciques et contractiles à la 5-HT des AIP3. De plus, nos résultats montrent que la 5-HT induit d'une part la production d'anion superoxyde au niveau des CML, et d'autre part, la production de NO au niveau des CE des AIP3 de rat. Le NO ayant des propriétés relaxantes, l'effet contractant de la 5-HT résulte alors en partie du piégeage du NO par l'anion superoxyde après que ce dernier ait traversé la JME composée principalement de Cx 43. Au final, l'ensemble des résultats met en évidence la présence d'une nouvelle voie modulant le contrôle du tonus vasculaire et faisant intervenir, entre autres, la Cx 43 présente au niveau de la JME, l'anion superoxyde au niveau du muscle lisse et le NO au niveau de l'endothélium.

Etudes des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire pathologique

Dans les AIP3 de rats contrôles, nous avons mis en évidence la présence et le rôle fonctionnel de la JME dans la vasoconstriction à la 5-HT. Les AIP3 (et plus généralement les petits vaisseaux intrapulmonaires) ainsi que la 5-HT étant particulièrement mises en jeu lors de l'HTAP, nous avons poursuivi notre étude sur deux modèles d'HTAP.

Dans un premier temps, nous avons comparé le profil d'expression des 3 isoformes de connexine au sein des AIP3 issues de rats contrôles, de rats atteints d'HTAP induite par 3 semaines d'hypoxie chronique (rats HC) et de rats atteints d'HTAP induite par injection de monocrotaline (rats MCT). Puis dans un deuxième temps, nous avons étudié le rôle des jonctions communicantes dans la vasoréactivité à différents agonistes dans ces deux modèles de rats.

1. PROFIL D'EXPRESSION DES CONNEXINES DANS LA CIRCULATION PULMONAIRE PATHOLOGIQUE

1.1. Etude de l'expression des Cx 37, 40 et 43

Comme dans le cas des rats contrôles, les ARN messagers des 3 isoformes de connexines ont été détectés dans les AIP3 des rats HC et MCT (Figure 47). L'expression des ARNm des Cx 37 et 40 n'est pas modifiée dans les AIP3 des deux modèles d'HTAP. Quant à la Cx 43, son niveau d'expression des ARNm n'est pas modifié dans les AIP3 de rats MCT, cependant, ce niveau est augmenté dans les AIP3 de rats HC (Figure 47).

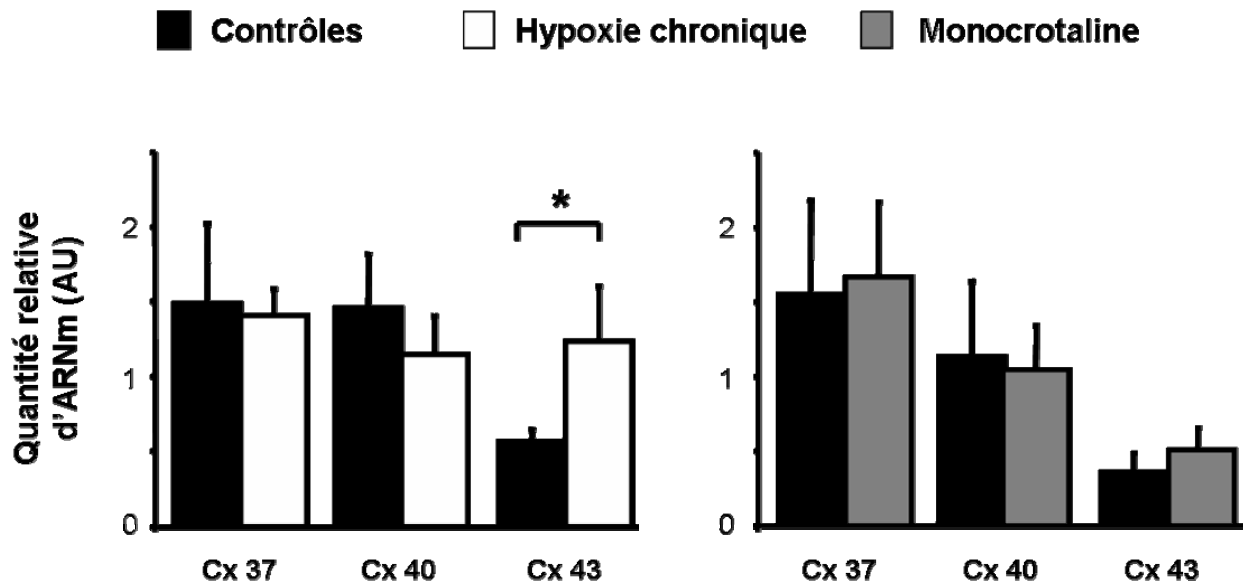


Figure 47 : expression des ARNm des Cx 37, 40 et 43 dans la circulation pulmonaire de rats sains, et de rats atteints d'HTAP.

Histogrammes représentant la quantité relative des ARNm des Cx 37, 40 et 43 exprimée au niveau des AIP3 de rats contrôles (noir, $n = 4-5$), de rats atteints d'HTAP hypoxique (blanc, $n = 9$) et de rats atteints d'HTAP induite par injection de MCT (gris, $n = 5-7$). La quantité relative des ARNm a été mesurée par RT-PCR en temps réel. Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport au contrôle avec $P < 0,05$.

Par la suite, nous avons étudié l'expression protéique des 3 isoformes de connexines. Les Cx 37, 40 et 43 ont été détectées dans les 3 conditions (contrôle, HC et MCT) (Figure 48). Seule la Cx 43 voit son expression augmentée dans les AIP3 de rats HC par rapport aux rats contrôles.

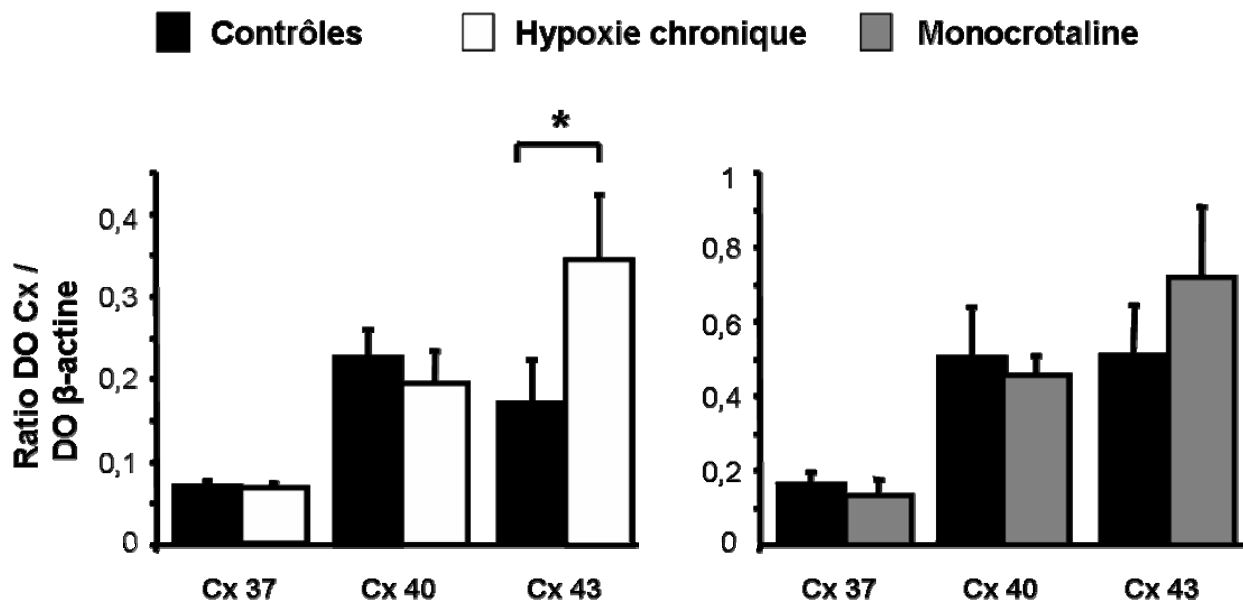


Figure 48 : expression des Cx 37, 40 et 43 dans la circulation pulmonaire de rats sains, et de rats atteints d'HTAP.

Histogrammes représentant le niveau d'expression des Cx 37, 40 et 43 rapporté au niveau d'expression de la β -actine mesurés dans les AIP3 de rats contrôles (noir, $n = 6-12$), de rats atteints d'HTAP hypoxique (blanc, $n = 9-12$) et de rats atteints d'HTAP induite par injection de MCT (gris, $n = 5-7$). La quantité relative des connexines a été mesurée par Western Blot. Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport au contrôle avec $P < 0,05$.

1.2. Etude de la localisation des Cx 37, 40 et 43

Le profil d'expression des Cx 37, 40 et 43 a été étudié par immunofluorescence sur des coupes transversales d'AIP3, de façon à comparer la localisation des connexines au sein de la paroi des AIP3 de rats contrôles, HC et MCT. Chez les rats contrôles, les 3 connexines sont exprimées au niveau des CE, et cette localisation n'est pas modifiée au niveau des AIP3 des rats HC et MCT. Cependant, des différences sont observées au niveau du muscle lisse : les Cx 37 et 40 sont exprimées en condition contrôle ainsi que chez les rats MCT, mais sont absentes des AIP3 issues des rats HC. La Cx 43, quant à elle, n'est pas exprimée au niveau du muscle lisse, quelle que soit la condition étudiée (figure 49).

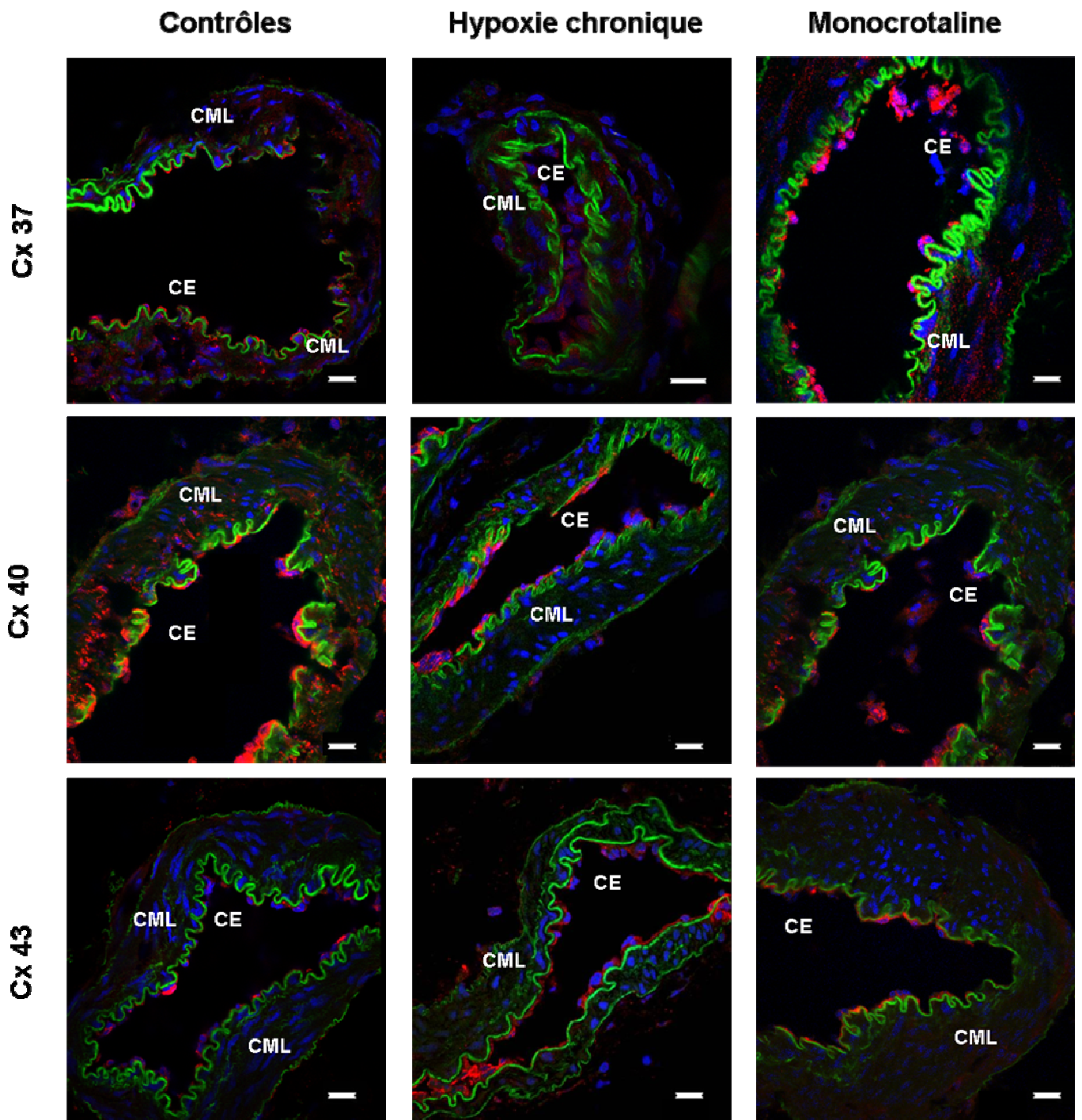


Figure 49 : localisation des Cx 37, 40 et 43 dans la paroi des AIP3 de rats contrôles, HC et MCT.

Images en microscopie confocale de coupes transversales d'AIP3 provenant de rats contrôles (gauche), de rats atteints d'HTAP hypoxique (milieu) et de rats atteints d'HTAP induite par injection de MCT (droite). Les Cx 37 (haut), 40 (milieu) et 43 (bas) sont détectées par immunofluorescence (rouge) ; la lamina élastique interne est autofluorescente (vert) et permet de délimiter les cellules musculaires lisses (CML) des cellules endothéliales (CE). Les noyaux des cellules sont marqués au Hoechst (bleu). La barre représente une distance de 15 μ m.

2. ROLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA REPONSE A LA 5-HT

2.1. Réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT

La réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats contrôles et de rats atteints d'HTAP a été comparée par mesure de la contraction isométrique (Figure 50). La 5-HT induit une contraction maximale significativement plus importante des AIP1 issues de rats HC ($E_{max} = 75,10 \pm 9,26$ % de la contraction au KCl 80 mM) et MCT ($E_{max} = 78,43 \pm 9,54$ % de la contraction au KCl 80 mM) par rapport aux AIP1 de rats contrôles ($E_{max} = 53,76 \pm 6,56$ % de la contraction au KCl 80 mM) (Tableau 10). De plus, l' EC_{50} des AIP1 de rats HC est significativement plus faible ($3,37 \pm 0,53$ μ M) que l' EC_{50} des AIP1 de rats contrôles ($17,13 \pm 5,64$ μ M) (Tableau 10). Ce résultat indique que les AIP1 de rats HC sont plus sensibles à la 5-HT que les AIP1 de rats contrôles.

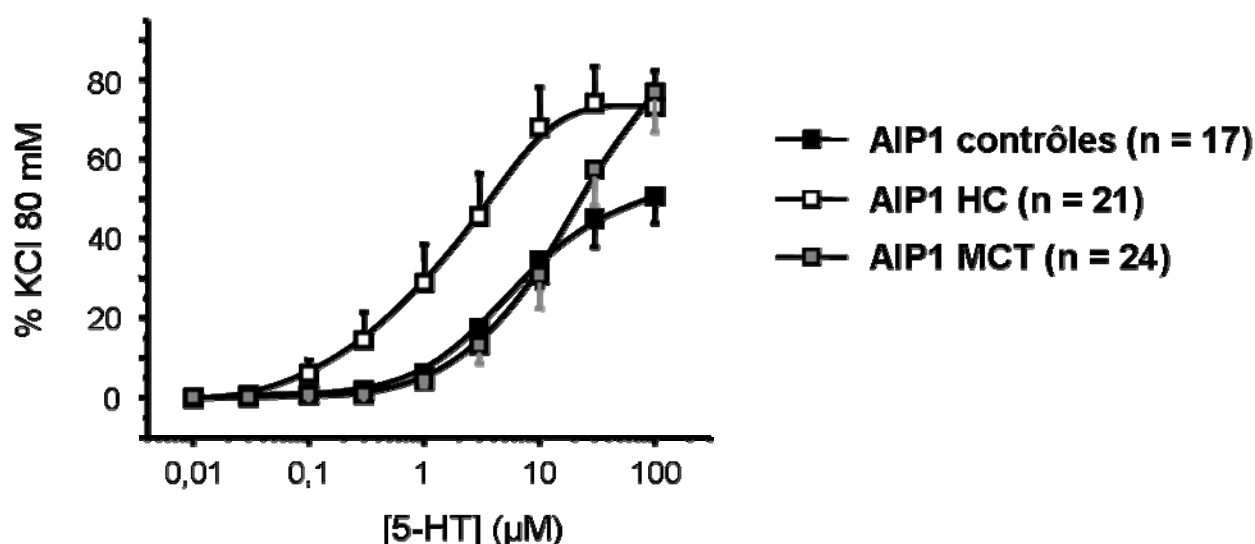


Figure 50 : réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.

CCRC à la 5-HT d'AIP1 provenant de rats contrôles (carrés noirs), de rats atteints d'HTAP hypoxique (AIP1 HC, carrés blancs) et de rats atteints d'HTAP induite par une injection de MCT (AIP1 MCT, carrés gris). Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart type de la moyenne.

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (μ M)		
	Contrôles	HC	MCT	Contrôles	HC	MCT
moyenne	53,76	75,10 *	78,43 *	17,13	3,37 *	18,10
s.e.m.	6,56	9,26	9,54	5,64	0,53	2,00

Tableau 10 : réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.

*La contraction maximale (Emax) est exprimée en % de la contraction en réponse à une solution hyperpotassique (80 mM). L'EC₅₀ correspond à la concentration en μM de 5-HT qui produit la moitié de la contraction maximale. s.e.m. = écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport au contrôle, avec $P < 0,05$.*

2.2. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT

Comme observé dans la première partie sur les AIP3 de rats contrôles, la 5-HT produit une contraction maximale significativement plus faible en présence de ³⁷⁻⁴³Gap 27 (Emax = $18,49 \pm 4,82$ % de la contraction au KCl 80 mM) par rapport à la contraction maximale en absence d'inhibiteur (Emax = $76,32 \pm 9,43$ % de la contraction au KCl 80 mM) (Tableau 11). Le ⁴⁰Gap 27 n'a aucun effet sur la réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats contrôles (Figure 51A et Tableau 11). Chez les rats HC, le ⁴⁰Gap 27 diminue significativement la réponse maximale des AIP1 à la 5-HT (Emax = $33,10 \pm 4,74$ % de la contraction au KCl 80 mM en présence de ⁴⁰Gap 27 ; Emax = $57,16 \pm 5,36$ % de la contraction au KCl 80 mM en absence de ⁴⁰Gap 27) (Tableau 11). Le ³⁷⁻⁴³Gap 27 n'a aucun effet sur la réactivité à la 5-HT des AIP1 de rats HC (Figure 51B et Tableau 11). Au niveau des rats MCT, le ³⁷⁻⁴³Gap 27 ainsi que le ⁴⁰Gap 27 diminuent la réactivité des AIP1 à la 5-HT (Figure 51C et Tableau 11).

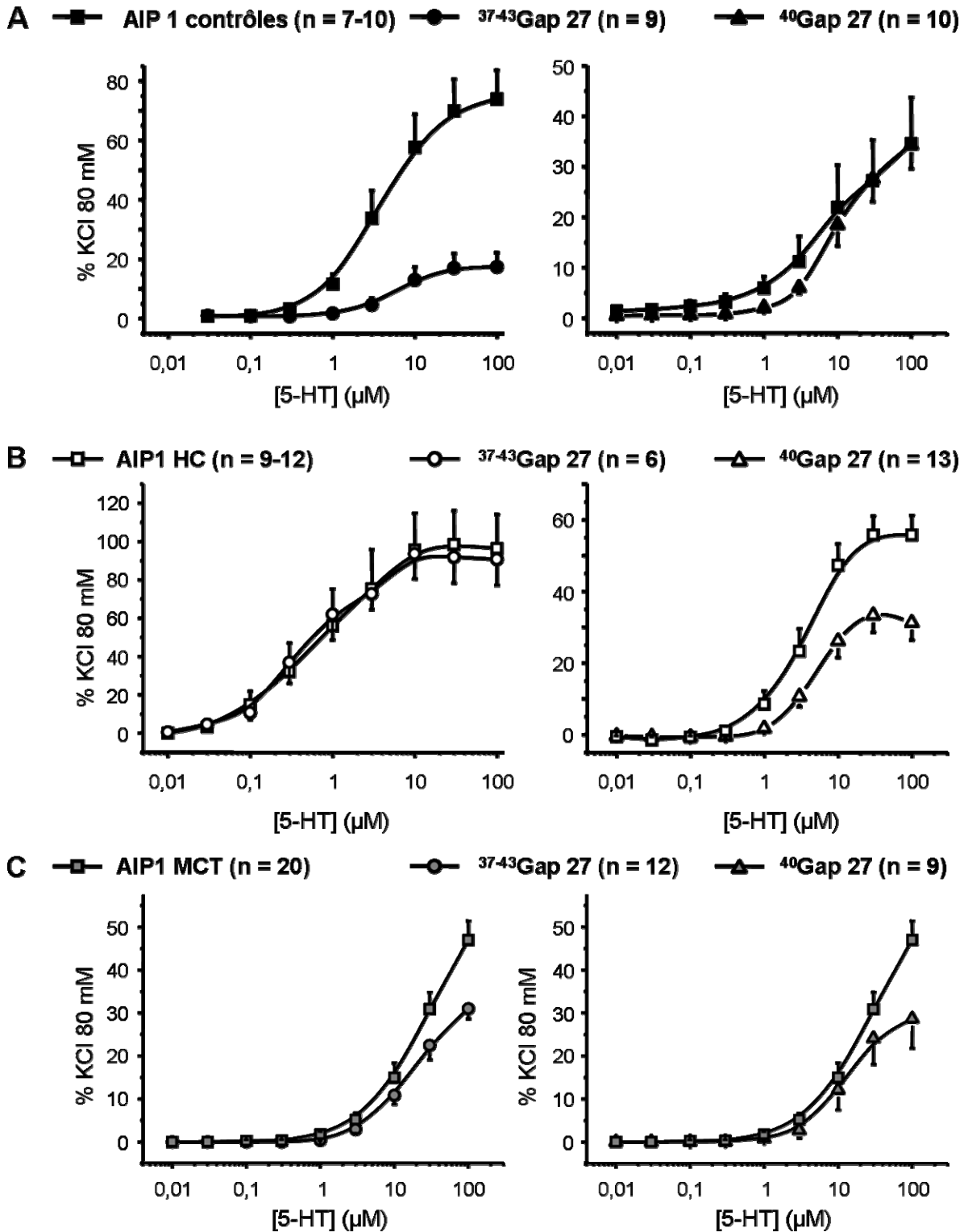


Figure 51 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la contraction à la 5-HT des AIP1 de rat contrôles, HC et MCT.

CCRC à la 5-HT d'AIP1 provenant de rats contrôles (A), de rats atteints d'HTAP hypoxique (B) et de rats atteints d'HTAP induite par une injection de MCT (C). L'effet du ³⁷⁻⁴³Gap 27 (ronds) et du ⁴⁰Gap 27 (triangles) a été étudié sur les CCRC à la 5-HT. Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart type de la moyenne.

	Emax (% KCl 80 mM)				EC ₅₀ (µM)			
	contrôles	³⁷⁻⁴³ Gap 27	contrôles	⁴⁰ Gap 27	contrôles	³⁷⁻⁴³ Gap 27	contrôles	⁴⁰ Gap 27
moyenne	76,32	18,49 *	37,97	35,36	8,87	7,14	22,90	20,29
s.e.m.	9,43	4,82	4,63	8,28	4,41	1,59	8,84	9,76

	Emax (% KCl 80 mM)				EC ₅₀ (µM)			
	HC	³⁷⁻⁴³ Gap 27	HC	⁴⁰ Gap 27	HC	³⁷⁻⁴³ Gap 27	HC	⁴⁰ Gap 27
moyenne	99,01	83,56	57,16	33,10 *	1,60	0,73	4,70	6,30
s.e.m.	17,96	11,30	5,36	4,74	0,49	0,18	0,63	1,26

	Emax (% KCl 80 mM)				EC ₅₀ (µM)			
	MCT	³⁷⁻⁴³ Gap 27	MCT	⁴⁰ Gap 27	MCT	³⁷⁻⁴³ Gap 27	MCT	⁴⁰ Gap 27
moyenne	52,48	31,84 *	52,48	27,25 *	25,16	18,62	25,16	13,90
s.e.m.	5,29	2,60	5,29	6,61	3,33	3,71	3,33	3,91

Tableau 11 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la réactivité à la 5-HT.

*La contraction maximale (Emax) est exprimée en % de la contraction en réponse à une solution hyperpotassique (80 mM). L'EC₅₀ correspond à la concentration en µM de 5-HT qui produit la moitié de la contraction maximale. s.e.m. = écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport à la condition sans inhibiteur de jonctions communicantes (contrôles, HC ou MCT), avec P < 0,05.*

3. ROLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA REACTIVITE A L'ENDOTHELIN-1

3.1. Réactivité à l'endothéline-1 des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT

De la même façon que la 5-HT, l'endothéline-1 (ET-1) contribue à la vasoconstriction et au remodelage des artères pulmonaires, deux processus caractéristiques de l'HTAP. De plus, il a été montré chez l'homme une élévation de l'ET-1 plasmatique chez les sujets atteints d'HTAP. Nous avons donc étudié la réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT (Figure 52).

L'ET-1 induit une contraction importante des AIP1 issues de rats contrôles et de rats HC et une contraction plus faible des AIP1 de rats MCT (Figure 52). Cependant, les AIP1 de rats HC répondent de façon significativement moins importante à l'ET-1 (Emax = 102,77 ± 8,45 %

de la contraction au KCl 80 mM) par rapport au contrôle ($E_{max} = 129,10 \pm 5,19$ % de la contraction au KCl 80 mM). L'ET-1 induit une contraction maximale significativement plus faible des AIP1 de rats MCT ($E_{max} = 28,99 \pm 7,03$ % de la contraction au KCl 80 mM) (Tableau 12).

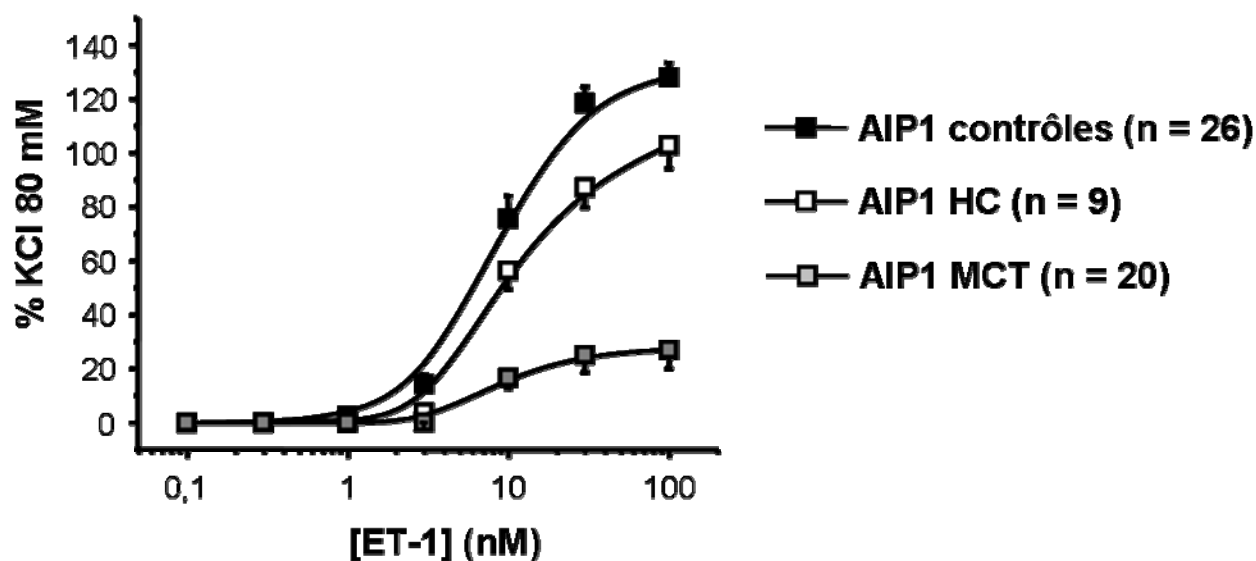


Figure 52 : réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles, MCT et HC.

CCRC à l'ET-1 d'AIP1 provenant de rats contrôles (carrés noirs), de rats atteints d'HTAP hypoxique (AIP1 HC, carrés blancs) et de rats atteints d'HTAP induite par une injection de MCT (AIP1 MCT, carrés gris). Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart type de la moyenne.

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (nM)		
	Contrôles	HC	MCT	Contrôles	HC	MCT
moyenne	129,10	102,77 *	28,99 *	11,84	10,98	12,32
s.e.m.	5,19	8,45	7,03	1,64	1,54	1,65

Tableau 12 : réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.

La contraction maximale (E_{max}) est exprimée en % de la contraction en réponse à une solution hyperpotassique (80 mM). L' EC_{50} correspond à la concentration en nM d'ET-1 qui produit la moitié de la contraction maximale. s.e.m. = écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport au contrôle, avec $P < 0,05$.

3.2. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT

Les inhibiteurs des jonctions communicantes $^{37-43}$ Gap 27 et 40 Gap 27 n'ont aucun effet sur la réponse à l'ET-1 que ce soit au niveau des AIP1 de rats contrôles, de rats HC et de rats MCT (Figure 53A, B et C, tableau 13).

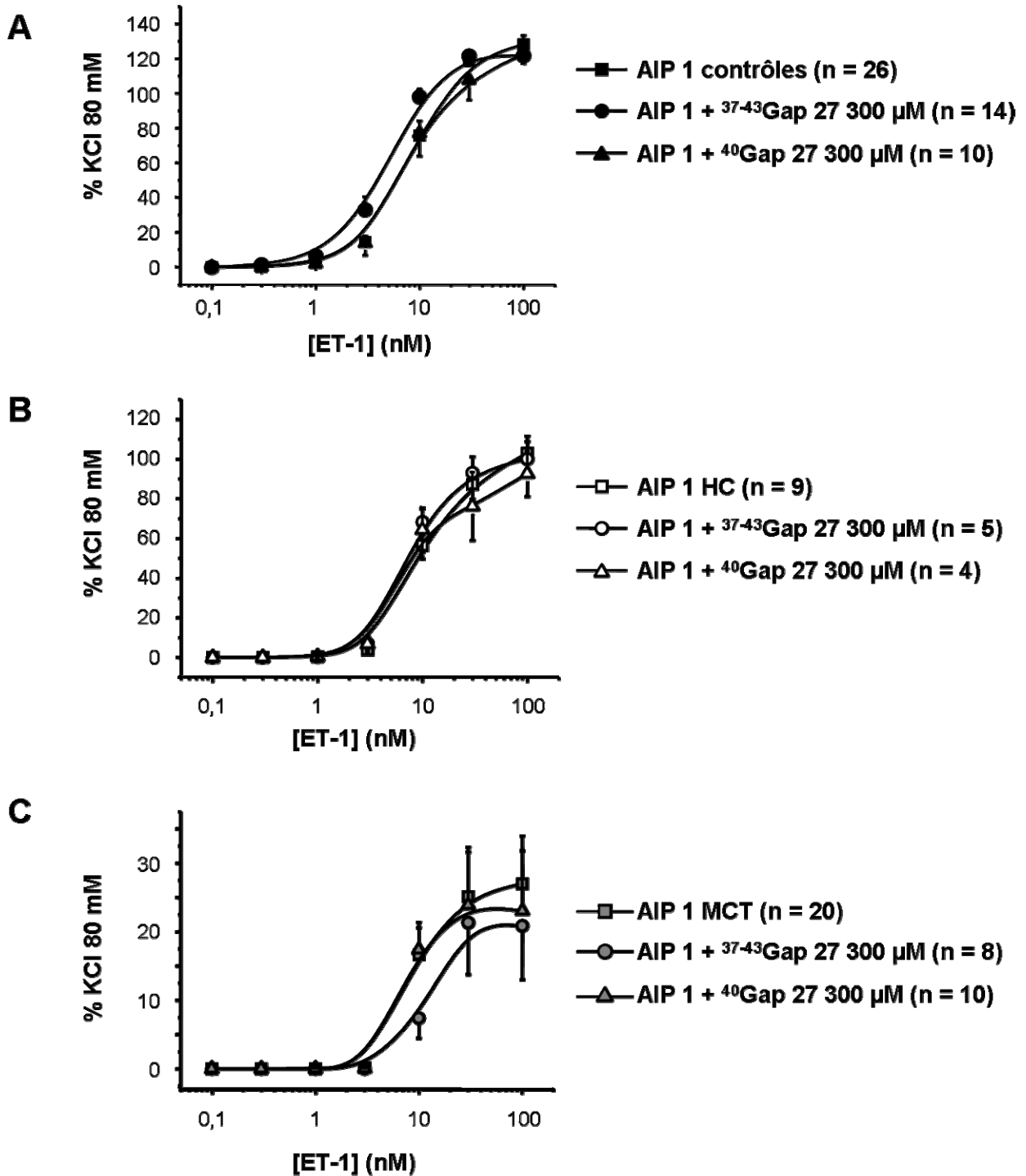


Figure 53 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la contraction à l'ET-1 des AIP1 de rat contrôles, HC et MCT.

CCRC à l'ET-1 d'AIP1 provenant de rats contrôles (A), de rats atteints d'HTAP hypoxique (B) et de rats atteints d'HTAP induite par une injection de MCT (C). L'effet du ³⁷⁻⁴³Gap 27 (ronds) et du ⁴⁰Gap 27 (triangles) a été étudié sur les CCRC à l'ET-1. Chaque valeur représente une valeur moyenne ± écart type de la moyenne.

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (nM)		
	contrôles	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27	contrôles	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27
moyenne	129,10	123,86	123,02	11,84	5,63	12,10
s.e.m.	5,19	3,94	5,73	1,64	0,61	3,75

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (nM)		
	HC	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27	HC	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27
moyenne	102,77	99,96	91,77	10,98	8,27	10,64
s.e.m.	8,45	8,91	11,14	1,54	0,85	3,18

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (nM)		
	MCT	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27	MCT	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27
moyenne	28,99	16,71	24,09	12,32	5,68	6,79
s.e.m.	7,03	5,00	8,59	1,65	0,83	0,93

Tableau 13 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.

La contraction maximale (Emax) est exprimée en % de la contraction en réponse à une solution hyperpotassique (80 mM). L'EC₅₀ correspond à la concentration d'ET-1 en nM qui produit la moitié de l'effet maximal (Emax). s.e.m. = écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport à la condition sans inhibiteur de jonctions communicantes (contrôles, HC ou MCT), avec $P < 0,05$.

4. ROLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA REACTIVITE A LA PHENYLEPHRINE

4.1. Réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT

Après avoir étudié la réactivité à la 5-HT et à l'ET-1 des AIP1 issues de rats sains et de rats atteints d'HTAP, nous avons comparé la réactivité de ces vaisseaux à un 3ème agoniste vasoconstricteur : la phényléphrine.

La phényléphrine induit une contraction des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT (Figure 54). Il n'y a pas de différence entre la contraction maximale des AIP1 issues de rats HC et MCT par rapport aux AIP1 de rats contrôles. Cependant, $0,18 \pm 0,18 \mu\text{M}$ de phényléphrine sont nécessaires pour produire la moitié de la contraction maximale des AIP1 de rats contrôles, alors que seulement $0,10 \pm 0,08 \mu\text{M}$ et $0,0028 \pm 0,0006 \mu\text{M}$ produisent la moitié de la contraction maximale des AIP1 de rats HC et MCT respectivement (Figure 54 et tableau 14). Les AIP1 de rats HC et MCT sont ainsi significativement plus sensibles à la phényléphrine que les AIP1 de rats contrôles.

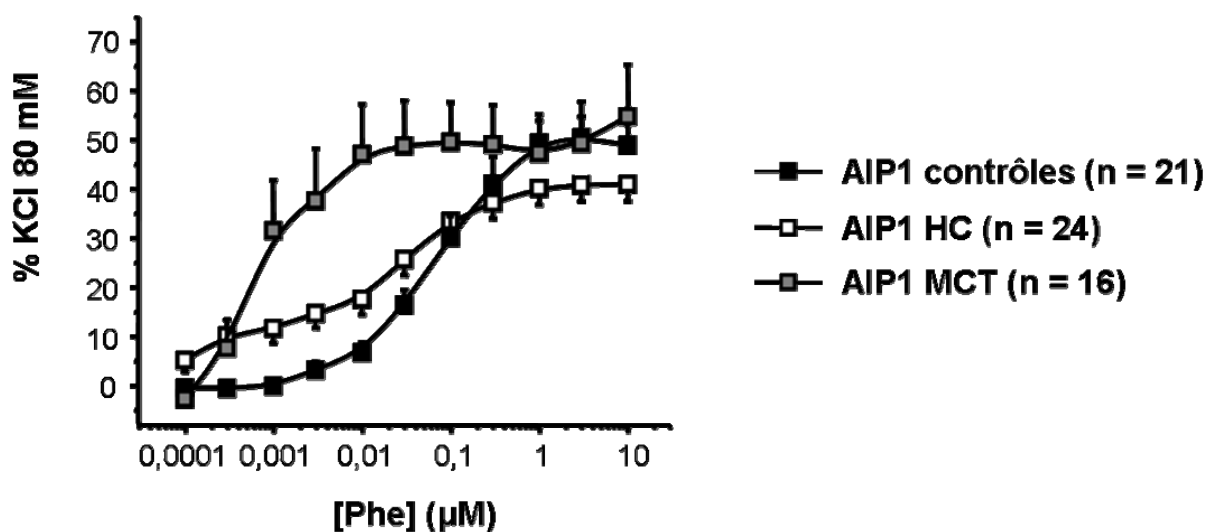


Figure 54 : réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles, MCT et HC.

CCRC à la phényléphrine (Phe) d'AIP1 provenant de rats contrôles (carrés noirs), de rats atteints d'HTAP hypoxique (AIP1 HC, carrés blancs) et de rats atteints d'HTAP induite par une injection de MCT (AIP1 MCT, carrés gris). Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart type de la moyenne.

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (nM)		
	Contrôles	HC	MCT	Contrôles	HC	MCT
moyenne	51,11	45,90	53,03	0,18	0,10 *	0,0028 *
s.e.m.	4,40	3,83	8,58	0,07	0,08	0,0006

Tableau 14 : réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.

La contraction maximale (Emax) est exprimée en % de la contraction en réponse à une solution hyperpotassique (80 mM). L'EC₅₀ correspond à la concentration de phényléphrine en μM qui produit la moitié de la contraction maximale. s.e.m. = écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport au contrôle, avec $P < 0,05$.

4.2. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles et HC

Les inhibiteurs des jonctions communicantes $^{37-43}\text{Gap 27}$ et $^{40}\text{Gap 27}$ n'ont aucun effet sur la réponse contractile à la phényléphrine au niveau des AIP1 de rats contrôles (Figure 55A). Cependant, ils diminuent tous deux la contraction maximale à la phényléphrine des AIP1 de rats HC (Figure 55B et tableau 15).

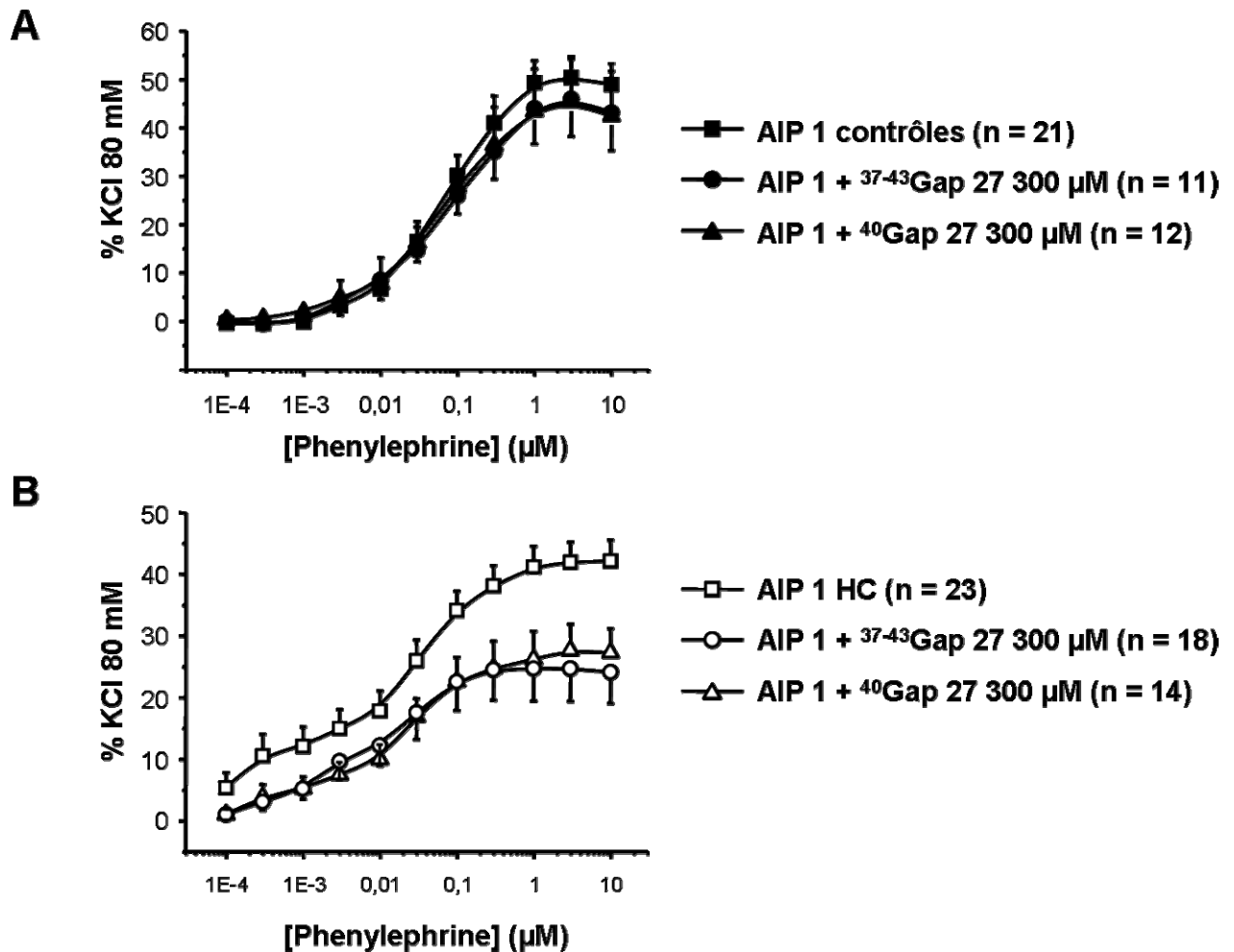


Figure 55 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la contraction à la phényléphrine des AIP1 de rat contrôles, HC.

CCRC à la phényléphrine (Phe) d'AIP1 provenant de rats contrôles (A), de rats atteints d'HTAP hypoxique (B). L'effet du $^{37-43}\text{Gap 27}$ (ronds) et du $^{40}\text{Gap 27}$ (triangles) a été étudié sur les CCRC à la phényléphrine. Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart type de la moyenne.

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (µM)		
	contrôles	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27	contrôles	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27
moyenne	51,11	0,18	40,61	45,78	0,24	0,26
se	4,40	0,07	7,81	7,54	0,09	0,11

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (µM)		
	HC	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27	HC	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27
moyenne	45,90	26,65 *	29,10 *	0,10	0,05	0,13
se	3,83	5,16	3,95	0,08	0,02	0,11

Tableau 15 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la réactivité à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles et HC.

La contraction maximale (Emax) est exprimée en % de la contraction en réponse à une solution hyperpotassique (80 mM). L'EC₅₀ correspond à la concentration, en µM, de phényléphrine qui produit la moitié de l'effet maximal (Emax). s.e.m. = écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport à la condition sans inhibiteur de jonctions communicantes (contrôles, HC ou MCT), avec $P < 0,05$.

5. ROLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA REACTIVITE A DES SOLUTIONS HYPERPOTASSIQUES

5.1. Réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT

Après avoir étudié la réactivité des AIP1 de rats sains et atteints d'HTAP à 3 agonistes vasoconstricteurs, nous nous sommes intéressés à la réactivité de ces vaisseaux en réponse à la dépolarisation. Nous avons pour cela mesuré la réponse contractile des AIP1 stimulées par des solutions hyperpotassiques.

Les solutions hyperpotassiques produisent une contraction des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT (Figure 56). Les AIP1 de rats MCT répondent de façon moins importante aux solutions hyperpotassiques. En effet, la contraction maximale est de $85,16 \pm 12,96$ % de la contraction au KCl 80 mM pour les AIP1 de rats MCT, alors que pour les AIP1 de rats contrôles elle s'élève à $102,42 \pm 0,94$ % de la contraction au KCl 80 mM (tableau 16). D'autre part, l'EC₅₀ des AIP1 contrôles est de $27,17 \pm 1,58$ mM, et elle est significativement plus faible pour les

AIP1 de rats HC ($15,04 \pm 1,10$ mM) (tableau 16). Ainsi, les AIP1 issues de rats HC sont plus sensibles aux solutions hyperpotassiques par rapport aux AIP1 de rats contrôles.

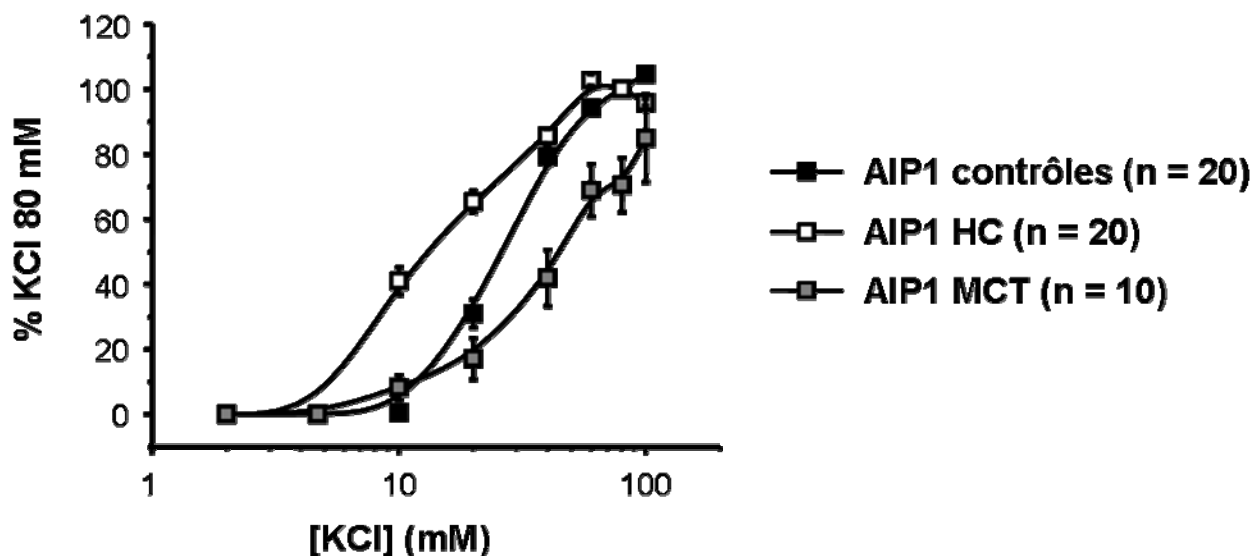


Figure 56 : réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, MCT et HC.

CCRC à des solutions hyperpotassiques (KCl) d'AIP1 provenant de rats contrôles (carrés noirs), de rats atteints d'HTAP hypoxique (AIP1 HC, carrés blancs) et de rats atteints d'HTAP induite par une injection de MCT (AIP1 MCT, carrés gris). Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart type de la moyenne

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (mM)		
	Contrôles	HC	MCT	Contrôles	HC	MCT
moyenne	102,42	101,02	85,16 *	27,17	15,04 *	37,33
s.e.m.	0,94	0,87	12,96	1,58	1,10	3,30

Tableau 16 : réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.

La contraction maximale (Emax) est exprimée en % de la contraction en réponse à une solution hyperpotassique (80 mM). L'EC₅₀ correspond à la concentration en mM de KCl qui produit la moitié de la contraction maximale. s.e.m. = écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport au contrôle, avec $P < 0,05$.

5.2. Rôle des jonctions communicantes dans la réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT

Les inhibiteurs de jonctions communicantes n'ont aucun effet sur les réponses aux solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles et MCT (Figure 57A et C respectivement). À l'inverse, le ³⁷⁻⁴³Gap 27 ainsi que le ⁴⁰Gap 27 diminuent tous deux la sensibilité des AIP1 de rats HC aux solutions hyperpotassiques, et augmentent tous deux la contraction maximale en réponse aux solutions hyperpotassiques (Figure 57, Tableau 17).

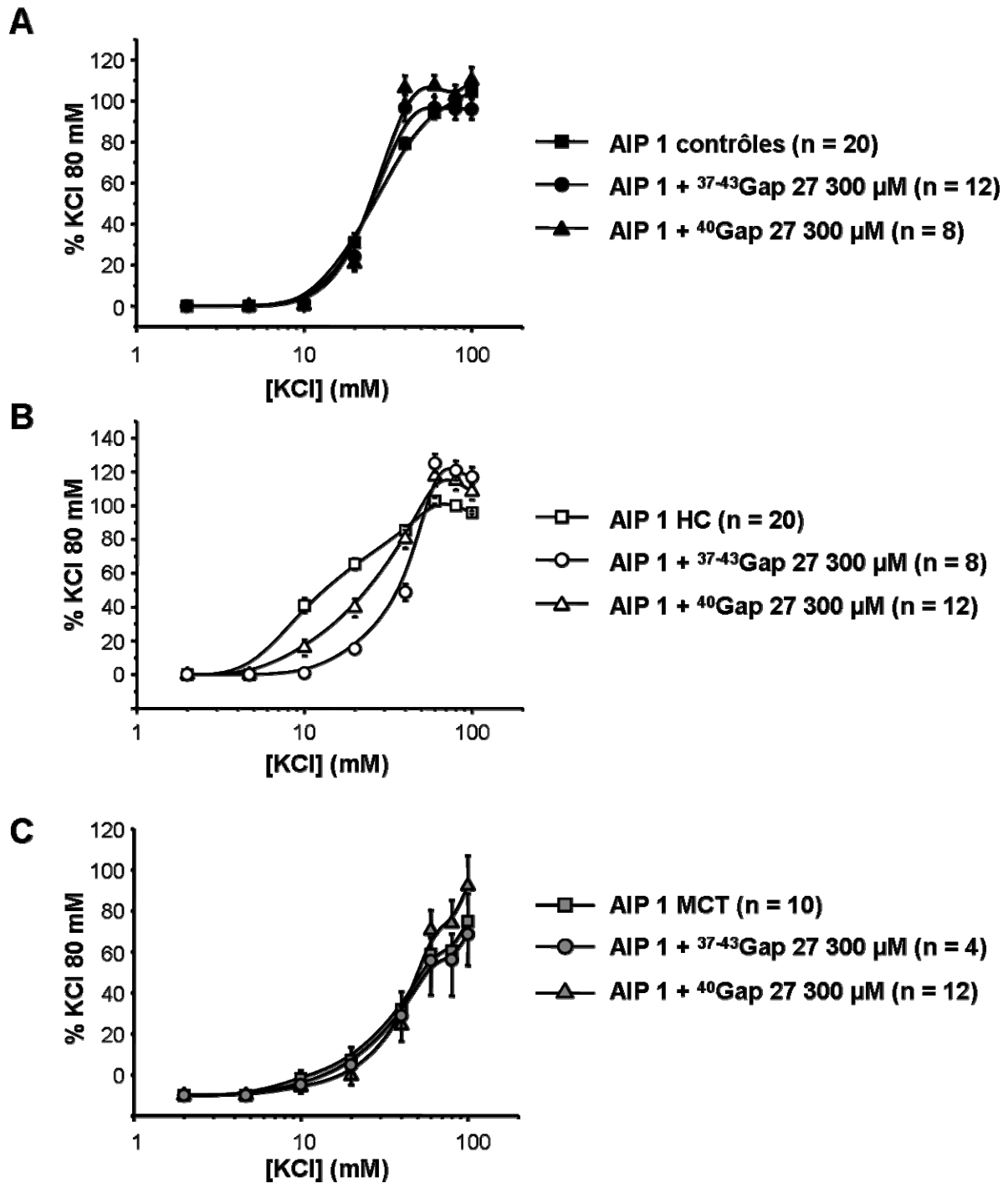


Figure 57 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la contraction en réponse à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rat contrôles, HC et MCT.

CCRC à des solutions hyperpotassiques (KCl) d'AIP1 provenant de rats contrôles (A), de rats atteints d'HTAP hypoxique (B) et de rats atteints d'HTAP induite par une injection de MCT (C). L'effet du ³⁷⁻⁴³Gap 27 (ronds) et du ⁴⁰Gap 27 (triangles) ont été étudiés sur les CCRC en réponse à des solutions hyperpotassiques. Chaque valeur représente une valeur moyenne ± écart type de la moyenne.

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (mM)		
	contrôles	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27	contrôles	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27
moyenne	102,42	97,41	106,93	27,17	23,80	23,98
s.e.m.	0,94	5,34	5,58	1,58	1,09	0,86

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (mM)		
	HC	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27	HC	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27
moyenne	101,02	120,68 *	120,38 *	15,04	40,18 *	27,35 *
s.e.m.	0,87	6,54	5,93	1,10	0,51	2,12

	Emax (% KCl 80 mM)			EC ₅₀ (mM)		
	MCT	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27	MCT	³⁷⁻⁴³ Gap 27	⁴⁰ Gap 27
moyenne	85,16	73,11	99,51	37,33	33,41	40,87
s.e.m.	12,96	18,21	13,08	3,30	2,66	2,49

Tableau 17 : effet des inhibiteurs des jonctions communicantes sur la réactivité à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT.

*La contraction maximale (Emax) est exprimée en % de la contraction en réponse à une solution hyperpotassique (80 mM). L'EC₅₀ correspond à la concentration en KCl en mM qui produit la moitié de l'effet maximal (Emax). s.e.m. = écart type de la moyenne. * indique une différence significative par rapport au contrôle avec P < 0,05.*

6. CONCLUSION

Ces résultats mettent en évidence la présence des 3 isoformes de connexines au niveau des AIP3 issues de rats atteints d'HTAP. Cependant, il existe une surexpression de la Cx 43 dans les AIP3 de rats HC. De plus, les Cx 37 et 40, qui sont exprimées au niveau du muscle lisse des AIP3 de rats sains, sont absentes du muscle lisse des AIP3 de rats HC. En ce qui concerne le profil d'expression des connexines dans les AIP3 de rats MCT, nous n'avons observé aucune modification par rapport aux AIP3 de rats contrôles.

D'un point de vue fonctionnel, notre travail montre que les jonctions communicantes n'interviennent pas toujours dans les phénomènes de contraction des AIP1 issues de rats sains, et ceci dépend de l'agoniste contractant. En effet, chez les rats contrôles, si les jonctions

communicantes interviennent dans la réponse des AIP1 à la 5-HT (Cx 37 et/ou 43), elles n'interviennent pas dans les réponses à l'ET-1, la phényléphrine et aux solutions dépolarisantes (KCl). Chez le rat HC, nous avons mis en évidence l'implication des jonctions communicantes dans la réponse à la phényléphrine et au KCl des AIP1 (Cx 37 et/ou 43 et Cx 40). Seule la Cx 40 intervient dans la contraction à la 5-HT des AIP1 de rats HC. Chez les rats MCT, les Cx 37 et/ou 43 ainsi que la Cx 40 interviennent dans la contraction des AIP1 à la 5-HT.

En définitive, les résultats de la deuxième partie de ce travail de thèse montrent que le profil d'expression ainsi que l'activité des jonctions communicantes sont modifiés lors de l'HTAP.

Enfin, ce travail a permis de mettre en évidence les différences de réactivité à divers vasoconstricteurs entre les AIP1 issues de rats contrôles et les AIP1 issues de rats HC et MCT. En effet, nos résultats montrent qu'il existe une hyperréactivité à la 5-HT des AIP1 de rats HC et MCT par rapport aux AIP1 de rats contrôles. De plus, la réponse maximale à l'ET-1 des AIP1 de rats MCT est fortement diminuée par rapport aux AIP1 de rats contrôles. Quant à la réponse à la phényléphrine, les AIP1 de rats HC et MCT sont plus sensibles à cet agoniste que les AIP1 de rats contrôles. D'autre part, les AIP1 de rats HC sont plus sensibles à la dépolarisation au KCl que les AIP1 de rats contrôles, alors que les AIP1 de rats MCT répondent de façon moins importante aux solutions dépolarisantes par rapport aux AIP1 de rats contrôles.

DISCUSSION - PERSPECTIVES

Etude des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire saine

La première partie de ce travail de thèse apporte pour la première fois des données sur le profil d'expression et sur le rôle fonctionnel des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire de rats sains. D'autre part, ce travail apporte également une preuve directe d'un rétrocontrôle négatif du muscle lisse sur la vasodilatation endothéliale dépendante du NO permettant ainsi de maintenir une contraction des vaisseaux en conditions physiologiques.

En effet, dans les vaisseaux, l'état de contraction du muscle lisse est majoritairement contrôlé par l'endothélium et ce, grâce à une communication permanente entre les deux types cellulaires. La communication paracrine entre les CE et les CML est très bien décrite : les CE produisent des substances telles que le NO et les prostanoïdes qui vont induire une relaxation ou une contraction du muscle lisse sous-jacent. D'autre part, la communication directe entre les deux types cellulaires, faisant intervenir la jonction myoendothéliale (JME) est également bien décrite dans le phénomène d'EDHF. Lors de ce processus, le courant hyperpolarisant généré dans les CE est transmise aux CML *via* la JME.

La majorité des interactions décrites entre l'endothélium et le muscle lisse *via* la JME montre une communication des CE vers les CML. Dans ce travail, nous mettons en évidence la présence d'une communication *via* la JME dans le sens inverse : des CML vers les CE. Seulement trois études ont également mis en évidence ce sens de communication (Dora *et al.*, 1997; Isakson *et al.*, 2007; Lamboley *et al.*, 2005). Ces études montrent qu'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ au niveau des CML induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ au niveau des CE suite au passage à la fois de calcium et d' IP_3 à travers la JME.

1. L'ANION SUPEROXYDE DANS LA REPONSE A LA 5-HT DES AIP

Nous avons mis en évidence la production d' $O_2^{\bullet-}$ par les CML au niveau des AIP de rat sous l'influence de la 5-HT et nos résultats suggèrent le passage de l' $O_2^{\bullet-}$ à travers la JME. Bien qu'aucune preuve directe n'ait été apportée concernant le passage de l' $O_2^{\bullet-}$ à travers la JME, les résultats obtenus le suggèrent fortement. En effet, le $^{37-43}Gap$ 27 ne diminue la contraction à la 5-HT que sur les vaisseaux entiers, et n'a plus d'effet sur des vaisseaux désendothélialisés (Figure 2B de l'article publié dans PLoS ONE), ce qui suggère que le muscle lisse produit une substance qui, en traversant la JME, va contrebalancer l'effet vasodilatateur de la 5-HT sur les CE. D'autre part, nos résultats montrent (1) une production d' $O_2^{\bullet-}$ uniquement dans le muscle

lisse, une production de NO uniquement dans l'endothélium, et une production de GMPc après stimulation des AIP à la 5-HT et (2) une diminution de la quantité de GMPc produit après stimulation des AIP à la 5-HT en présence de PEG-SOD + PEG-catalase (Figure 4 de l'article publié dans PLoS ONE). Ces résultats suggèrent ainsi que l' O_2^{\bullet} produit dans le muscle lisse piège le NO produit dans l'endothélium.

La preuve directe du passage de l' O_2^{\bullet} à travers la JME sera par ailleurs difficile à obtenir à cause de la difficulté à étudier l' O_2^{\bullet} , de par sa courte demi-vie et de par le manque de spécificité des sondes fluorescentes permettant la localisation de l' O_2^{\bullet} (dihydroéthidium (DHE) ou dichlorofluorescéine (DCF)) (Munzel *et al.*, 2002).

Cependant, la mise en évidence de la production d' O_2^{\bullet} par les CML soulève plusieurs perspectives intéressantes concernant la voie de signalisation à l'origine de cette production.

En 2004, Liu et Folz avaient déjà mis en évidence la production d' O_2^{\bullet} au niveau des CML d'artère pulmonaire de souris sous l'influence de la 5-HT (Liu *et al.*, 2004). Dans leur étude, le GR-127935, un inhibiteur des récepteurs 5-HT_{1B/1D} diminue la vasoconstriction des AP de souris, mais n'a aucun effet sur la production d' O_2^{\bullet} . En 1999, Lee avait également montré une production d' O_2^{\bullet} au niveau de CML d'artère pulmonaire de bœuf sous l'influence de la 5-HT, ce phénomène participant à la prolifération des CML (Lee *et al.*, 1999). Dans cette étude, il montre que les récepteurs de la famille 5-HT₂ ainsi que le transporteur à la 5-HT sont tous deux impliqués dans la prolifération des CML. De plus, ils montrent qu'en présence d'inhibiteur du transporteur à la 5-HTT, la production d' O_2^{\bullet} induite par la 5-HT est diminuée, ils n'ont cependant pas étudié le rôle des récepteurs dans la production d' O_2^{\bullet} . Dans notre cas, il serait intéressant de définir la cible de la 5-HT conduisant à la production d' O_2^{\bullet} dans les AIP de rats. Les candidats à étudier sont les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{1B/1D} car ils participent à la vasoconstriction des AIP de rats (Rodat-Despoix *et al.*, 2008). Cependant, il serait également intéressant d'étudier le rôle du transporteur à la 5-HT dans la production d' O_2^{\bullet} puisqu'il est par ailleurs particulièrement impliqué dans la prolifération des CML dans l'HTAP (Eddahibi *et al.*, 2001).

Ensuite, la source de production de l' O_2^{\bullet} sera à définir. Les études de Liu et Folz et de Lee montrent que la NADPH est à l'origine de cette production (Lee *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004a). En effet, l'apocynine et le diphényliodonium (DPI), deux inhibiteurs de la NADPH oxydase diminuent la réponse mitogénique des CML d'AP de bœuf, la vasoconstriction à la 5-HT des AIP de souris, ainsi que la production d' O_2^{\bullet} en réponse à la 5-HT dans ces deux modèles (Liu *et al.*, 2004, (Lee *et al.*, 1999). Il serait donc intéressant d'étudier la production d' O_2^{\bullet} au niveau d'AIP de rats contrôles en présence de 5-HT et des différents inhibiteurs de la NADPH oxydase (DPI, apocynine) en utilisant la RPE. De plus, la même expérience pourra être

réalisée en présence d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire (antimycine A, roténone) et en présence d'inhibiteur de la eNOS (L-NAME), afin d'étudier le rôle éventuel de la mitochondrie et de la eNOS découplée dans la production d' O_2^{\bullet} .

D'autre part, le rôle de l' O_2^{\bullet} dans la réponse à la 5-HT des AIP peut être discutée. En effet, sa courte demi-vie pourrait laisser penser qu'il est susceptible d'interagir avec d'autres cibles avant de traverser la JME pour ensuite piéger le NO produit par la eNOS. Cependant, si l' O_2^{\bullet} et le NO se trouvent à proximité l'un de l'autre, la probabilité qu'ils interagissent ensemble est augmentée. Dans cette hypothèse, leurs sources de production doivent également être situées dans un environnement proche. On peut alors imaginer un domaine spécialisé où les différents acteurs de cette voie sont présents (eNOS, JME, NADPH oxydase, récepteur/transporteur à la 5-HT) ce qui renforcerait le rôle de l' O_2^{\bullet} dans la réponse à la 5-HT. Les caveolae semblent être un bon candidat, il s'agit de domaines membranaires spécialisés enrichis en cholestérol, en sphingolipides et en cavéoline (protéine membranaire). En effet, il a été montré que la eNOS est localisée au niveau des caveolae dans les CE d'artère pulmonaire de rats en culture (Kim *et al.*, 2004). Ces domaines permettent de concentrer diverses protéines et enzymes et sont donc le siège de nombreuses voies de signalisation. D'autre part, une étude récente a comparé le profil d'expression des connexines chez des souris déficientes en une isoforme de cavéoline (la cavéoline-1) par rapport à des souris sauvages. Cette étude montre que l'expression des connexines 37, 40 et 43 est diminuée, et que la JME n'est plus fonctionnelle dans les artères mésentériques de souris déficientes en caveoline-1 par rapport aux souris sauvages (Saliez *et al.*, 2008). Ainsi, la localisation des connexines, et la fonctionnalité de la JME sont étroitement liées à la présence de caveolae. Par ailleurs, le récepteur 5-HT_{2A} est également localisé au niveau des caveolae dans les CML d'artère pulmonaire de rat (Cogolludo *et al.*, 2006). La NADPH oxydase, quant à elle, est aussi détectée au niveau des caveolae des CML d'aorte de rat (Hilenski *et al.*, 2004). Les différents acteurs de la voie de signalisation que nous avons décrite et impliquant la JME (Cx43), la 5-HT, l' O_2^{\bullet} et la eNOS sont donc susceptibles d'être co-localisés au niveau des caveolae. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse afin d'apporter plus d'information concernant cette voie de signalisation. Pour cela, nous pourrions rechercher la présence des différents acteurs de la voie par immunomarquage aux particules d'or couplé à de la microscopie électronique, seule technique permettant d'observer directement la JME. De plus, nous pourrions étudier la réactivité des AIP à la 5-HT en présence d'une substance perturbant la structure des caveolae (methyl- β -cyclodextrine).

2. LES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA REPONSE A LA 5-HT DES AIP

Lors de ce travail, nous avons mis en évidence la présence d'une JME fonctionnelle au niveau des AIP3 de rat, ce qui n'avait jamais été mis en évidence dans ce territoire vasculaire auparavant.

La Cx 43 localisée au niveau de la JME participe à la contraction en réponse à la 5-HT des AIP3 de rats. Nous sommes arrivés à ce résultat en utilisant les peptides bloqueurs des connexines, élaborés dans les années 90 par Chaytor (Chaytor *et al.*, 1997). Ces derniers temps, de nombreuses études ont discuté la spécificité de ces peptides. Bien qu'aucune preuve directe n'ait été apportée, il semblerait que les peptides mimétiques bloquent également les hémicanaux. En effet, deux études ont montré une diminution de la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire et de la propagation de vagues calciques par les peptides mimétiques, alors que ces derniers n'avaient pas d'effet sur la diffusion de colorant, suggérant l'inhibition des hémicanaux par les peptides (Dahl, 2007). Cependant, la composition de ces hémicanaux est encore discutée, certains auteurs émettent l'hypothèse qu'il s'agit de connexons situés dans des zones non jonctionnelles, d'autres pensent qu'il s'agit d'hémicanaux composés de pannexines. Les pannexines sont des protéines codées par des gènes orthologues aux gènes codant les innexines, protéines constitutives des jonctions communicantes chez les invertébrés (Scemes *et al.*, 2009). Ces protéines ont été découvertes très récemment, leur structure étant très proche de celle des connexines, elles sont susceptibles de jouer le même rôle en formant des hémicanaux et des jonctions communicantes entre deux cellules adjacentes. Cependant, ceci n'a été montré qu'en condition *in vitro*, la présence de jonctions communicantes constituées de pannexines n'a pas été mise en évidence *in situ* à l'heure actuelle (Shestopalov *et al.*, 2008).

D'autre part, le rôle des hémicanaux, qu'ils soient constitués de connexines (connexons) ou de pannexines (pannexons) fait l'objet de nombreuses questions à l'heure actuelle, il en est de même pour la spécificité des peptides bloqueurs. Dans notre cas, le ³⁷⁻⁴³Gap 27 a un effet inhibiteur sur la contraction à la 5-HT des AIP3 intactes, mais n'a aucun effet sur la contraction des AIP3 désendothélialisées. Ce résultat montre que la Cx 37 et/ou 43 située(s) au niveau de l'endothélium ou de la JME, intervient dans la contraction à la 5-HT. Si on émet l'hypothèse que le ³⁷⁻⁴³Gap 27 n'est pas spécifique des jonctions communicantes, et qu'il bloque les hémicanaux présents sur les CE, alors, la contraction à la 5-HT serait dépendante de l'endothélium. Ceci paraît cependant peu probable étant donné que la stimulation des récepteurs à la 5-HT présents sur les CE induit une vasodilatation (Murdoch *et al.*, 2003).

3. EXPRESSION DES CONNEXINES DANS LES CML D'AIP EN CULTURE

Les CML d'AIP3 de rat en culture expriment également des connexines. A la différence de ce qui est observé sur les coupes d'AIP3, les CML en culture expriment la Cx 43. Cependant, l'expression de la Cx 43 semble être associée au phénotype prolifératif, et elle semble diminuée lorsque les CML sont privées de facteur de croissance (SVF) pendant 2 jours. Cette privation permet aux CML de rentrer en phénotype contractile, il serait donc intéressant d'étudier l'expression de la Cx 43 après plus de deux jours de privation de SVF. Si l'expression de la Cx 43 diminue avec le temps de privation de SVF, il sera ainsi possible de déterminer le temps de privation de SVF nécessaire pour obtenir le même profil d'expression des connexines que celui observé sur les coupes.

Nous pouvons également noter une différence de localisation de la Cx 40 entre les CML en phénotype prolifératif (localisation diffuse) et les CML en phénotype contractile (localisation nucléaire/périnucléaire). Ce résultat pourrait expliquer l'absence d'effet du $^{40}\text{Gap 27}$ dans la réactivité des AIP1 de rats contrôles à tous les agonistes testés dans ce travail de thèse (5-HT, ET-1, Phe et KCl). Ainsi, la Cx 40 pourrait être présente dans les AIP de rats contrôles, mais elle pourrait être non fonctionnelle de par sa localisation au niveau du noyau. Cette observation amène à se poser des questions sur la localisation subcellulaire des connexines dans l'HTAP où la prolifération des CML est avérée. Il serait donc intéressant d'étudier cette localisation subcellulaire par immunomarquage aux particules d'or couplé à de la microscopie électronique.

D'autre part, étant donné que les CML expriment des connexines, plusieurs études peuvent être envisagées. La fonctionnalité des jonctions communicantes pourrait être mesurée par différentes techniques de diffusion de colorants, telle que le FRAP. La modulation de cette communication par la 5-HT et/ou par l' O_2^\bullet pourrait également être évaluée par cette méthode. De plus, il serait intéressant d'étendre cette étude aux CE d'artère pulmonaire en culture.

Par ailleurs, la co-culture CE/CML permettant de reproduire la JME selon le modèle établi par Isakson, peut être envisagée (Isakson *et al.*, 2005). Le modèle mis au point par Isakson a été élaboré à partir de CE et de CML issues de la circulation systémique, mais récemment, l'équipe de MacMurtry a adapté ce modèle à partir de CE et de CML issues de la circulation pulmonaire (Gairhe S., 2009). Premièrement, ceci permettrait d'évaluer l'importance de la JME en comparant les études effectuées sur ce modèle aux études menées sur les cultures des deux types cellulaires (CE et CML) séparément. D'autre part, la mise au point de ce modèle permettrait d'approfondir de façon considérable l'étude du rétrocontrôle négatif des CML sur les CE. En effet, ce modèle reproduisant la JME, nous pourrions, par exemple,

envisager de stimuler uniquement les CML à la 5-HT puis mesurer les répercussions de cette stimulation sur les CE (augmentation de calcium, production de NO, diffusion d'O₂[•], IP₃ etc.).

4. ETUDE CHEZ LA SOURIS

Contrairement à l'étude menée chez les rats contrôles, nos résultats indiquent que les Cx 37 et/ou 43 n'interviennent pas dans la contraction des AIP1 de souris contrôles. A l'heure actuelle, aucune étude des jonctions communicantes n'a été menée sur la circulation pulmonaire de souris. Cependant, plusieurs éléments laissent à penser que la voie de signalisation que nous avons décrite chez le rat n'est pas présente chez la souris. En effet, si l'étude de Liu et Folz montre une production d'O₂[•] dans les AIP de souris en réponse à la 5-HT, elle montre une augmentation de la réponse à la 5-HT des AIP de souris en présence de L-NAME, inhibiteur de la NO synthase. Ceci indique que la 5-HT produit un léger effet vasodilatateur en induisant la production de NO par la NO synthase endothéliale. Ce résultat est différent de notre étude, où le L-NAME n'a pas d'effet sur la réponse à la 5-HT des AIP3 de rats, montrant ainsi que la production de NO par la NO synthase en réponse à la 5-HT est piégée par l'O₂[•] produit par les CML chez le rat.

Cependant, on ne peut pas exclure l'implication de la Cx 40 dans la réponse à la 5-HT, il serait donc intéressant de tester le ⁴⁰Gap 27 sur la réponse à la 5-HT des AIP de souris. D'autre part, comme aucune étude des jonctions communicantes n'a été menée sur la circulation pulmonaire de souris, il serait intéressant d'étudier le profil d'expression des connexines ainsi que leur rôle dans divers processus (contraction, relaxation, prolifération des CML etc.) dans la circulation pulmonaire de souris. Ce projet serait d'autant plus intéressant qu'il existe plusieurs modèles animaux de souris où l'expression de connexines est supprimée de façon générale ou de façon ciblée (muscle lisse vasculaire ou endothélium) (cf. 4.4. de la partie « les jonctions communicantes »).

Etude des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire pathologique

La deuxième partie de ce travail de thèse a comparé pour la première fois le profil d'expression ainsi que la fonction des jonctions communicantes dans la réactivité vasculaire dans deux modèles animaux d'HTAP.

De nombreuses études menées sur des modèles animaux d'hypertension systémique ont révélé de grandes différences d'expression des connexines et de fonction des jonctions communicantes dans les artères pathologiques (Figuroa *et al.*, 2006). C'est également le cas dans la circulation pulmonaire des animaux atteints d'HTAP où on observe (1) une réorganisation des connexines dans la paroi des artères pulmonaires et (2) un rôle des jonctions communicantes différent dans la réactivité des vaisseaux.

1. PROFIL D'EXPRESSION DES CONNEXINES DANS L'HTAP

Le niveau d'expression des Cx 37 et 40 n'est pas modifié dans les deux modèles d'HTAP. L'expression de la Cx 43, quant à elle n'est pas modifiée dans l'HTAP induite par injection de MCT, mais son niveau est augmenté dans l'HTAP hypoxique.

Une étude a montré que l'expression de la Cx 43 au niveau de CML d'aorte en culture est augmentée lorsque celles-ci sont placées dans un environnement hypoxique (Cowan *et al.*, 2003). Ce résultat pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de la Cx 43 dans l'HTAP hypoxique et non dans l'HTAP induite par une injection de MCT. D'autre part, si l'hypothèse selon laquelle la Cx 43 est associée au phénotype prolifératif est vérifiée, ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de la Cx 43 observée dans l'HTAP hypoxique.

D'autre part, notre étude ne montre pas de différence de localisation des connexines au niveau des AIP de rats contrôles et de rats MCT. Cependant, plusieurs études montrent une désorganisation du profil d'expression subcellulaire de la Cx 43 au niveau du ventricule droit des rats MCT. La Cx 43 est principalement localisée au niveau des disques intercalaires chez le rat contrôle alors que chez le rat MCT, elle est également localisée au niveau des zones de jonctions latérales entre les myocytes et au niveau cytoplasmique (Sasano *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant d'étudier la localisation subcellulaire des connexines au niveau des AIP de rat MCT afin de révéler d'éventuelles différences par rapport aux rats contrôles.

2. REACTIVITE DES AIP SAINES ET PATHOLOGIQUES AUX DIFFERENTS AGONISTES

2.1. Réactivité vasculaire à la 5-HT

Comme décrit précédemment, les AIP3 issues des deux modèles d'HTAP présentent une hyperréactivité à la 5-HT (Hilliker *et al.*, 1985; Keegan *et al.*, 2001; MacLean *et al.*, 1996; Shimoda *et al.*, 2000b).

Plusieurs études mettent en évidence une surexpression des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{1B/1D} chez les souris soumises à une hypoxie chronique par rapport aux souris contrôles. A l'inverse, l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} n'est pas modifiée (Launay *et al.*, 2002). Tous ces résultats ont également été observés chez les patients atteints d'HTAP (Launay *et al.*, 2002). L'hyperréactivité observée chez les rats HC pourrait alors être expliquée par une modification de l'expression des récepteurs.

2.2. Réactivité vasculaire à l'ET-1

Dans la littérature, plusieurs études montrent une hyperréactivité à l'ET-1 au niveau des artères pulmonaires de résistance de rats HC (Shimoda *et al.*, 2002). Cependant, l'artère extrapulmonaire de rat HC présente une réactivité moins importante à l'ET-1 (Lal *et al.*, 1999). Nos résultats montrent une faible diminution de la réponse à l'ET-1 des AIP1 de rats HC par rapport aux AIP1 de rats contrôles. Il serait alors intéressant de vérifier si les AIP3 de rats HC présentent une hyperréactivité à l'ET-1.

En ce qui concerne les rats MCT, la réactivité à l'ET-1 des AIP1 est très faible par rapport au contrôle. Une étude récente a montré que la réactivité à l'ET-1 des AIP de résistance de rats MCT n'est pas altérée (Sauvageau *et al.*, 2009). Chez le rat, la contraction à l'ET-1 des AIP de résistance est liée à l'activation des récepteurs ET_B présents sur le muscle lisse (MacLean *et al.*, 1994). Or, chez le rat MCT, l'expression du récepteur ET_B est diminuée au niveau des AIP de résistance (Sauvageau *et al.*, 2009). Cette dernière observation pourrait expliquer la faible réactivité à l'ET-1 des AIP1 de rats MCT que nous avons observée. Il serait par ailleurs intéressant d'évaluer le rôle des récepteurs ET_B dans la contraction à l'ET-1 des AIP de rats MCT.

2.3. Réactivité vasculaire à des solutions hyperpotassiques

Dans notre étude, nous avons montré que les AIP de rats HC sont plus sensibles aux solutions hyperpotassiques par rapport aux AIP de rats contrôles. Les AIP de rats MCT répondent de façon moins importante aux solutions hyperpotassiques.

Les solutions hyperpotassiques induisent une contraction des AIP en provoquant une dépolarisation membranaire des CML, conduisant à un influx calcique *via* les canaux calciques dépendants du voltage de type L. D'autre part, il a été montré que les CML des AIP de rats HC ont un potentiel de membrane et une concentration calcique intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) de repos plus élevés que les CML des AIP de rats contrôles (Lin *et al.*, 2004; Rodat *et al.*, 2007). Ces deux phénomènes peuvent expliquer l'hypersensibilité à la dépolarisation des AIP de rats HC.

2.4. Réactivité vasculaire à la phényléphrine

Les AIP1 de rats HC et MCT sont plus sensibles à la phényléphrine par rapport aux AIP1 de rats contrôles, cependant, la contraction maximale à la phényléphrine ne diffère pas entre ces trois conditions. L'hypersensibilité à la phényléphrine avait déjà été démontrée au niveau de l'artère extrapulmonaire de rat HC (Lal *et al.*, 1999). Cependant, aucune étude n'a été menée sur la réactivité à la phényléphrine de la circulation pulmonaire de rats MCT.

La réponse des AIP de rat à la phényléphrine fait intervenir un influx de calcium *via* les canaux calciques dépendants du voltage (McDaniel *et al.*, 2001). De la même façon que pour le KCl, il est possible que cette hypersensibilité à la phényléphrine soit expliquée par la dépolarisation et l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ au niveau des CML de la circulation pulmonaire de rats. Cependant, si la dépolarisation membranaire et l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ ont été observées dans les CML de la circulation pulmonaire de rats HC, cette étude n'a pas été réalisée chez le rat MCT. Par ailleurs, nous avons montré que les AIP1 de rats MCT répondent de façon moins importante aux solutions dépolarisantes (KCl, Figure 56) par rapport aux AIP1 contrôles. Ceci laisse penser que les CML des AIP1 de rats MCT ne sont pas dépolarisées et que leur $[Ca^{2+}]_i$ n'est pas augmentée. Il serait donc intéressant de mesurer le potentiel de membrane ainsi que la $[Ca^{2+}]_i$ des CML d'AIP1 de rats MCT afin de vérifier cette hypothèse.

3. ROLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA REACTIVITE DES AIP SAINES ET PATHOLOGIQUES

3.1. Réactivité vasculaire à la 5-HT

Les jonctions communicantes sont impliquées dans la réactivité à la 5-HT des AIP de rats contrôles, HC et MCT, les isoformes de connexines mises en jeu dans chacun de ces modèles sont différentes. Ainsi les Cx 37 et/ou 43 interviennent dans la réponse à la 5-HT des AIP1 de rats contrôles et MCT, et la Cx 40 intervient dans la réponse à la 5-HT des AIP1 de rats HC et MCT.

Chez les rats contrôles, le mécanisme impliquant la Cx 43 dans la réponse à la 5-HT fait également intervenir l' O_2^{\bullet} qui a pour rôle de piéger le NO. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises pour expliquer l'absence d'implication de la Cx 43 dans la réponse à la 5-HT des

AIP de rats HC. Premièrement, contrairement à ce qui est observé chez les rats contrôles, il est possible que la 5-HT n'induit pas la production d' O_2^{\bullet} au niveau des CML de rats HC. Ensuite, chez les rats HC, (1) la production d' O_2^{\bullet} est augmentée (Jernigan *et al.*, 2008), et (2) quelques études montrent une altération de l'activité de la eNOS (Maruyama *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 2005). Il est donc possible que (1) le système soit saturé en O_2^{\bullet} et (2) l'effet vasodilatateur dépendant du NO dû à l'action de la 5-HT sur les CE soit déjà altéré chez les rats HC.

Chez les rats MCT, les Cx 37 et/ou 43 et la Cx 40 sont impliquées dans la réponse à la 5-HT des AIP. Si on émet l'hypothèse que le rétrocontrôle négatif des CML sur les CE est présent dans ce modèle, il est possible que les Cx 37 et/ou 40 interviennent dans ce mécanisme en plus de la Cx 43. Il serait alors intéressant de rechercher chez les rats MCT la voie de signalisation que nous avons décrite chez le rat contrôle.

3.2. Réactivité vasculaire à l'ET-1

Les jonctions communicantes n'interviennent pas dans la réponse à l'ET-1 des AIP1 de rats contrôles, HC et MCT. L'ET-1, tout comme la 5-HT induit une vasoconstriction en agissant sur des récepteurs présents sur le muscle lisse, et peut induire une vasodilatation en agissant sur des récepteurs présents sur l'endothélium. D'autre part, l'ET-1 induit la production d' O_2^{\bullet} au niveau de la circulation systémique (Fellner *et al.*, 2007) et au niveau des CML d'artères pulmonaires de mouton (Wedgwood *et al.*, 2001). Cependant, la production d' O_2^{\bullet} n'est pas observée au niveau des AIP de rats stimulées à l'ET-1 (Jernigan *et al.*, 2008). Ainsi, le rétrocontrôle négatif des CML sur les CE n'est peut être pas présent dans la réponse à l'ET-1.

3.3. Réactivité vasculaire à des solutions hyperpotassiques

Les jonctions communicantes n'interviennent pas dans la réponse à des solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats contrôles et de rats MCT, mais interviennent dans la réactivité des AIP1 de rats HC. De plus, les AIP1 de rats HC sont plus sensibles aux solutions dépolarisantes que les AIP1 de rats contrôles. D'autre part, il est intéressant de noter que lorsque les jonctions communicantes des AIP1 de rats HC sont inhibées (Cx 37 et/ou 43 et Cx 40), la réponse aux solutions hyperpotassiques des AIP1 de rats HC devient semblable à la réponse des AIP1 de rats contrôles. Ceci suggère que les connexines sont impliquées dans l'hypersensibilité à la dépolarisation des AIP1 de rats HC. De plus, le fait que les connexines soient responsables de la conduction de l'activité électrique renforce cette hypothèse.

3.4. Réactivité vasculaire à la phényléphrine

Les jonctions communicantes n'interviennent pas dans la réponse à la phényléphrine des AIP1 de rats contrôles, cependant elles participent à la réactivité des AIP1 de rats HC à cet

agoniste. Comme décrit précédemment, la réponse à la phényléphrine fait intervenir une dépolarisation de la membrane des CML au niveau des AIP. Si on émet l'hypothèse que les jonctions communicantes participent à l'hypersensibilité à la dépolarisation des AIP1 de rats HC, alors, il est possible que les jonctions communicantes participent à la dépolarisation induite par la phényléphrine au niveau des AIP1 de rat HC. Enfin, étant donné la très forte hypersensibilité des AIP1 de rats MCT à la phényléphrine, il serait intéressant d'étudier le rôle des jonctions communicantes dans cette hypersensibilité.

CONCLUSION GENERALE

Cette étude a permis d'acquérir de nouvelles informations sur les jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire normale et pathologique. Dans la littérature, la majorité des études des jonctions communicantes dans l'hypertension sont menées sur l'hypertension artérielle systémique. Notre étude apporte, quant à elle, de nouvelles connaissances sur les jonctions communicantes dans l'hypertension artérielle pulmonaire.

Au niveau de la circulation pulmonaire saine, nous avons mis en évidence la présence d'une nouvelle voie de signalisation dans laquelle le muscle lisse exerce un rétrocontrôle négatif sur l'endothélium, lui-même connu pour réguler l'état de contraction du muscle lisse sous-jacent. Dans cette voie, la 5-HT induit la production d'anion superoxyde au niveau du muscle lisse, ce radical libre traverse la jonction myoendothéliale, puis piège le NO endothélial produit suite à l'action de la 5-HT sur les cellules endothéliales. La JME représente donc une structure essentielle dans la régulation du tonus vasculaire. En perspectives, il semble nécessaire d'approfondir la caractérisation de cette voie, afin d'en préciser les différents acteurs. Il serait en effet intéressant de définir la source de production de l'anion superoxyde, ainsi que l'implication des récepteurs et/ou du transporteur à la 5-HT dans cette production. Ensuite, il serait intéressant d'identifier les différentes étapes intermédiaires entre l'action de la 5-HT sur les CML de la circulation pulmonaire et l'activation de la source de production d'anion superoxyde.

Ce rétrocontrôle est présent suite à une stimulation des artères pulmonaires à la 5-HT, un puissant vasoconstricteur impliqué dans la pathologie principale de la circulation pulmonaire : l'HTAP. Par ailleurs, le profil d'expression des connexines, ainsi que leur rôle fonctionnel dans la vasoconstriction à divers agonistes sont modifiés au niveau de la circulation pulmonaire de rats atteints d'HTAP. En perspectives, il nous semble nécessaire d'approfondir le rôle exact des jonctions communicantes au niveau de la circulation pulmonaire de rats atteints d'HTAP dans la réactivité aux agonistes vasoconstricteurs étudiés lors de ce travail de thèse.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'étudier le rôle des jonctions communicantes dans la réactivité de la circulation pulmonaire en utilisant des modèles animaux de souris déficientes en connexines. Les modèles de souris dont le gène d'une connexine est délété spécifiquement dans l'endothélium vasculaire ou dans le muscle lisse vasculaire représentent un très bon modèle pour réaliser cette étude.

Actuellement, aucune étude des jonctions communicantes n'a été effectuée sur la circulation pulmonaire humaine saine ou pathologique. Il serait donc intéressant de rechercher, chez l'humain, la présence de la voie de signalisation mise en évidence chez le rat dans notre étude. Ceci apporterait en effet une meilleure connaissance de la réactivité à la 5-HT de la circulation pulmonaire humaine saine, dans l'objectif de mieux appréhender la réactivité à la

5-HT de la circulation pulmonaire de patients atteints d'HTAP. En parallèle, il serait intéressant d'étudier les éventuelles modifications du profil d'expression et du rôle des jonctions communicantes dans la réactivité de la circulation pulmonaire de patients atteints d'HTAP. De plus, il serait intéressant de comparer les éventuelles différences entre les différents types d'HTAP humaine.

Ce travail de thèse apporte également de nouvelles informations concernant les ROS, et plus particulièrement l'anion superoxyde. Notre travail apporte une nouvelle preuve du rôle physiologique de l'anion superoxyde, alors qu'il est souvent considéré comme un acteur majeur dans de nombreuses pathologies. Dans un premier temps, il serait nécessaire d'approfondir le rôle physiologique de l'anion superoxyde dans la réactivité à la 5-HT de la circulation pulmonaire de rat. D'autre part, il serait intéressant d'étudier une éventuelle régulation de la fonction des jonctions communicantes par l'anion superoxyde. Dans un deuxième temps, une étude chez l'humain pourrait être envisagée. En effet, il serait intéressant de mettre en évidence un rôle physiologique de l'anion superoxyde dans la réactivité de la circulation pulmonaire humaine, dans l'objectif de mieux comprendre les conséquences du stress oxydant observé au niveau de la circulation pulmonaire des patients atteints d'HTAP.

Toutes ces perspectives visent à mieux comprendre les altérations de la réactivité de la circulation pulmonaire lors de l'HTAP. Cependant, il serait important d'étudier le rôle des jonctions communicantes dans la prolifération des CML de la circulation pulmonaire, afin de mieux comprendre le remodelage du muscle lisse observé dans l'HTAP. La 5-HT est connue pour induire la prolifération des CML de la circulation pulmonaire, et elle est également impliquée dans la prolifération de ces CML dans l'HTAP. Il serait donc intéressant d'étudier la prolifération induite par la 5-HT en modulant l'activité des jonctions communicantes dans des CML d'artère pulmonaire en culture. Cette étude serait à réaliser à la fois chez le rat et chez l'humain. D'autre part, il serait intéressant d'étudier la prolifération en réponse à la 5-HT des CML d'artère pulmonaire issue de souris dont le gène d'une connexine est délété spécifiquement dans le muscle lisse vasculaire.

L'ensemble de ces perspectives vise à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués à la fois dans la vasoconstriction de la circulation pulmonaire, et dans la prolifération des CML de la circulation pulmonaire, deux processus caractéristiques de l'HTAP. Ces perspectives devraient donc permettre de dégager de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'HTAP chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

Abbaci, M, Barberi-Heyob, M, Blondel, W, Guillemin, F, Didelon, J (2008) Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication. *Biotechniques* **45**(1): 33-52, 56-62.

Abenhaim, L, Moride, Y, Brenot, F, Rich, S, Benichou, J, Kurz, X, Higenbottam, T, Oakley, C, Wouters, E, Aubier, M, Simonneau, G, Begaud, B (1996) Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* **335**(9): 609-616.

Alderton, WK, Cooper, CE, Knowles, RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**(Pt 3): 593-615.

Archer, SL, Gomberg-Maitland, M, Maitland, ML, Rich, S, Garcia, JG, Weir, EK (2008) Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(2): H570-578.

Bellien, J, Thuillez, C, Joannides, R (2008) Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundam Clin Pharmacol* **22**(4): 363-377.

Bennett, MV (1997) Gap junctions as electrical synapses. *J Neurocytol* **26**(6): 349-366.

Bennett, MV, Barrio, LC, Bargiello, TA, Spray, DC, Hertzberg, E, Saez, JC (1991) Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* **6**(3): 305-320.

Bergoffen, J, Scherer, SS, Wang, S, Scott, MO, Bone, LJ, Paul, DL, Chen, K, Lensch, MW, Chance, PF, Fischbeck, KH (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* **262**(5142): 2039-2042.

Berthoud, VM, Beyer, EC, Seul, KH (2000) Peptide inhibitors of intercellular communication. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(4): L619-622.

Berthoud, VM, Minogue, PJ, Laing, JG, Beyer, EC (2004) Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovasc Res* **62**(2): 256-267.

Beyer, EC, Paul, DL, Goodenough, DA (1987) Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol* **105**(6 Pt 1): 2621-2629.

Bienert, GP, Schjoerring, JK, Jahn, TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1758**(8): 994-1003.

Bindoli, A, Fukuto, JM, Forman, HJ (2008) Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* **10**(9): 1549-1564.

Blackburn, JP, Peters, NS, Yeh, HI, Rothery, S, Green, CR, Severs, NJ (1995) Upregulation of connexin43 gap junctions during early stages of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(8): 1219-1228.

Bonnet, S, Hyvelin, JM, Bonnet, P, Marthan, R, Savineau, JP (2001) Chronic hypoxia-induced spontaneous and rhythmic contractions in the rat main pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**(1): L183-192.

Bonvallet, ST, Zamora, MR, Hasunuma, K, Sato, K, Hanasato, N, Anderson, D, Stelzner, TJ (1994) BQ123, an ETA-receptor antagonist, attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol* **266**(4 Pt 2): H1327-1331.

Bowers, R, Cool, C, Murphy, RC, Tudor, RM, Hopken, MW, Flores, SC, Voelkel, NF (2004) Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **169**(6): 764-769.

Brisset, AC, Isakson, BE, Kwak, BR (2009) Connexins in vascular physiology and pathology. *Antioxid Redox Signal* **11**(2): 267-282.

Bruzzone, R, White, TW, Goodenough, DA (1996a) The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays* **18**(9): 709-718.

Bruzzone, R, White, TW, Paul, DL (1996b) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* **238**(1): 1-27.

Bruzzone, R, White, TW, Paul, DL (1994) Expression of chimeric connexins reveals new properties of the formation and gating behavior of gap junction channels. *J Cell Sci* **107** (Pt 4): 955-967.

Camello-Almaraz, C, Gomez-Pinilla, PJ, Pozo, MJ, Camello, PJ (2006) Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**(5): C1082-1088.

Campian, ME, Hardziyenka, M, Michel, MC, Tan, HL (2006) How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **373**(6): 391-400.

Caspar, DL, Goodenough, DA, Makowski, L, Phillips, WC (1977) Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J Cell Biol* **74**(2): 605-628.

Cave, A (2009) Selective targeting of NADPH oxidase for cardiovascular protection. *Curr Opin Pharmacol* **9**(2): 208-213.

Chaytor, AT, Bakker, LM, Edwards, DH, Griffith, TM (2005) Connexin-mimetic peptides dissociate electrotonic EDHF-type signalling via myoendothelial and smooth muscle gap junctions in the rabbit iliac artery. *Br J Pharmacol* **144**(1): 108-114.

Chaytor, AT, Evans, WH, Griffith, TM (1997) Peptides homologous to extracellular loop motifs of connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. *J Physiol* **503** (Pt 1): 99-110.

Chen, MJ, Chiang, LY, Lai, YL (2001) Reactive oxygen species and substance P in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Toxicol Appl Pharmacol* **171**(3): 165-173.

Chrissobolis, S, Faraci, FM (2008) The role of oxidative stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease. *Trends Mol Med* **14**(11): 495-502.

Cogolludo, A, Moreno, L, Lodi, F, Frazziano, G, Cobeno, L, Tamargo, J, Perez-Vizcaino, F (2006) Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res* **98**(7): 931-938.

Cooper, CD, Solan, JL, Dolejsi, MK, Lampe, PD (2000) Analysis of connexin phosphorylation sites. *Methods* **20**(2): 196-204.

Cottrell, GT, Burt, JM (2005) Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1711**(2): 126-141.

Cowan, DB, Jones, M, Garcia, LM, Noria, S, del Nido, PJ, McGowan, FX, Jr. (2003) Hypoxia and stretch regulate intercellular communication in vascular smooth muscle cells through reactive oxygen species formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(10): 1754-1760.

Dahl, G (2007) Gap junction-mimetic peptides do work, but in unexpected ways. *Cell Commun Adhes* **14**(6): 259-264.

De Groot, JR, Coronel, R (2004) Acute ischemia-induced gap junctional uncoupling and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* **62**(2): 323-334.

De Vuyst, E, De Bock, M, Decrock, E, Van Moorhem, M, Naus, C, Mabilde, C, Leybaert, L (2008) In situ bipolar electroporation for localized cell loading with reporter dyes and investigating gap junctional coupling. *Biophys J* **94**(2): 469-479.

de Wit, C, Hoepfl, B, Wolfle, SE (2006) Endothelial mediators and communication through vascular gap junctions. *Biol Chem* **387**(1): 3-9.

de Wit, C, Roos, F, Bolz, SS, Pohl, U (2003) Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* **13**(2): 169-177.

Dhein, S, Jongsma, HJ (2004) Forming the network-gap junctions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* **62**(2): 225-227.

Dikalov, S, Griendling, KK, Harrison, DG (2007a) Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* **49**(4): 717-727.

Dikalov, SI, Li, W, Mehranpour, P, Wang, SS, Zafari, AM (2007b) Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochem Pharmacol* **73**(7): 972-980.

Dora, KA, Doyle, MP, Duling, BR (1997) Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12): 6529-6534.

Dora, KA, Martin, PE, Chaytor, AT, Evans, WH, Garland, CJ, Griffith, TM (1999) Role of heterocellular Gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: inhibition by a connexin-mimetic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* **254**(1): 27-31.

Dorfmüller, P, Perros, F, Balabanian, K, Humbert, M (2003) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **22**(2): 358-363.

Doring, B, Shynlova, O, Tsui, P, Eckardt, D, Janssen-Bienhold, U, Hofmann, F, Feil, S, Feil, R, Lye, SJ, Willecke, K (2006) Ablation of connexin43 in uterine smooth muscle cells of the mouse causes delayed parturition. *J Cell Sci* **119**(Pt 9): 1715-1722.

Ducret, T, Guibert, C, Marthan, R, Savineau, JP (2008) Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium* **43**(4): 315-323.

Eddahibi, S, Chaouat, A, Morrell, N, Fadel, E, Fuhrman, C, Bugnet, AS, Darteville, P, Housset, B, Hamon, M, Weitzenblum, E, Adnot, S (2003) Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* **108**(15): 1839-1844.

Eddahibi, S, Fabre, V, Boni, C, Martres, MP, Raffestin, B, Hamon, M, Adnot, S (1999) Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circ Res* **84**(3): 329-336.

Eddahibi, S, Guignabert, C, Barlier-Mur, AM, Dewachter, L, Fadel, E, Dartevelle, P, Humbert, M, Simonneau, G, Hanoun, N, Saurini, F, Hamon, M, Adnot, S (2006) Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* **113**(15): 1857-1864.

Eddahibi, S, Hanoun, N, Lanfumey, L, Lesch, KP, Raffestin, B, Hamon, M, Adnot, S (2000) Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *J Clin Invest* **105**(11): 1555-1562.

Eddahibi, S, Humbert, M, Fadel, E, Raffestin, B, Darmon, M, Capron, F, Simonneau, G, Dartevelle, P, Hamon, M, Adnot, S (2001) Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* **108**(8): 1141-1150.

Eddahibi, S, Raffestin, B, Pham, I, Launay, JM, Aegerter, P, Sitbon, M, Adnot, S (1997) Treatment with 5-HT potentiates development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol* **272**(3 Pt 2): H1173-1181.

Evans, WH, De Vuyst, E, Leybaert, L (2006) The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J* **397**(1): 1-14.

Fanburg, BL, Lee, SL (2000) A role for the serotonin transporter in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Clin Invest* **105**(11): 1521-1523.

Faraci, FM (2003) Vascular protection. *Stroke* **34**(2): 327-329.

Farahmand, F, Hill, MF, Singal, PK (2004) Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol Cell Biochem* **260**(1-2): 21-29.

Farber, HW, Loscalzo, J (2004) Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **351**(16): 1655-1665.

Feletou, M (2009) Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol* **156**(4): 545-562.

Feletou, M, Vanhoutte, PM (2007) Endothelium-dependent hyperpolarizations: past beliefs and present facts. *Ann Med* **39**(7): 495-516.

Fellner, SK, Arendshorst, W (2007) Endothelin-A and -B receptors, superoxide, and Ca²⁺ signaling in afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**(1): F175-184.

Figuroa, XF, Duling, BR (2009) Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxid Redox Signal* **11**(2): 251-266.

Figuroa, XF, Isakson, BE, Duling, BR (2006) Vascular gap junctions in hypertension. *Hypertension* **48**(5): 804-811.

Firouzi, M, Kok, B, Spiering, W, Busjahn, A, Bezzina, CR, Ruijter, JM, Koeleman, BP, Schipper, M, Groenewegen, WA, Jongasma, HJ, de Leeuw, PW (2006) Polymorphisms in human connexin40 gene promoter are associated with increased risk of hypertension in men. *J Hypertens* **24**(2): 325-330.

Firouzi, M, Ramanna, H, Kok, B, Jongasma, HJ, Koeleman, BP, Doevendans, PA, Groenewegen, WA, Hauer, RN (2004) Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res* **95**(4): e29-33.

Fishman, GI, Hertzberg, EL, Spray, DC, Leinwand, LA (1991) Expression of connexin43 in the developing rat heart. *Circ Res* **68**(3): 782-787.

Forman, HJ, Zhang, H, Rinna, A (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* **30**(1-2): 1-12.

Fresquet, F, Pourageaud, F, Leblais, V, Brandes, RP, Savineau, JP, Marthan, R, Muller, B (2006) Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol* **148**(5): 714-723.

Frost, AE, Langleben, D, Oudiz, R, Hill, N, Horn, E, McLaughlin, V, Robbins, IM, Shapiro, S, Tapsos, VF, Zwicke, D, DeMarco, T, Schilz, R, Rubenfire, M, Barst, RJ (2005) The 6-min walk test (6MW) as an efficacy endpoint in pulmonary arterial hypertension clinical trials: demonstration of a ceiling effect. *Vascul Pharmacol* **43**(1): 36-39.

Furshpan, EJ, Potter, DD (1957) Mechanism of nerve-impulse transmission at a crayfish synapse. *Nature* **180**(4581): 342-343.

Gabriels, JE, Paul, DL (1998) Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circ Res* **83**(6): 636-643.

Gaietta, G, Deerinck, TJ, Adams, SR, Bouwer, J, Tour, O, Laird, DW, Sosinsky, GE, Tsien, RY, Ellisman, MH (2002) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* **296**(5567): 503-507.

Gairhe S., BN, Grethoffer W., McMurtry I.F. (2009) Effect of Co-culture with Pulmonary Arterial Endothelial Cells on Phenotype of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *FASEB J* **23**(769.3).

Goldberg, GS, Valiunas, V, Brink, PR (2004) Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* **1662**(1-2): 96-101.

Gonzalez, D, Gomez-Hernandez, JM, Barrio, LC (2007) Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal. *Prog Biophys Mol Biol* **94**(1-2): 66-106.

Goodenough, DA, Revel, JP (1970) A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J Cell Biol* **45**(2): 272-290.

Griffith, TM, Chaytor, AT, Taylor, HJ, Giddings, BD, Edwards, DH (2002) cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 6392-6397.

Grynkiewicz, G, Poenie, M, Tsien, RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**(6): 3440-3450.

Guan, X, Wilson, S, Schlender, KK, Ruch, RJ (1996) Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 beta-glycyrrhetic acid. *Mol Carcinog* **16**(3): 157-164.

Guibert, C, Marthan, R, Savineau, JP (2004) 5-HT induces an arachidonic acid-sensitive calcium influx in rat small intrapulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**(6): L1228-1236.

Guignabert, C, Izikki, M, Tu, LI, Li, Z, Zadigue, P, Barlier-Mur, AM, Hanoun, N, Rodman, D, Hamon, M, Adnot, S, Eddahibi, S (2006) Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ Res* **98**(10): 1323-1330.

Guignabert, C, Raffestin, B, Benferhat, R, Raoul, W, Zadigue, P, Rideau, D, Hamon, M, Adnot, S, Eddahibi, S (2005) Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* **111**(21): 2812-2819.

Gupta, PK, Subramani, J, Leo, MD, Sikarwar, AS, Parida, S, Prakash, VR, Mishra, SK (2008) Role of voltage-dependent potassium channels and myo-endothelial gap junctions in 4-aminopyridine-induced inhibition of acetylcholine relaxation in rat carotid artery. *Eur J Pharmacol* **591**(1-3): 171-176.

Gupte, SA, Wolin, MS (2008) Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing: implications for systemic and pulmonary hypertension. *Antioxid Redox Signal* **10**(6): 1137-1152.

Hannon, J, Hoyer, D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* **195**(1): 198-213.

Harris, AL (2007) Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol* **94**(1-2): 120-143.

Haworth, SG (2006) Role of the endothelium in pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol* **45**(5): 317-325.

Helbock, HJ, Beckman, KB, Ames, BN (1999) 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* **300**: 156-166.

Heller, R, Unbehaun, A, Schellenberg, B, Mayer, B, Werner-Felmayer, G, Werner, ER (2001) L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* **276**(1): 40-47.

Henderson, D, Eibl, H, Weber, K (1979) Structure and biochemistry of mouse hepatic gap junctions. *J Mol Biol* **132**(2): 193-218.

Herve, JC, Derangeon, M, Theveniau-Ruissy, M, Miquerol, L, Sarrouilhe, D, Gros, D (2008) [Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development]. *Pathol Biol (Paris)* **56**(5): 334-341.

Herve, P, Launay, JM, Scrobohaci, ML, Brenot, F, Simonneau, G, Petitpretz, P, Poubeau, P, Cerrina, J, Duroux, P, Drouet, L (1995) Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* **99**(3): 249-254.

Hilliker, KS, Roth, RA (1985) Increased vascular responsiveness in lungs of rats with pulmonary hypertension induced by monocrotaline pyrrole. *Am Rev Respir Dis* **131**(1): 46-50.

Hirano, K (2007) Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci* **104**(2): 109-115.

Hironaka, E, Hongo, M, Sakai, A, Mawatari, E, Terasawa, F, Okumura, N, Yamazaki, A, Ushiyama, Y, Yazaki, Y, Kinoshita, O (2003) Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats. *Cardiovasc Res* **60**(3): 692-699.

Hoyer, D, Clarke, DE, Fozard, JR, Hartig, PR, Martin, GR, Mylecharane, EJ, Saxena, PR, Humphrey, PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* **46**(2): 157-203.

Huang, GY, Wessels, A, Smith, BR, Linask, KK, Ewart, JL, Lo, CW (1998) Alteration in connexin 43 gap junction gene dosage impairs conotruncal heart development. *Dev Biol* **198**(1): 32-44.

Humbert, M, Sitbon, O, Simonneau, G (2002) *Coeur et médecine interne*. De Boeck.

Isakson, BE, Duling, BR (2005) Heterocellular contact at the myoendothelial junction influences gap junction organization. *Circ Res* **97**(1): 44-51.

Isakson, BE, Ramos, SI, Duling, BR (2007) Ca²⁺ and inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction. *Circ Res* **100**(2): 246-254.

Jernigan, NL, Walker, BR, Resta, TC (2008) Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**(3): L515-529.

Johnson, DE, Georgieff, MK (1989) Pulmonary neuroendocrine cells. Their secretory products and their potential roles in health and chronic lung disease in infancy. *Am Rev Respir Dis* **140**(6): 1807-1812.

Jonnakuty, C, Gragnoli, C (2008) What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* **217**(2): 301-306.

Jordan, K, Chodock, R, Hand, AR, Laird, DW (2001) The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci* **114**(Pt 4): 763-773.

Kamezaki, F, Tasaki, H, Yamashita, K, Tsutsui, M, Koide, S, Nakata, S, Tanimoto, A, Okazaki, M, Sasaguri, Y, Adachi, T, Otsuji, Y (2008) Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **177**(2): 219-226.

Kanai, Y, Hori, S, Tanaka, T, Yasuoka, M, Watanabe, K, Aikawa, N, Hosoda, Y (1993) Role of 5-hydroxytryptamine in the progression of monocrotaline induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc Res* **27**(9): 1619-1623.

Kanno, Y, Loewenstein, WR (1966) Cell-to-cell passage of large molecules. *Nature* **212**(5062): 629-630.

Karamsetty, VS, Kane, KA, Wadsworth, RM (1995) The effects of chronic hypoxia on the pharmacological responsiveness of the pulmonary artery. *Pharmacol Ther* **68**(2): 233-246.

Katzung, B (2006) *Basic & Clinical Pharmacology*. Vol. 10. McGraw-Hill Medical.

Keegan, A, Morecroft, I, Smillie, D, Hicks, MN, MacLean, MR (2001) Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935. *Circ Res* **89**(12): 1231-1239.

Khoo, JP, Zhao, L, Alp, NJ, Bendall, JK, Nicoli, T, Rockett, K, Wilkins, MR, Channon, KM (2005) Pivotal role for endothelial tetrahydrobiopterin in pulmonary hypertension. *Circulation* **111**(16): 2126-2133.

Kleschyov, AL, Wenzel, P, Munzel, T (2007) Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **851**(1-2): 12-20.

Ko, YS, Yeh, HI, Rothery, S, Dupont, E, Coppen, SR, Severs, NJ (1999) Connexin make-up of endothelial gap junctions in the rat pulmonary artery as revealed by immunofocal microscopy and triple-label immunogold electron microscopy. *J Histochem Cytochem* **47**(5): 683-692.

Kumar, NM, Gilula, NB (1986) Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J Cell Biol* **103**(3): 767-776.

Kumar, NM, Gilula, NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* **84**(3): 381-388.

Laird, DW (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* **394**(Pt 3): 527-543.

Lal, H, Williams, KI, Woodward, B (1999) Chronic hypoxia differentially alters the responses of pulmonary arteries and veins to endothelin-1 and other agents. *Eur J Pharmacol* **371**(1): 11-21.

Lamboley, M, Pittet, P, Koenigsberger, M, Sauser, R, Beny, JL, Meister, JJ (2005) Evidence for signaling via gap junctions from smooth muscle to endothelial cells in rat mesenteric arteries: possible implication of a second messenger. *Cell Calcium* **37**(4): 311-320.

Lampe, PD, Kurata, WE, Warn-Cramer, BJ, Lau, AF (1998) Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. *J Cell Sci* **111** (Pt 6): 833-841.

Lau, AT, Wang, Y, Chiu, JF (2008) Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem* **104**(2): 657-667.

Lauf, U, Giepmans, BN, Lopez, P, Braconnot, S, Chen, SC, Falk, MM (2002) Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10446-10451.

Launay, JM, Herve, P, Peoc'h, K, Tournois, C, Callebert, J, Nebigil, CG, Etienne, N, Drouet, L, Humbert, M, Simonneau, G, Maroteaux, L (2002) Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* **8**(10): 1129-1135.

Lee, MY, Griendling, KK (2008) Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal* **10**(6): 1045-1059.

Lee, SL, Wang, WW, Fanburg, BL (1997) Association of Tyr phosphorylation of GTPase-activating protein with mitogenic action of serotonin. *Am J Physiol* **272**(1 Pt 1): C223-230.

Lee, SL, Wang, WW, Finlay, GA, Fanburg, BL (1999) Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol* **277**(2 Pt 1): L282-291.

Lee, SL, Wang, WW, Lanzillo, JJ, Fanburg, BL (1994) Serotonin produces both hyperplasia and hypertrophy of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture. *Am J Physiol* **266**(1 Pt 1): L46-52.

Levine, RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* **32**(9): 790-796.

Li, JM, Shah, AM (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**(5): R1014-1030.

Liao, Y, Day, KH, Damon, DN, Duling, BR (2001) Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9989-9994.

Liao, Y, Regan, CP, Manabe, I, Owens, GK, Day, KH, Damon, DN, Duling, BR (2007) Smooth muscle-targeted knockout of connexin43 enhances neointimal formation in response to vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(5): 1037-1042.

Lin, MJ, Leung, GP, Zhang, WM, Yang, XR, Yip, KP, Tse, CM, Sham, JS (2004) Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* **95**(5): 496-505.

Lippincott-Schwartz, J, Snapp, E, Kenworthy, A (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(6): 444-456.

Liu, JQ, Folz, RJ (2004a) Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**(1): L111-118.

Liu, JQ, Zelko, IN, Erbynn, EM, Sham, JS, Folz, RJ (2006) Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**(1): L2-10.

Liu, Y, Fanburg, BL (2008) Phospholipase D signaling in serotonin-induced mitogenesis of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**(3): L471-478.

Liu, Y, Ren, W, Warburton, R, Toksoz, D, Fanburg, BL (2009) Serotonin induces Rho/ROCK-dependent activation of Smads 1/5/8 in pulmonary artery smooth muscle cells. *FASEB J* **23**(7): 2299-2306.

Liu, Y, Suzuki, YJ, Day, RM, Fanburg, BL (2004b) Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ Res* **95**(6): 579-586.

Loewenstein, WR, Rose, B (1992) The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol* **3**(1): 59-79.

Lurtz, MM, Louis, CF (2007) Intracellular calcium regulation of connexin43. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(6): C1806-1813.

Lyle, AN, Griendling, KK (2006) Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* **21**: 269-280.

Maclean, MR, Dempsie, Y (2009) Serotonin and pulmonary hypertension-from bench to bedside? *Curr Opin Pharmacol* **9**(3): 281-286.

MacLean, MR, Deuchar, GA, Hicks, MN, Morecroft, I, Shen, S, Sheward, J, Colston, J, Loughlin, L, Nilsen, M, Dempsie, Y, Harmar, A (2004) Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **109**(17): 2150-2155.

MacLean, MR, Herve, P, Eddahibi, S, Adnot, S (2000) 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol* **131**(2): 161-168.

MacLean, MR, McCulloch, KM, Baird, M (1994) Endothelin ETA- and ETB-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol* **23**(5): 838-845.

MacLean, MR, Sweeney, G, Baird, M, McCulloch, KM, Houslay, M, Morecroft, I (1996) 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **119**(5): 917-930.

Makowski, L, Caspar, DL, Phillips, WC, Goodenough, DA (1977) Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol* **74**(2): 629-645.

Marcos, E, Adnot, S, Pham, MH, Nosjean, A, Raffestin, B, Hamon, M, Eddahibi, S (2003) Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **168**(4): 487-493.

Marcos, E, Fadel, E, Sanchez, O, Humbert, M, Dartevielle, P, Simonneau, G, Hamon, M, Adnot, S, Eddahibi, S (2004) Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ Res* **94**(9): 1263-1270.

Martin, PE, Wall, C, Griffith, TM (2005) Effects of connexin-mimetic peptides on gap junction functionality and connexin expression in cultured vascular cells. *Br J Pharmacol* **144**(5): 617-627.

Maruyama, J, Yokochi, A, Maruyama, K, Nosaka, S (1999) Acetylcholine-induced endothelium-derived contracting factor in hypoxic pulmonary hypertensive rats. *J Appl Physiol* **86**(5): 1687-1695.

Matchkov, VV, Rahman, A, Bakker, LM, Griffith, TM, Nilsson, H, Aalkjaer, C (2006) Analysis of effects of connexin-mimetic peptides in rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(1): H357-367.

Matchkov, VV, Rahman, A, Peng, H, Nilsson, H, Aalkjaer, C (2004) Junctional and nonjunctional effects of heptanol and glycyrrhetic acid derivatives in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol* **142**(6): 961-972.

Merkus, D, de Beer, VJ, Houweling, B, Duncker, DJ (2008) Control of pulmonary vascular tone during exercise in health and pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* **119**(3): 242-263.

Mesnil, M (2004) [Gap junctions and cancer: implications and perspectives]. *Med Sci (Paris)* **20**(2): 197-206.

Michelakis, ED, Thebaud, B, Weir, EK, Archer, SL (2004) Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* **37**(6): 1119-1136.

Miyata, M, Ito, M, Sasajima, T, Ohira, H, Sato, Y, Kasukawa, R (2000) Development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension is attenuated by a serotonin receptor antagonist. *Lung* **178**(2): 63-73.

Miyauchi, T, Yorikane, R, Sakai, S, Sakurai, T, Okada, M, Nishikibe, M, Yano, M, Yamaguchi, I, Sugishita, Y, Goto, K (1993) Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* **73**(5): 887-897.

- Mohammad-Zadeh, LF, Moses, L, Gwaltney-Brant, SM (2008) Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther* **31**(3): 187-199.
- Montani, D, Hamid, A, Yaici, A, Sztrymf, B, Humbert, M (2004) [Pulmonary arterial hypertension]. *Rev Prat* **54**(1): 5-13.
- Montani, D, Jais, X, Sitbon, O, Capron, F, Simonneau, G, Humbert, M (2005) [Pulmonary arterial hypertension]. *Rev Mal Respir* **22**(4): 651-666.
- Morecroft, I, Heeley, RP, Prentice, HM, Kirk, A, MacLean, MR (1999) 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *Br J Pharmacol* **128**(3): 730-734.
- Mueller, CF, Laude, K, McNally, JS, Harrison, DG (2005) ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(2): 274-278.
- Munzel, T, Afanas'ev, IB, Kleschyov, AL, Harrison, DG (2002) Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(11): 1761-1768.
- Murata, T, Kinoshita, K, Hori, M, Kuwahara, M, Tsubone, H, Karaki, H, Ozaki, H (2005) Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(11): 2335-2342.
- Murdoch, R, Morecroft, I, MacLean, MR (2003) 5-HT moduline: an endogenous inhibitor of 5-HT_{1B/1D}-mediated contraction in pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* **138**(5): 795-800.
- Murphy, DL, Lerner, A, Rudnick, G, Lesch, KP (2004) Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv* **4**(2): 109-123.
- Musil, LS, Cunningham, BA, Edelman, GM, Goodenough, DA (1990) Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* **111**(5 Pt 1): 2077-2088.
- Musil, LS, Goodenough, DA (1991) Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* **115**(5): 1357-1374.
- Naeije, R, Dewachter, L (2007) [Animal models of pulmonary arterial hypertension]. *Rev Mal Respir* **24**(4 Pt 1): 481-496.
- Nakamura, K, Inai, T, Shibata, Y (1999) Distribution of gap junction protein connexin 37 in smooth muscle cells of the rat trachea and pulmonary artery. *Arch Histol Cytol* **62**(1): 27-37.

Okamoto, T, Akiyama, M, Takeda, M, Gabazza, EC, Hayashi, T, Suzuki, K (2009) Connexin32 is expressed in vascular endothelial cells and participates in gap-junction intercellular communication. *Biochem Biophys Res Commun* **382**(2): 264-268.

Pamplona, R (2008) Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* **1777**(10): 1249-1262.

Paravicini, TM, Touyz, RM (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* **31 Suppl 2**: S170-180.

Pauwels, PJ (2000) Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol* **60**(12): 1743-1750.

Penn, RD (1966) Ionic communication between liver cells. *J Cell Biol* **29**(1): 171-174.

Pitt, BR, Weng, W, Steve, AR, Blakely, RD, Reynolds, I, Davies, P (1994) Serotonin increases DNA synthesis in rat proximal and distal pulmonary vascular smooth muscle cells in culture. *Am J Physiol* **266**(2 Pt 1): L178-186.

Polacek, D, Lal, R, Volin, MV, Davies, PF (1993) Gap junctional communication between vascular cells. Induction of connexin43 messenger RNA in macrophage foam cells of atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* **142**(2): 593-606.

Pryor, WA, Houk, KN, Foote, CS, Fukuto, JM, Ignarro, LJ, Squadrito, GL, Davies, KJ (2006) Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**(3): R491-511.

Redout, EM, Wagner, MJ, Zuidwijk, MJ, Boer, C, Musters, RJ, van Hardeveld, C, Paulus, WJ, Simonides, WS (2007) Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* **75**(4): 770-781.

Revel, JP, Karnovsky, MJ (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* **33**(3): C7-C12.

Rhodes, CJ, Davidson, A, Gibbs, JS, Wharton, J, Wilkins, MR (2009) Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Ther* **121**(1): 69-88.

Rich, S, Rabinovitch, M (2008) Diagnosis and treatment of secondary (non-category 1) pulmonary hypertension. *Circulation* **118**(21): 2190-2199.

Risek, B, Guthrie, S, Kumar, N, Gilula, NB (1990) Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat. *J Cell Biol* **110**(2): 269-282.

Robertson, JD (1963) The Occurrence of a Subunit Pattern in the Unit Membranes of Club Endings in Mauthner Cell Synapses in Goldfish Brains. *J Cell Biol* **19**: 201-221.

Rodat-Despoix, L, Crevel, H, Marthan, R, Savineau, JP, Guibert, C (2008) Heterogeneity in 5-HT-induced contractile and proliferative responses in rat pulmonary arterial bed. *J Vasc Res* **45**(3): 181-192.

Rodat, L, Savineau, JP, Marthan, R, Guibert, C (2007) Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflugers Arch* **454**(1): 41-51.

Rojas, A, Figueroa, H, Re, L, Morales, MA (2006) Oxidative stress at the vascular wall. Mechanistic and pharmacological aspects. *Arch Med Res* **37**(4): 436-448.

Rudnick, G (2006) Serotonin transporters--structure and function. *J Membr Biol* **213**(2): 101-110.

Rummery, NM, Grayson, TH, Hill, CE (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibition restores endothelial but not medial connexin expression in hypertensive rats. *J Hypertens* **23**(2): 317-328.

Rummery, NM, McKenzie, KU, Whitworth, JA, Hill, CE (2002) Decreased endothelial size and connexin expression in rat caudal arteries during hypertension. *J Hypertens* **20**(2): 247-253.

Saez, JC, Berthoud, VM, Branes, MC, Martinez, AD, Beyer, EC (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* **83**(4): 1359-1400.

Salameh, A, Dhein, S (2005) Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer? *Biochim Biophys Acta* **1719**(1-2): 36-58.

Saliez, J, Bouzin, C, Rath, G, Ghisdal, P, Desjardins, F, Rezzani, R, Rodella, LF, Vriens, J, Nilius, B, Feron, O, Balligand, JL, Dessy, C (2008) Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca²⁺ signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation* **117**(8): 1065-1074.

Sandow, SL, Hill, CE (2000) Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* **86**(3): 341-346.

Sasano, C, Honjo, H, Takagishi, Y, Uzzaman, M, Emdad, L, Shimizu, A, Murata, Y, Kamiya, K, Kodama, I (2007) Internalization and dephosphorylation of connexin43 in hypertrophied right ventricles of rats with pulmonary hypertension. *Circ J* **71**(3): 382-389.

Sauvageau, S, Thorin, E, Villeneuve, L, Dupuis, J (2009) Change in pharmacological effect of endothelin receptor antagonists in rats with pulmonary hypertension: role of ETB-receptor expression levels. *Pulm Pharmacol Ther* **22**(4): 311-317.

Savineau, JP, Marthan, R (1997) Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. *Fundam Clin Pharmacol* **11**(4): 289-299.

Scemes, E, Spray, DC, Meda, P (2009) Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemichannels". *Pflugers Arch* **457**(6): 1207-1226.

Schulz, E, Jansen, T, Wenzel, P, Daiber, A, Munzel, T (2008) Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* **10**(6): 1115-1126.

Segretain, D, Falk, MM (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* **1662**(1-2): 3-21.

Severs, NJ (1990) The cardiac gap junction and intercalated disc. *Int J Cardiol* **26**(2): 137-173.

Severs, NJ, Dupont, E, Coppen, SR, Halliday, D, Inett, E, Baylis, D, Rothery, S (2004) Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochim Biophys Acta* **1662**(1-2): 138-148.

Shaul, PW, Kinane, B, Farrar, MA, Buja, LM, Magness, RR (1991) Prostacyclin production and mediation of adenylate cyclase activity in the pulmonary artery. Alterations after prolonged hypoxia in the rat. *J Clin Invest* **88**(2): 447-455.

Shaw, AM, Bunton, DC, Fisher, A, McGrath, JC, Montgomery, I, Daly, C, MacDonald, A (1999) V-shaped cushion at the origin of bovine pulmonary supernumerary arteries: structure and putative function. *J Appl Physiol* **87**(6): 2348-2356.

Shestopalov, VI, Panchin, Y (2008) Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol Life Sci* **65**(3): 376-394.

Shimoda, LA, Sham, JS, Liu, Q, Sylvester, JT (2002) Acute and chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction: a central role for endothelin-1? *Respir Physiol Neurobiol* **132**(1): 93-106.

Shimoda, LA, Sham, JS, Sylvester, JT (2000) Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung. *Physiol Res* **49**(5): 549-560.

Shiva, S, Crawford, JH, Ramachandran, A, Ceaser, EK, Hillson, T, Brookes, PS, Patel, RP, Darley-Usmar, VM (2004) Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J* **379**(Pt 2): 359-366.

Shujaat, A, Minkin, R, Eden, E (2007) Pulmonary hypertension and chronic cor pulmonale in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **2**(3): 273-282.

Sies, H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **215**(2): 213-219.

Simonneau, G, Robbins, IM, Beghetti, M, Channick, RN, Delcroix, M, Denton, CP, Elliott, CG, Gaine, SP, Gladwin, MT, Jing, ZC, Krowka, MJ, Langleben, D, Nakanishi, N, Souza, R (2009) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**(1 Suppl): S43-54.

Sohl, G, Willecke, K (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* **62**(2): 228-232.

Solan, JL, Lampe, PD (2009) Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* **419**(2): 261-272.

Sorensen, CM, Salomonsson, M, Braunstein, TH, Nielsen, MS, Holstein-Rathlou, NH (2008) Connexin mimetic peptides fail to inhibit vascular conducted calcium responses in renal arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**(3): R840-847.

Starkov, AA (2008) The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci* **1147**: 37-52.

Sumimoto, H (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* **275**(13): 3249-3277.

Tan, XY, He, JG (2009) The remodeling of connexin in the hypertrophied right ventricular in pulmonary arterial hypertension and the effect of a dual ET receptor antagonist (bosentan). *Pathol Res Pract* **205**(7): 473-482.

Traub, O, Look, J, Dermietzel, R, Brummer, F, Hulser, D, Willecke, K (1989) Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J Cell Biol* **108**(3): 1039-1051.

Uzzaman, M, Honjo, H, Takagishi, Y, Emdad, L, Magee, AI, Severs, NJ, Kodama, I (2000) Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* **86**(8): 871-878.

van Kempen, MJ, Jongsma, HJ (1999) Distribution of connexin37, connexin40 and connexin43 in the aorta and coronary artery of several mammals. *Histochem Cell Biol* **112**(6): 479-486.

Vandesompele, J, De Preter, K, Pattyn, F, Poppe, B, Van Roy, N, De Paepe, A, Speleman, F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**(7): RESEARCH0034.

Vanhoutte, PM (2004) Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol Res* **49**(6): 503-508.

Vinken, M, Vanhaecke, T, Papeleu, P, Snykers, S, Henkens, T, Rogiers, V (2006) Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signal* **18**(5): 592-600.

Voelkel, NF, Tuder, RM (1997) Cellular and molecular biology of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* **10**(5-6): 231-241.

Vorndran, C, Minta, A, Poenie, M (1995) New fluorescent calcium indicators designed for cytosolic retention or measuring calcium near membranes. *Biophys J* **69**(5): 2112-2124.

Wagner, C, de Wit, C, Kurtz, L, Grunberger, C, Kurtz, A, Schweda, F (2007) Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* **100**(4): 556-563.

Waypa, GB, Guzy, R, Mungai, PT, Mack, MM, Marks, JD, Roe, MW, Schumacker, PT (2006) Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* **99**(9): 970-978.

Weber, PA, Chang, HC, Spaeth, KE, Nitsche, JM, Nicholson, BJ (2004) The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities. *Biophys J* **87**(2): 958-973.

Wedgwood, S, Dettman, RW, Black, SM (2001) ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**(5): L1058-1067.

Wei, CJ, Xu, X, Lo, CW (2004) Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 811-838.

Weidmann, S (1952) The electrical constants of Purkinje fibres. *J Physiol* **118**(3): 348-360.

Weil, JA, Bolton, JR (2007) *Electron paramagnetic resonance : elementary theory and practical applications*. 2nd edn. Wiley-Interscience: Hoboken, N.J.

Weissmann, N, Grimminger, F, Seeger, W (2006) Hypoxia in lung vascular biology and disease. *Cardiovasc Res* **71**(4): 618-619.

Weitzenblum, E, Chaouat, A (2005) Severe pulmonary hypertension in COPD: is it a distinct disease? *Chest* **127**(5): 1480-1482.

Willecke, K, Eiberger, J, Degen, J, Eckardt, D, Romualdi, A, Guldenagel, M, Deutsch, U, Sohl, G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* **383**(5): 725-737.

Wolin, MS (2009) Reactive oxygen species and the control of vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**(3): H539-549.

Yancey, SB, John, SA, Lal, R, Austin, BJ, Revel, JP (1989) The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology, and functional domains. *J Cell Biol* **108**(6): 2241-2254.

Yeager, M, Nicholson, BJ (1996) Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* **6**(2): 183-192.

Yeh, HI, Lee, PY, Su, CH, Tian, TY, Ko, YS, Tsai, CH (2006) Reduced expression of endothelial connexins 43 and 37 in hypertensive rats is rectified after 7-day carvedilol treatment. *Am J Hypertens* **19**(2): 129-135.

Zhang, DX, Gutterman, DD (2007) Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(5): H2023-2031.

Zhou, Y, Yang, W, Lurtz, MM, Ye, Y, Huang, Y, Lee, HW, Chen, Y, Louis, CF, Yang, JJ (2007) Identification of the calmodulin binding domain of connexin 43. *J Biol Chem* **282**(48): 35005-35017.

Ziambaras, K, Lecanda, F, Steinberg, TH, Civitelli, R (1998) Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* **13**(2): 218-228.

Rôle des jonctions communicantes dans la paroi artérielle pulmonaire : implications en physiopathologie

Les jonctions communicantes jouent un rôle important dans la prolifération et la réactivité vasculaire systémique. Dans cette étude, nous avons recherché le rôle de ces structures dans la paroi artérielle pulmonaire saine et dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). L'HTAP est une pathologie de la circulation pulmonaire caractérisée par une prolifération cellulaire pathologique et une hyperréactivité à divers agonistes vasoconstricteurs tels que la sérotonine (5-HT). Dans la paroi artérielle pulmonaire de rats sains les protéines constituant les jonctions communicantes vasculaires (les connexines 37, 40 et 43) sont présentes. De plus, la connexine 43 située au niveau de la jonction myoendothéliale (JME) intervient dans la réactivité à la 5-HT. La 5-HT produit par ailleurs, (1) de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) au niveau du muscle lisse et (2) un vasodilatateur (le monoxyde d'azote (NO)) au niveau de l'endothélium. La JME va permettre le passage de l' $O_2^{\bullet-}$ du muscle lisse vers l'endothélium de façon à piéger le NO et maintenir une contraction physiologique de l'artère pulmonaire. L'étude des jonctions communicantes dans la circulation pulmonaire pathologique a été réalisée sur deux modèles de rats atteints d'HTAP : (1) le modèle de rat atteint d'HTAP suite à une injection de monocrotaline (rat MCT) et (2) le modèle de rat atteint d'HTAP suite à une hypoxie chronique (rat HC). Les connexines 37, 40 et 43 sont également exprimées au niveau de la circulation pulmonaire de ces rats, mais leur distribution au niveau du muscle lisse et l'endothélium est modifiée. La réactivité des artères pulmonaires à divers agents vasoconstricteurs (5-HT, endothéline-1, phényléphrine, solutions dépolarisantes) est modifiée chez les rats MCT et HC. De plus, l'implication des jonctions communicantes dans la réactivité à ces agents est changée chez les rats MCT et HC. Ces données apportent de nouvelles connaissances sur le rôle des jonctions communicantes dans la réponse contractile des artères pulmonaires saines, et de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre les altérations de la vasomotricité pulmonaire observée dans l'HTAP.

Mots clés : jonctions communicantes, anion superoxyde, hypertension artérielle pulmonaire, hypoxie chronique, monocrotaline, sérotonine

Role of gap junction communication in pulmonary arterial wall: implications in pathophysiology

Gap junction communication plays an important role in proliferation and in the regulation of vascular reactivity. In this study, we investigated the role of gap junctions in physiological pulmonary circulation and in pulmonary arterial hypertension (PAH). PAH is the main pathology of pulmonary circulation and is characterized by cell proliferation and hyperreactivity to several contractile factors such as serotonin (5-HT). In pulmonary circulation from healthy rats, gap junction proteins were observed (connexins 37, 40 and 43). Moreover, connexin 43 located at the myoendothelial junction (MEJ) is involved in the reactivity to 5-HT in pulmonary arteries from healthy rats. Indeed, 5-HT produces (1) superoxyde anion ($O_2^{\bullet-}$) from smooth muscle and (2) a vasodilator (nitric oxide (NO)) from endothelium. $O_2^{\bullet-}$ will pass through MEJ from the smooth muscle to the endothelium in order to scavenge NO and thus maintain contraction in physiological conditions. Gap junctions study in pathological pulmonary arteries has been performed on two animal models of PAH: (1) monocrotaline-induced PAH (MCT rat) and (2) chronic hypoxia-induced PAH (CH rat). Connexins 37, 40 and 43 were observed in pulmonary circulation from these rats, but the localization in smooth muscle and endothelium is modified. Moreover, pulmonary arterial vasoreactivity in response to several contractile agents (5-HT, endothelin-1, phenylephrine, depolarizing solutions) is modified in MCT and CH rats. Finally, the role of gap junctions in the reactivity to these agonists is changed in MCT and CH rats. These data have important implications for understanding physiological vasoreactivity to 5-HT in pulmonary circulation, and to better understand alterations of pulmonary arterial reactivity observed in PAH.

Keywords: gap junctions, superoxyde anion, pulmonary arterial hypertension, chronic hypoxia, monocrotaline, serotonin.