

Université de Montréal

**Identification de nouveaux mécanismes régulateurs des
pulsars calciques endothéliaux d'artères mésentériques de
souris.**

par Fanny Toussaint

Département de pharmacologie et physiologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de *Philosophia Doctor* (Ph.D)
en Physiologie moléculaire et intégrative

Juin 2017

© Fanny Toussaint, 2017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Identification de nouveaux mécanismes régulateurs des pulsars calciques endothéliaux
d'artères mésentériques de souris.**

Présentée par :
Fanny Toussaint

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Lucie Parent, Présidente-rapporteur

Dr Jonathan Ledoux, Directeur de recherche

Dr Denis deBlois, Membre du jury

Dr Fernand Junior Gobeil, Examineur externe

Résumé

L'endothélium constitue un élément primordial dans le maintien de l'homéostasie vasculaire en contrôlant plusieurs fonctions comme le tonus vasculaire. Le contrôle de l'état contractile du muscle lisse vasculaire par l'endothélium est multifactoriel. Notons parmi ces nombreux mécanismes la génération du monoxyde d'azote (NO) identifié comme étant un puissant vasodilatateur ou les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) qui favorisent également la relaxation du muscle lisse sous-jacent. De façon intéressante, ces mécanismes impliqués dans les différentes fonctions endothéliales sont fortement dépendants des concentrations intracellulaires en calcium (Ca^{2+}). Par ailleurs, une altération des dynamiques calciques endothéliales est dénotée en présence de dysfonction endothéliale associée à diverses pathologies telles que l'hypertension artérielle (HA). De ce fait, il est impératif de parfaire notre compréhension des dynamiques calciques endothéliales.

Les études des 10 dernières années ont permis de mettre en lumière l'existence de signalisations calciques locales qui présentent un avantage considérable en termes de ciblage de fonctions spécifiques. Au sein de l'endothélium, une signalisation calcique locale nommée pulsars calciques a été décrite au niveau des projections myoendothéliales (PME) d'artères mésentériques de résistance de souris. Les pulsars calciques sont une libération de Ca^{2+} limitée, spontanée et oscillatoire provenant des récepteurs à l' IP_3 (IP_3R) localisés sur réticulum endoplasmique plongé dans cette PME. Cette structure anatomique est d'intérêt particulier puisqu'elle constitue le seul lieu de contact entre les cellules endothéliales (CE) et les cellules musculaires lisses (CML) de la paroi vasculaire. Il est maintenant reconnu dans la littérature que la PME constitue un microdomaine de signalisation où cohabitent signalisations calciques locales et effecteur dépendants du Ca^{2+} impliqués dans la régulation de l'état contractile des CMLs tels que les canaux potassiques dépendants du Ca^{2+} (K_{Ca}). L'activation des K_{Ca} engendre l'hyperpolarisation de la CE qui est transmise aux CMLs de façon à favoriser leur relaxation.

Nonobstant l'identification de voies de signalisation activées par les pulsars calciques, notre compréhension des mécanismes qui régissent la stochasticité des pulsars calciques restait à établir. Par ailleurs, des études précédentes du laboratoire ont mis en relief une altération des

dynamiques des pulsars calciques en condition pathologique d'HA. Il était donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent les pulsars calciques en condition physiologique afin de pouvoir identifier éventuellement la provenance de ces altérations pathologiques. Dans le cadre de cette thèse, le rôle potentiel de deux mécanismes de régulation a ainsi été évalué. Dans la première étude, il a été possible de démontrer que CaMKII, une kinase reconnue pour son rôle à titre de décodeur d'oscillations calciques, est impliquée dans une boucle de rétroaction négative des pulsars calciques. En effet, son inhibition produit un recrutement de sites actifs de pulsars suggérant que CaMKII peut contrôler négativement le nombre de sites présentant des pulsars calciques. Nous avons également démontré que ce contrôle provient de l'effet de CaMKII sur les IP_3 Rs. Dans la deuxième étude, nous avons évalué l'implication de la mitochondrie qui est reconnue pour agir à titre de barrière calcique dans différents types cellulaires. Nous avons tout d'abord démontré que la mitochondrie présente une localisation préférentielle à l'embouchure de la PME. Par ailleurs, nous avons démontré que le contrôle de la mitochondrie sur la dynamique des pulsars calciques est multifactoriel en étant impliqué dans la dispersion des pulsars ainsi qu'en régulant la nature de l'activité calcique dans la PME. Ces deux mécanismes ont été étudiés en condition physiologique sans stimulation des pulsars calciques démontrant ainsi le rôle de ces derniers en condition basale.

Ainsi, cette thèse a permis de combler un vide dans la littérature en termes de connaissances sur les mécanismes qui régissent les pulsars calciques endothéliaux. Ces études permettront de fournir des pistes potentielles à évaluer dans le cadre de dysfonction endothéliale associée à une altération des dynamiques calciques intracellulaires.

Mots-clés : Endothélium vasculaire, projection myoendothéliale, calcium, pulsar calcique, tonus vasculaire, CaMKII, mitochondrie

Abstract

Endothelial cells (EC) are an important component of the vascular homeostasis. They modulate various vascular functions as vascular tone. The regulation of the smooth muscle cells (SMC) contractile state by the endothelium is multifactorial. Among those various factors, nitric oxide (NO) is identified as a potent vasodilator and the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), which modulates vascular tone by controlling smooth muscle membrane potential. Interestingly, literature shows that both mechanisms involved in endothelial function strongly rely on intracellular calcium (Ca^{2+}) concentration. Moreover, endothelial dysfunction is highly correlated with Ca^{2+} dyshomeostasis as observed in arterial hypertension (AH). In this line of thought, it's crucial to extend our knowledge on how intracellular calcium signalling is regulated.

During the past 10 years, several studies have revealed the important role of targeting specific cellular function by local Ca^{2+} signals. Those evidences rely on the significant improvement in imaging technology. Recently, a new localized Ca^{2+} signalling pathway called Ca^{2+} pulsars has been described in native endothelial cells from mouse mesenteric resistance arteries. Ca^{2+} pulsars are a limited, spontaneous and oscillatory Ca^{2+} release from IP_3 receptor (IP_3R) located on the endoplasmic reticulum membrane within the myoendothelial projections (MEP). The MEP structure is highly interesting because it constitutes the only site where EC and smooth muscle cell (SMC) from the vascular wall can physically interact. It's now largely accepted that MEPs act as microdomains for local Ca^{2+} signals and Ca^{2+} -depend effectors implicated in the SMC contractile state regulation. Ca^{2+} pulsars have been shown to be able to modulate Ca^{2+} -activated potassium channel (K_{Ca}) located on the plasma membrane of the MEP. Once activated, the K^+ efflux will generate the endothelial membrane hyperpolarization, which once transmitted to the underlying SMC will induce their relaxation.

Despite the identification of Ca^{2+} pulsars targeted pathways, little is known about how this local Ca^{2+} signal is regulated. A previous study from the laboratory of Dr. Ledoux has shown an alteration in Ca^{2+} pulsars dynamics in the pathological condition of AH. Consequently, it was essential to extend our knowledge on Ca^{2+} pulsars regulatory mechanisms to be able to identify the possible pathways implicated into this pathological

alteration. In this thesis, two potential regulatory pathways have been investigated. In the first study, the implication of CaMKII, a kinase known to act as a Ca^{2+} sensor, was assessed by showing various activation states of the kinase depending on Ca^{2+} oscillation frequencies. We showed that CaMKII might be involved in a negative feedback loop according to its activation pathway. Inhibition of CaMKII in presence of KN-93 showed an increase in the number of Ca^{2+} pulsars active sites suggesting that CaMKII can control which Ca^{2+} pulsars site can be activated. This first study demonstrated that CaMKII may regulate the number of Ca^{2+} pulsars active sites by modulating IP_3Rs activity. In the second study, we evaluated if the mitochondria could influence Ca^{2+} pulsars pattern. The rationale behind the choice of this potential regulatory mechanism is that mitochondria can act as a Ca^{2+} barrier in different cell types. We showed that mitochondria are preferential localized in front of the MEP in mouse mesenteric arteries. Furthermore, we demonstrated that regulation of Ca^{2+} pulsar dynamics by mitochondria is multifactorial. This organelle is involved in Ca^{2+} pulsars dispersion by its ability to reuptake intracellular Ca^{2+} . In addition, mitochondria seems to be important to set the Ca^{2+} pulsar activity level probably by modulating the Ca^{2+} environment around the IP_3Rs within the MEP. The impact on Ca^{2+} pulsars activity level may be mediated by mitochondria Ca^{2+} efflux mechanisms. In both studies presented in this thesis, the two mechanisms (CaMKII and mitochondria) have been studied in physiological conditions without any Ca^{2+} pulsars stimulation suggesting their role in basal control of Ca^{2+} pulsars dynamics.

Thereby, both studies have filled a gap of knowledge regarding how the Ca^{2+} pulsar stochasticity is established in physiological conditions. This work brings out new avenues to investigate in endothelial dysfunction associated with intracellular Ca^{2+} homeostasis alteration.

Keywords: Vascular endothelium, myoendothelial projection, calcium, calcium pulsar, vascular tone, CaMKII, mitochondria

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Table des figures	x
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xix
1. Introduction.....	1
1.1. Le système cardiovasculaire.....	1
1.1.1 Les composantes du système vasculaire.....	1
1.1.1.1 Le système vasculaire artériel (circulation systémique)	1
1.1.1.1.1 L'arbre artériel	2
1.1.1.1.2 La structure artérielle	3
1.1.1.1.3 Les cellules endothéliales	5
1.1.1.1.4 Les cellules musculaires lisses.....	5
1.1.1.1.5 La projection myoendothéliale	7
1.1.1.2 Le système vasculaire veineux (circulation systémique).....	9
1.2. L'endothélium vasculaire.....	9
1.2.1 L'endothélium, bien plus qu'une barrière	10
1.2.2 L'hétérogénéité de l'endothélium.....	10
1.2.3 Les fonctions endothéliales.....	12
1.2.3.1 L'angiogenèse et l'artériogenèse	12
1.2.3.2 L'adhésion et l'agrégation plaquettaire	13
1.2.3.3 La perméabilité vasculaire	14
1.2.3.4 Le tonus vasculaire	15
1.2.3.4.1 Régulation endothéliale de la relaxation des CML.....	16
1.2.3.4.1.1 Monoxyde d'azote (NO).....	16

1.2.3.4.1.2 La prostacycline (PGI ₂).....	17
1.2.3.4.1.3 Les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF).....	19
Les canaux potassiques Ca ²⁺ -dépendants (K _{Ca}) et le potassium (K ⁺).....	19
Les jonctions communicantes GAP	21
Les dérivés des acides arachidoniques (AA)	21
Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	22
1.2.3.4.2 Régulation endothéliale de la contraction des CML.....	22
La thromboxane A ₂ (TXA ₂)	22
L'angiotensine II (ANGII).....	24
L'endothéline-1 (ET-1).....	25
1.3. Le calcium endothélial.....	25
1.3.1 L'origine du calcium cytosolique endothélial.....	26
1.3.1.1 Le réticulum endoplasmique.....	26
1.3.1.1.1 La libération de calcium par les récepteurs à l'IP ₃	27
1.3.1.1.2 La recapture du calcium par la pompe SERCA	31
1.3.1.2 La mitochondrie	32
1.3.1.3 Le milieu extracellulaire	32
1.3.1.3.1 Mécanisme d'influx calcique du milieu extracellulaire.....	33
1.3.1.3.2 Mécanismes d'efflux calcique vers le milieu extracellulaire.....	35
1.3.2 Les dynamiques calciques endothéliales	37
1.3.2.1 Les dynamiques d'ordre global.....	37
1.3.2.2 Les dynamiques d'ordre local.....	39
1.3.2.2.1 Les pulsars calciques.....	40
1.3.2.2.2 Les «TRP <i>sparklets</i> »	43
1.3.2.2.3 Les calcium « <i>blips</i> » et calcium « <i>puffs</i> ».....	46
1.4. La protéine kinase II dépendante du complexe Calcium-Calmoduline («CaMKII»)47	
1.4.1 Les bases de l'enzyme CaMKII	48
1.4.1.1 Structure et particularité des isoformes.....	48
1.4.1.2 Mécanismes d'activation	49
1.4.1.3 CaMKII : les outils pharmacologiques et moléculaires.....	52

1.4.2 Les fonctions de CaMKII	53
1.4.2.1 CaMKII et les neurones	54
1.4.2.2 CaMKII et les cardiomyocytes	56
1.4.2.3 CaMKII et les cellules musculaires lisses.....	59
1.4.3 CaMKII et l'endothélium.....	63
1.4.3.1 Les isoformes exprimées dans les cellules endothéliales	63
1.4.3.2 Les fonctions endothéliales régulées par CaMKII.....	64
1.5. La mitochondrie.....	67
1.5.1 Dynamiques mitochondriales.....	68
1.5.1.1 Structure et morphologie mitochondriale	68
1.5.1.2 Biogenèse : fusion et fission mitochondriale	69
1.5.1.3 Motilité mitochondriale	70
1.5.1.4 Altérations pathologiques	71
1.5.2 La production d'ATP	71
1.5.2.1 La production d'énergie cytosolique	71
1.5.2.2 La production d'énergie mitochondriale.....	72
1.5.3 Les espèces réactives d'oxygène («ROS»).....	73
1.5.3.1 La production de ROS mitochondriales.....	74
1.5.3.2 Les ROS mitochondriaux dans la fonction endothéliale.....	74
1.5.4 La mitochondrie et les dynamiques calciques	75
1.5.4.1 Le transport du calcium mitochondrial	75
1.5.4.1.1 L'entrée de Ca ²⁺ mitochondrial	75
1.5.4.1.2 La sortie de Ca ²⁺ mitochondrial.....	79
1.5.4.2 Microdomaines : mécanismes d'ancrage de la mitochondrie au réticulum endoplasmique	81
1.5.4.3 Mitochondries : façonner les dynamiques calciques intracellulaires.....	83
2. Objectifs des études.....	86
2.1 Mise en contexte des études.....	86
2.2 Étude 1	87
2.2.1 Hypothèse	87

2.2.2 Objectifs spécifiques.....	88
2.3 Étude 2	88
2.3.1 Hypothèse	89
2.3.2 Objectifs spécifiques.....	89
3. Articles	91
3.1 Article 1.....	91
3.1.1 Apport original et contribution des coauteurs.....	91
3.1.2 Manuscrit	92
3.2 Article 2.....	127
3.2.1 Apport original et contribution des coauteurs.....	127
3.2.2 Manuscrit	128
4. Discussion	156
4.1 Sommaire du fondement de la thèse.....	156
4.2 Sommaire des nouvelles découvertes	156
4.3 CaMKII en hétéromultimère : favoriser une localisation optimale de l'enzyme.	158
4.4 CaMKII constitue un régulateur des pulsars calciques <i>via</i> les IP₃Rs	160
4.5 Les pulsars calciques découlent des isoformes d'IP₃R associés aux signaux calciques oscillatoires.....	164
4.6 Microdomaine calcique : positionnement stratégique de la mitochondrie dans l'endothélium.....	166
4.7 La modulation des pulsars calciques par la mitochondrie est multifactorielle.....	170
4.8 Relation entre CaMKII, les mitochondries et les pulsars calciques : de nombreuses interactions possibles.	175
4.9 Altération mitochondriale : relation potentielle avec la dysfonction endothéliale et la dynamique des pulsars calciques.....	177
4.10 La PME est-elle un microdomaine gouverné par les concentrations locales d'ATP mitochondriale?.....	178
4.11 Limitations imposées par le modèle d'étude utilisé	180
5. Conclusion	183

7. Bibliographie	186
Annexe 1 : Liste de publications	i

Table des figures

Figure 1. Schématisation simplifiée de la structure de la paroi vasculaire artérielle.....	5
Figure 2. Schématisation simplifiée du mécanisme de contraction du muscle lisse.....	6
Figure 3. Image représentative d'une projection myoendothéliale d'artère de muscle squelettique de hamster	8
Figure 4. Schématisation de l'hétérogénéité de l'endothélium.....	11
Figure 5. Mécanisme d'agrégation plaquettaire à la paroi vasculaire.	14
Figure 6. Mécanismes de production de l'oxyde nitrique et de l'anion superoxyde par la NOS-3.	16
Figure 7. Schématisation simplifiée des mécanismes d'actions du monoxyde d'azote et de la prostacycline.....	18
Figure 8. Schématisation simplifiée des mécanismes impliqués dans l'EDHF.....	20
Figure 9. Schématisation simplifiée des mécanismes de contraction dépendants de l'endothélium.	23
Figure 10. Protéines impliquées dans les dynamiques calciques reliées au réticulum endoplasmique dans l'endothélium natif.....	28
Figure 11. Effet de l'ATP sur la probabilité d'ouverture du récepteur à l'IP ₃ de type 3.	30
Figure 12. Protéines impliquées dans les dynamiques calciques reliées au milieu extracellulaire et à la membrane plasmique.....	33
Figure 13. Schématisation simplifiée du mécanisme du SOCE.....	34
Figure 14. Schématisation simplifiée des voies de signalisation menant à une augmentation intracellulaire d'ordre global de calcium.	38
Figure 15. Schématisation simplifiée des pulsars calciques endothéliaux.	40
Figure 16. Schématisation simplifiée des mécanismes de régulation des <i>TRPA1 sparklets</i> et <i>TRPV4 sparklets</i> endothéliaux.....	44
Figure 17. Schématisation simplifiée des <i>Ca²⁺ puffs</i> et <i>Ca²⁺ blips</i> endothéliaux.....	46
Figure 18. Structure et mécanismes d'activation de CaMKII.	50
Figure 19. Niveau d'activité de CaMKII en fonction des oscillations calciques.....	52
Figure 20. Schématisation simplifiée des fonctions de CaMKII dans le neurone.....	55

Figure 21. Schématisation simplifiée des fonctions de CaMKII dans le cardiomyocyte..	57
Figure 22. Rôle de CaMKII dans la progression du cycle cellulaire des cellules musculaires lisses.	60
Figure 23. Voies de signalisation modulées par CaMKII et pouvant contrôler la contraction de la cellule musculaire lisse.	61
Figure 24. Régulation de la NOS-3 par CaMKII.	67
Figure 25. Schématisation simplifiée du mécanisme de motilité mitochondriale.	70
Figure 26. Schématisation simplifiée du complexe mCU.	77
Figure 27. Schématisation simplifiée des MAMs.	82
Figure 28. Schématisation simplifiée de la barrière calcique mitochondriale.	84
Figure 28. Mise à jour de la caractérisation des pulsars calciques incluant les résultats obtenus et présentés dans cette thèse.	185

Liste des abréviations

$\Delta\psi_m$: Différence de potentiel membranaire mitochondriale

2-APB : 2-Aminoethoxydiphenyl borate

AA: Acides arachidoniques

ACE: Enzyme de conversion de l'angiotensine

ACh: Acétylcholine

ADP: Adénosine diphosphate

AIP : *Autocamtide-2 related Inhibitory Peptide*

AITC : Allyl isothiocynate

AMPA: Récepteur à l'acide 2-Amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoazol-4-yl propaioic

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

ANGII : Angiotensine II

ARNm : ARN messenger

ARNi : ARN interférent

AT₁ : Récepteur à l'angiotensine II de type 1

AT₂ : Récepteur à l'angiotensine II de type 2

ATP: Adénosine triphosphate

BAEC: *Bovine arterial endothelial cell*

BH₄: Tétrahydrobioptérine

BK : Bradykinine

BK_{Ca}: Canaux K⁺ de grande conductance dépendants Ca²⁺

BREC : *Bovine retinal endothelial cell*

Ca²⁺: Calcium

Ca²⁺/CaM : Calcium/Calmoduline

Ca_v1.2 : Canaux calciques dépendants du voltage de type-L

Ca_v2.1 : Canaux calciques dépendants du volage, isoforme 2.1

CaM : Calmoduline

CaMKII : Protéine kinase II dépendante du complexe Ca²⁺/CaM

CCE : *Capacitive calcium entry*

CCCP : Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone

Cdk : *Cyclin-dependent kinase*

CE: Cellule endothéliale
CICR: *Ca²⁺ induced-Ca²⁺ release*
Cl⁻: Chlore
CML: Cellule musculaire lisse
CO₂: Dioxyde de carbone
COX: Cyclo-oxygénases
CPA: Acide cyclopiazonique
CPAE: *Calf pulmonary artery endothelial cell*
CRAC: *Calcium release activated channel*
CsA: Cyclosporine A
CyP-D: Cyclophiline D
Cx: Connexine
DAG: Diacylglycérol
Drp1 : *Dynamin related protein 1*
EDCF: Facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium
EDHF : Facteurs hyperpolarisants dépendants de l'endothélium
EDRF : Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium
Epac : Protéine d'échange activée par l'AMPC
EET : Acides époxyeicosatriénoïque
ET-1 : Endothéline-1
ET_A : Récepteur à l'endothéline de type A
ET_B : Récepteur à l'endothéline de type B
eNOS/NOS-3 : Oxyde nitrique synthase endothéliale
FAD: Flavine adénine dinucléotide
FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide à l'état réduit
FCCP : Carbonyl cyanide p-trifluorométhoxyphényl hydrazone
FMN: Flavine mononucléotide
GCs : Guanylate cyclase soluble
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GPCR: Récepteur à 7 passages transmembranaires couplé aux protéines G
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HA : Hypertension artérielle

HDAC : Histones désacétylases
 HDMEC : *Human dermal microvessel endothelial cell*
 HETE : Acides hydroxyeicosatetraenoïques
 HIF- α : *Hypoxia inductible factor*
 HUVEC : *Human umbilical vein endothelial cell*
 I_{CRAC} : Courant des canaux activés par la libération de Ca^{2+}
 I_{Kr} : Courant potassique rectifiant
 I_{Cl} : Courant chlore
 IP : Récepteur de la prostacycline
 IP_3 : Inositol 1,4-5 triphosphate
 IP_3R : Récepteur à l' IP_3
 IP_3R1 : IP_3R type 1
 IP_3R2 : IP_3R type 2
 IP_3R3 : IP_3R type 3
 K^+ : Potassium
 K_{ATP} : Canaux potassiques modulés par l'ATP
 K_{Ca} : Canaux potassiques Ca^{2+} -dependants
 $K_{Ca2.3}/SK_{Ca}$: K_{Ca} isofome 2.3 ou K_{Ca} de conductance intermédiaire
 $K_{Ca3.1}/IK_{Ca}$: K_{Ca} isofome 3.1 ou K_{Ca} de faible conductance
 K_d : Constante d'affinité/affinité apparente
 K_{ir} : Canaux potassiques à rectification entrante
 K_v : Canaux potassiques voltage-dépendants
 KN-62 : 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-méthyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine
 KN-93 : N- [2-[[[3- (4'-Chlorophenyl) -2-propényl] méthylamino] méthyl] phényl] -N- (2-hydroxyéthyl)- 4'-methoxybenzenesulfonamide
 LEE : Lamina élastique externe
 LEI : Lamina élastique interne
 Li^+ : Lithium
 L-NAME : L-N^G-Nitroarginine methyl ester
 mCU : *Mitochondria Calcium Uniporter*
 MCU1/2 : *Mitochondrial Calcium Uptake 1/2*
 MCUR1 : *Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1*

MEM : Membrane externe mitochondriale
Met : Méthionine
Mff : *Mitochondrial fission factor*
MIM : Membrane interne mitochondriale
MLCK : Kinase des chaînes légères de myosine
MLCP : Phosphatase des chaînes légères de myosine
MCP-1 : Molécule chemoattractante de monocyte 1
MMP : *Matrix metalloproteinase*
mPTP : *Mitochondrial permeability transition pore*
Mtf1/2 : Mitofusine 1/2
Na⁺ : Sodium
Na_v : Canaux sodiques voltage-dépendants
NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide à l'état réduit
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate à l'état réduit
NMDAR : Récepteur à l'acide N-Methyl-D-aspartate
NOX : NADPH oxidase
NCLX : Échangeur sodium/calcium mitochondrial
NCX : Échangeur sodium/calcium
NO: Monoxyde d'azote
O₂: Oxygène
O₂^{•-}: Anion superoxyde
P₀: Probabilité d'ouverture d'un canal ionique
PA: Pression artérielle
PAEC: *Pulmonary arterial endothelial cell*
PDGF: *Platelet-derived growth factor*
PGH₂: Prostaglandines H₂
PGI₂: Prostacycline
PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA: Protéine kinase A
PKG: Protéine kinase G
PLA₂: Phospholipase A₂

PLC: Phospholipase C
PLB: Phospholamban
PMCA: *Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*
PME: Projection myoendothéliale
PTGIS: Prostacycline synthase
RBEC: *Rat brain endothelial cell*
RE: Réticulum endoplasmique
ROS: *Reactive oxygen species*
RyR: Récepteur à la ryanodine
RyR2: Récepteur à la ryanodine de type 2
RS: Réticulum sarcoplasmique
S: Simens
Ser: Sérine
SERCA: *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase*
siRNA : *silencing RNA*
SNAP : S-Nitroso-N-Acetyl-D, L-Penicillamine
SOCE : *Store-Operated Ca²⁺ Entry*
STIM1 : *Stromal interaction molecule 1*
TIRF : *Total internal reflection fluorescence microscopy*
Thr : Thréonine
TP : Récepteur de la TXA₂
TRP: *Transient receptor potential*
TXA₂: Thomboxane A₂
UCP2/3 : *Uncoupling protein 2/3*
VDAC : *Voltage-dependent anion channel*
VDCC : Canaux calciques voltage-dépendants
VEGF: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR-2: Récepteur de type 2 du VEGF
vWF: Facteur de von Willebrand

«Education is not the learning of facts but the training of the mind to think.»

«L'éducation n'est pas l'apprentissage de faits, mais l'entraînement de l'esprit à réfléchir.»

- Albert Einstein

Remerciements

Aux membres de mon jury

Je tenais à vous remercier d'avoir accepté de siéger sur comité d'évaluation de thèse. Je sais à quel point l'emploi du temps d'un chercheur est chargé. Merci d'avoir accepté de prendre du temps pour moi en révisant mon travail. Je suis convaincue que votre apport fera de cette thèse ma fierté.

À mon directeur de recherche, Jonathan Ledoux

Jonathan, cette thèse est la tribune parfaite pour te remercier et t'exprimer à quel point ton implication dans mon développement a été appréciée. Tu m'as donné ma première chance à titre de stagiaire d'été et tu n'as malheureusement pas réussi à te débarrasser de moi par après puisque j'ai choisi de poursuivre l'ensemble de mes études aux cycles supérieurs dans ton laboratoire. Le monde de la recherche n'est pas toujours évident. Malgré tout, notre réussite a toujours été au cœur de tes priorités. Tu m'as permis de devenir une scientifique accomplie, épanouie, débrouillarde, versatile et qui a confiance en ses capacités. Tu m'as donné de nombreuses opportunités pour me permettre de développer mes aptitudes de présentations, dont un très grand nombre en congrès internationaux. Tu m'as fait sortir de ma zone de confort en m'offrant l'occasion d'aller deux semaines complètes dans un laboratoire collaborateur en Virginie ce qui m'a forcé à me débrouiller en anglais et ce qui m'a fait comprendre qu'une fois la gêne mise de côté, j'étais amplement capable de me débrouiller! Cependant, ton implication dans mon développement ne s'est pas arrêtée à l'aspect scientifique. Tu as également été un ami et un confident. Tu m'as supporté au travers des épreuves que j'ai eu à franchir dans ma vie personnelle. Tu m'as permis de devenir une meilleure personne et pour cela, je t'en remercie. Finalement, je ne peux passer sous silence la transmission de ta passion pour la course (après tout ce temps, je dois malheureusement venir à l'évidence que j'aime ça). Ainsi, j'ai pu effectuer mon premier demi-marathon en septembre dernier. Ce n'est pas rien, et c'est grandement grâce à toi. Tu étais sur la ligne d'arrivée avec ta famille pour nous encourager Chimène et moi. Je suis certaine que ce n'est pas tous les

étudiants qui ont la chance de vivre ça! Ainsi, pour toutes ces raisons et plusieurs autres, merci!

À Alexandre Blanchette

Blanchette Alexaaandeeer ! Le « Buffer du lab », le meilleur assistant de recherche au monde, mon support des 7 dernières années. Jamais des mots ne pourront être assez bien choisis pour transmettre toute la reconnaissance que je peux avoir envers toi. Tes nombreux « Come on ! » m'auront permis de garder ma motivation au fil des épreuves. À chaque questionnement qui surgissait dans ma tête, tu prenais le temps de le décortiquer avec moi et de m'aider à trouver réponse ou solution. Toutes ces années, tu as été présent au laboratoire pour t'assurer que je puisse évoluer dans un environnement adéquat. Par contre, nos journées ne se sont jamais limitées qu'au travail. Combien de fois tu as dû endurer mes histoires de filles, mes histoires de cheveux ou de vernis à ongles, mes histoires de gym ou même mes histoires de « dates ». Sérieusement, c'est presque triste que tu n'aies eu que des garçons parce que j'ai l'impression que tu aurais été bien équipé pour comprendre ce que des filles auraient vécu. Merci d'avoir été là pour moi sur le plan personnel et professionnel. Ne plus te côtoyer tous les jours sera assurément étrange et j'espère que nous garderons contact.

À Chimène Charbel

Ma belle amie, ma merveilleuse amie. Tu es entrée dans ma vie un mois de mai 2010 lorsque j'effectuais mon premier stage d'été dans le laboratoire. Encore aujourd'hui, je me rappelle la première impression que tu m'as laissée. Dès la première rencontre, je pouvais savoir que j'avais affaire à une femme exceptionnelle, forte, fonceuse, affirmée, confiante, enjouée et qui mort dans la vie. Aujourd'hui, je pourrais rajouter une longue liste de qualificatifs à celle déjà dressée après seulement quelques heures en ta compagnie. Tous les gens qui t'entours pourraient affirmer tout comme moi que nous sommes réellement choyés de pouvoir t'avoir dans nos vies. Je connais peu de personnes aussi vraies et surtout, peu de personnes qui nous permettent de faire ressortir en tout temps le meilleur de nous-mêmes. Tu m'auras transmis ta passion pour la science, mais également tes nombreuses manies comme ton souci du détail parfois excessif, ce n'est pas un secret :). Par contre, le plus important restera à mon avis toute la confiance que tu m'as permis de prendre autant sur le plan professionnel que personnel.

Sincèrement, je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui si je ne t'avais pas croisé sur mon chemin. Pour ce que tu es, pour ton amitié sans limites, pour tes nombreux conseils, pour ton support continu et pour ton apport majeur à mon développement scientifique, je souhaite te dire merci.

À Delphine Béziau

Delphino, ma chère Delphino. Il y a déjà quelque temps que tu es retournée en France après près de 3 années à se côtoyer quotidiennement au laboratoire. Durant toutes ces années (et encore aujourd'hui, malgré que tu sois de l'autre côté de l'océan... mais attends, es-tu vraiment de l'autre côté de l'océan ? ... C'est où ça la France...? Ce n'est pas près du Texas au Mexique par hasard? ;) ... Ok, Ok, je blague ! Je sais quand même où c'est la France), tu as été pour moi comme une grande sœur, au laboratoire, mais également dans ma vie personnelle. Je peux me retourner n'importe quand vers toi pour obtenir des conseils judicieux et réfléchis. Tu me permets de rationaliser, de reprendre confiance en moi et de foncer à nouveau. Pour ton support perpétuel dans toutes les sphères de ma vie, pour ton implication dans le projet mitochondrie et pour le temps que tu m'as accordé pour cette thèse, je te remercie.

À Marianne Berlatie

Nous sommes tous un peu « le mini » de quelqu'un en recherche. J'étais « la mini » de Chimène puisque c'est elle qui m'a tout appris. J'ai un peu l'impression que tu étais « ma mini ». Tu reprends le flambeau du projet mitochondrie et je ne suis pas inquiète que ta persévérance et ton souci du détail le mènent à bon port. T'enseigner les rouages de la recherche aura réellement été un plaisir. Merci d'avoir mis autant de bonheur dans mes journées durant la dernière année. Merci pour ton support et merci d'avoir toujours été là pour me fournir en café lors de la rédaction de cette thèse.

Aux employés et collègues du centre de recherche

Nous sommes choyés en tant qu'étudiant de pouvoir évoluer dans un environnement tel que l'Institut de Cardiologie de Montréal. Ce centre de recherche regorge de chercheurs passionnés, de mentors d'exceptions et d'employés attentionnés qui ont tous à cœur notre

développement en tant que scientifique. Durant mes 7 années dans ce centre de recherche, j'ai eu la chance de côtoyer des gens extraordinaires qui ont rendu mon parcours beaucoup plus agréable. Je ne peux malheureusement pas nommer tout le monde, mais j'ose espérer que mon attitude envers vous jour après jour à su vous démontrer et vous faire ressentir toute mon appréciation et ma reconnaissance. Je prendrais tout de même le temps de remercier plus particulièrement Louis Villeneuve avec qui j'ai grandement appris sur la microscopie et qui m'a offert sa confiance pour utiliser « ses » fameux microscopes de façon autonome ! Louis, par ton humour et ta personnalité débordante, tu as littéralement rendu mon parcours à l'Institut beaucoup plus joyeux. J'aimerais aussi remercier plus personnellement Nathalie Éthier. Ma belle Nath, je ne sais pas si tu sais à quel point ton support moral et tes nombreux conseils ont été précieux à mes yeux. Merci d'avoir toujours été là pour moi au courant des dernières années. Je vais m'ennuyer des CRCQ en ta compagnie. Un gros merci à mon amie Andréanne Chabot. Je suis tellement heureuse de t'avoir croisé sur mon passage. Ta joie de vivre contagieuse et ton amour du rire m'ont permis de passer de très beaux moments en ta compagnie ici, à l'Institut, mais également en dehors. Ton support des dernières années est inestimable. Finalement, ma belle Andrea Milasan. Ta rencontre aura été un vrai coup de coeur. Ta personnalité attachante et ton enthousiasme débordant auront permis de mettre de la vie dans ce centre de recherche et dans mon parcours universitaire. Au fil des dernières années, nous avons développé une amitié qui m'est chère. Merci d'avoir toujours été là pour moi!

À Adeline Raignault

Ma petite Adeline. Par où commencer ? Notre rencontre au début de mon Ph.D aura été un vrai cadeau. Je me souviendrai toujours de ce fameux cours de pharmacologie cardiovasculaire où nous devons former des équipes pour un travail de session. Te connaissant aujourd'hui, j'imagine tout le courage que ça a dû te prendre à ce moment-là pour venir vers Andréanne et moi pour te joindre à nous. Surtout qu'on ne se le cachera pas. Toutes les deux ensemble, on peut être quelque chose ! Au fil des années, je t'ai vu évoluer. Je t'ai vu grandir en tant que femme. Tu as pris de la maturité, mais surtout tu as acquis une confiance qui aujourd'hui est inestimable. Bon nombre de personnes savent que nous avons été coloc pendant près de 14 mois. Un 14 mois sans tracas, de cohabitation équilibrée et dans le

respect ! Sincèrement, je te remercie encore une fois d'avoir accepté de faire le saut, parce que parfois, partir en coloc ça brise des amitiés. Dans notre cas, ça ne l'a que renforcie. Maintenant, tu es de retour en France et tu me manques beaucoup, mais nous nous reverrons très bientôt.

À Jessica Millette

Ma chère Jessica ! Il y a bientôt quelques mois, tu es arrivée dans ma vie avec des chaussures quand même assez difficiles à chausser. Tu prenais la place dans cet appartement d'une amie très chère dans mon cœur avec qui la cohabitation était si facile. À ce moment-là, on se connaissait à peine, mais tu es entrée dans ma vie comme un vrai rayon de soleil rafraichissant. Ton état d'esprit était exactement ce dont j'avais besoin à cette étape de ma vie. Être en colocation avec toi, c'est une vraie partie de plaisir ; et jamais des mots n'auront dû être autant pris au sens littéral. Nos histoires de vie se ressemblent. Peut-être que c'est pour cela que j'ai l'impression que nous sommes exactement sur la même longueur d'onde. Il y a quelques mois, j'avais une nouvelle coloc. Maintenant, je suis persuadée que j'ai une amie pour la vie. Tu auras vu naître ma thèse avec moi, on ne peut pas dire le contraire. Merci de m'avoir autant supporté durant les derniers mois. Merci d'être ce que tu es et merci de me permettre d'être moi-même à tous les jours sans aucune retenue.

À mes «vieilles copines», Marie-Pier, Sarah, Andréa, Audrey et Alexandra

À vous mes chères amies qui me suivent depuis maintenant un très grand nombre d'années. Près de 24 ans en ce qui vous concerne, Marie-Pier et Sarah, et bientôt près de 18 ans pour vous Audrey, Andréa et Alexandra. Nous avons cheminé depuis notre enfance. De jeunes filles naïves, nous sommes devenues des jeunes femmes réfléchies, accomplies et qui foncent dans la vie malgré tout ce que celle-ci décide de mettre au travers de nos chemins. Lorsque je regarde le groupe que nous sommes devenues, je ne peux qu'éprouver que de la fierté. Chacune, nous avons poursuivi nos chemins dans le seul but de faire précisément ce qui pouvait nous rendre heureuses. De nos jours, bon nombre de personnes s'arrêtent avant, mais ce n'est pas votre cas. Je suis sincèrement choyée de pouvoir faire partie d'un groupe d'amies comme le nôtre. Malgré les années qui passent, les obligations qui s'ajoutent et les familles qui grandissent, nous sommes encore toutes là les unes pour les autres. Je voulais donc profiter

de cette tribune pour vous remercier d'avoir toujours été là pour moi et vous dire à quel point je vous aime. <3

À la famille Brissette, à Alexandre

Le temps passe, les choses changent. Toutefois, il est impossible d'effacer le passé. En ce sens, je me dois de vous remercier, pour votre soutien, pour votre confiance, pour toutes les énergies positives que vous m'avez données au cours de la quasi-entièreté de mes études supérieures. Vous avez toujours cru en moi et en mes capacités et pour cela, je tenais à vous dire merci.

Alexandre. Peut-être qu'aujourd'hui, nos chemins se sont séparés. Cependant, cette thèse, elle te revient un peu aussi. Durant mon cheminement universitaire, à presque toutes les étapes cruciales, tu étais celui qui m'encourageait et qui me permettait de prendre les décisions qui me plaisaient afin de combler mes aspirations en termes d'éducation. Nos vies ont pris des directions différentes. Par contre, il faut donner à César ce qui revient à César. Ainsi, je tenais à te remercier pour ton précieux support.

À ma famille

À mon père

Notre relation n'a pas toujours été rose. Malgré tout, si j'ai pu me rendre aussi loin à l'Université, c'est également grâce à ton implication. Même si nos interactions ne sont pas aussi fréquentes qu'elles pourraient l'être, je sais que tu es fier de moi et que tu me supporteras toujours dans mes rêves et pour cela, je t'en remercie.

À David et Marie-Anick

Frérot ! Les obligations de la vie font qu'on ne se voit pas aussi souvent que je le voudrais. Par contre, tu as toujours été là pour m'encourager dans mes projets et dans mes études. De par ta persévérance et tes accomplissements, tu m'as démontré qu'aucun obstacle n'est insurmontable et que tout vient à qui sait attendre (mais quelle expression étrange, nous devrions plutôt dire à qui sait travailler pour!). Récemment, Marie-Anick et toi avez eu une belle cocotte, Flavie. J'ai eu le bonheur d'être désignée marraine. Je ne sais pas dans quelle

mesure je pourrai lui transmettre ma passion pour la science, mais j'ose espérer être un modèle positif dans sa vie. Marie, tu es une belle-sœur remarquable. Ta joie de vivre et ton sens de l'humour font de toi une personne réellement agréable à côtoyer. Je suis choyée d'avoir dans ma vie un modèle de femme forte qui se rend toujours au bout de ses ambitions. À vous deux, vous faites sincèrement de merveilleux modèles de vie et je vous remercie.

À Stéphan

Stéphan. Je crois que ta curiosité, ton sens de la précision et ton sens du questionnement auront fortement participé à mon désir de poursuivre mes études aussi loin. Depuis plus de 20 ans que tu partages la vie de maman et par le fait même, la mienne. Je ne serais probablement pas la personne que je suis et je ne serais surtout pas la scientifique que je suis aujourd'hui si tu n'avais pas fait partie de ma vie. Je me souviens encore du début de mon processus universitaire lorsque l'on soupait tous ensemble à la maison et que je voulais vous expliquer des concepts que j'avais appris à l'école. Tu m'amenaient à mieux vulgariser ces concepts en me faisant prendre conscience des choses moins évidentes pour ceux hors du domaine. Tu m'encourageais à aller plus loin dans mes raisonnements et à ne pas me limiter à ce que j'avais appris. Pour toutes les valeurs que tu as su m'inculquer au fil des 20 dernières années et pour ton support inconditionnel tant moral que financier comme si j'étais ta propre fille, 1000 mercis.

À la famille St-Denis

À vous chère famille St-Denis. Depuis mon arrivée dans votre famille, vous m'avez réellement fait sentir comme si j'en faisais partie intégrante. À chaque rencontre, vous vous êtes toujours intéressés à la progression de mes études. Chaque fois, vous m'avez encouragé à persévérer. Chaque fois, vous vous êtes réjouis de mes réussites et chaque fois, j'avais l'impression que vous étiez fiers du chemin que j'avais parcouru et ça me fait chaud au cœur. Pour votre support des dernières années, je vous remercie.

À ma mère

Maman, mon modèle. Cette thèse est visuellement le fruit de mon travail, puisque c'est mon nom qui est inscrit sur la première page. Par contre, il est essentiellement le produit de ce que

tu as créé en moi au fil des 29 dernières années. Depuis que je suis toute petite, tu m'as toujours encouragé. Tu t'es battue pour moi, pour que je puisse aller jusqu'au bout de mes études, au bout de mes ambitions, et ce, dans les meilleures conditions que possible. Peut-être que je n'étais pas la meilleure à l'école en français ou en mathématique, d'ailleurs je n'ai jamais été capable d'apprendre mes « tables » et que dire de mes talents en orthographe ou en grammaire; mais jamais tu ne m'as découragé et toujours tu m'as enseigné à persévérer et à passer au travers des embûches qui se sont dressées au travers de mon chemin. Il serait impossible d'écrire en quelques lignes ici à quel point je suis reconnaissante d'avoir eu autant de soutien de ta part. Le soutien moral est assurément essentiel. Par contre, je ne peux passer sous silence l'importance du soutien financier que tu m'as apporté puisque nous n'avons pas tous autant de chance. Cet aspect constitue une des préoccupations premières de tous étudiants aux cycles supérieurs. Je suis extrêmement choyée puisque tu t'es toujours assurée que ce ne le soit pas pour moi. Pour cela et pour tout le reste, je t'en serai éternellement reconnaissante.

Pour toi maman

1. Introduction

1.1. Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est composé de deux éléments principaux : (1) le cœur qui a pour fonction de propulser le sang vers (2) le réseau vasculaire qui permet de distribuer le sang à l'ensemble de l'organisme. Ces deux éléments complexes travaillent de concert pour permettre à l'ensemble des organes et des cellules de l'organisme d'obtenir les composés nécessaires afin d'effectuer leurs fonctions. Le cœur et le réseau vasculaire sont interdépendants signifiant ainsi qu'une modification au niveau cardiaque a immédiatement des répercussions importantes sur le réseau vasculaire et *vice versa* [10]. Dans la prochaine section, une attention particulière sera portée vers le système vasculaire artériel puisqu'il est le principal élément étudié dans le cadre de cette thèse.

1.1.1 Les composantes du système vasculaire

Le système vasculaire regroupe l'ensemble des vaisseaux permettant la circulation du sang au travers de l'organisme que ce soit le sang oxygéné (*via* le système vasculaire systémique artériel ou veineux pulmonaire) ou désoxygéné (*via* le système vasculaire systémique veineux ou artériel pulmonaire). Les contraintes physiques induites par la localisation (*Ex.* artère localisée dans le cœur et subissant les contrecoups de la contraction rythmique cardiaque) ou la fonction du vaisseau (*Ex.* veine fémorale impliquant un retour du sang désoxygéné vers le haut du corps contre la gravité) impliquent des spécificités vasculaires [11, 12]. Bien que la circulation pulmonaire possède des caractéristiques distinctes de la circulation systémique de par son environnement spécifique, seul le système vasculaire de la circulation systémique sera décrit dans cette thèse.

1.1.1.1 Le système vasculaire artériel (circulation systémique)

Le système vasculaire artériel est un réseau structuré et complexe de vaisseaux qui varient physiologiquement entre autres en fonction de leur proximité avec le cœur. Par exemple, une artère située à proximité du cœur aura généralement un plus grand diamètre en

partie pour accommoder l'afflux important de sang provenant du cœur. Ces artères sont dites «de conduction». Plus on s'éloigne du cœur, moins les artères ont une fonction de conduction et elles sont plutôt caractérisées comme étant des artères «de résistance». Ces concepts de conduction et de résistance seront développés plus en détail dans la prochaine sous-section.

1.1.1.1 L'arbre artériel

L'arbre artériel se décompose en 3 principales composantes. Tout d'abord, on y retrouve les artères de gros calibre (1) formant la macrocirculation dont la terminologie dans la littérature peut varier (conduction, élastique, compliance). Les fonctions spécifiques de ce type d'artère reposent sur leur capacité d'accueillir le volume sanguin à la sortie du cœur et d'absorber la pulsativité du débit sanguin générée par les cycles de contractions cardiaques, principe physiologique nommé «effet Windkessel» décrit vers la fin du 19^e siècle par Otto Frank [13]. Cette capacité à absorber les pulsativités cardiaques et de transformer le débit pulsé en débit continu et constant est primordiale afin d'éviter les dommages au niveau des organes de destination. En effet, il a été largement démontré qu'une augmentation de la rigidité artérielle limite l'absorption des pulsativités par les artères de conduction propageant ainsi l'onde de pouls dans la microcirculation ce qui engendre des dommages au niveau cérébral ou rénal [14, 15]. Il est important de mentionner que les artères de conductance sont dépourvues de tonus myogénique; *i.e* la capacité des cellules musculaires lisses (CML) de la paroi vasculaire à se contracter en réponse à une augmentation de la pression intraluminaire [16]. Les propriétés élastiques de ses artères sont assurées par l'expression d'une plus grande proportion d'élastine au niveau de la matrice. Cette expression d'élastine diminue le long de l'arbre artériel au profit d'un plus petit ratio élastine/collagène. Les propriétés biomécaniques des vaisseaux reposent essentiellement sur ce ratio. Le collagène est la composante de la matrice extracellulaire qui confère une certaine rigidité à la paroi vasculaire. On le retrouve en plus grande proportion dans les artères de plus petit calibre (2) formant la microcirculation généralement caractérisée comme étant des artères de résistance ou les artères dites musculaires [17, 18]. La microcirculation est importante pour la régulation la pression artérielle (PA) puisqu'elle module la résistance périphérique et adapte le débit sanguin en fonction des besoins du tissu perfusé [19]. Les artères de résistances présentent également la propriété de tonus myogénique. Cette propriété découle de la capacité intrinsèque des CMLs

de la paroi vasculaire à réagir à une augmentation de pression (*i.e* un étirement de la cellule) en se contractant afin de maintenir le diamètre de la lumière du vaisseau stable [16]. Il est généralement accepté dans la littérature que ce mécanisme d'autorégulation est indépendant de l'influx nerveux puisqu'il est observé sur des artères *ex vivo* et qu'il est modulable par la composante endothéliale [16, 20, 21]. La microcirculation sera la composante du système vasculaire priorisée dans le contexte de cette thèse. Finalement, lorsque le réseau vasculaire atteint l'organe de destination, l'artère de petit calibre devient un capillaire (3). Le capillaire possède un très faible diamètre permettant le passage des érythrocytes les uns derrière les autres. Ainsi, l'échange des nutriments est favorisé par l'importante surface endothéliale versus le faible volume sanguin [10].

La microcirculation peut être étudiée *via* l'utilisation de différents lits vasculaires. Par exemple et de façon non exhaustive, les artères cérébrales, rénales, pulmonaires ou mésentériques font partie des lits vasculaires communément retrouvés dans la littérature. Le contexte physiologique du lit vasculaire doit être considéré lors de la translation de concepts étudiés dans un lit vasculaire spécifique. Par exemple, la réponse physiologique observée en réponse à certains stimuli varie en fonction du lit vasculaire. La réponse des artères cérébrales et pulmonaires à une hypoxie constitue un exemple connu de la littérature. La circulation systémique telle que celle des artères cérébrales réagit à une chute de la pression d'O₂ par une vasodilatation afin d'augmenter l'apport en O₂ au site hypoxique [22]. Par contre, la circulation pulmonaire réagit à cette condition par une vasoconstriction dans le but de redistribuer le sang dans une région du poumon permettant l'oxygénation [23].

1.1.1.1.2 La structure artérielle

Une variation de la structure artérielle est observée lors de la progression le long de l'arbre artériel laissant ainsi place à des intermédiaires entre la structure de la macrocirculation ou microcirculation. La paroi vasculaire est formée de 3 différentes couches; à partir de la lumière du vaisseau : (1) la *tunica intima*, (2) la *tunica media* et (3) la *tunica adventitia* (Figure 1). L'*intima* est composée d'une couche de cellules endothéliales (CE) et d'une membrane basale formée de matrice extracellulaire sur laquelle repose les CEs [24]. La membrane basale ou lamina élastique interne (LEI) est parsemée de fenestrations dont le

nombre et l'apparence varient en fonction de la localisation dans l'arbre artériel ou du lit vasculaire [25]. Il est généralement accepté dans la communauté scientifique que la densité de fenestrations augmente lorsque l'on progresse dans l'arbre vasculaire [26]. La *media* est constitué de feuillets de CMLs qui se superposent et dont le nombre varie en fonction du diamètre de l'artère. Les CMLs sont intercalées et renforcées par un réseau de fibres d'élastine et de collagène dont la quantité et la distribution varient également en fonction de la position dans l'arbre artériel ou du lit vasculaire [27]. La *tunica adventitia*, est une composante majeure de la macrocirculation et elle est présente de façon moins importante dans la microcirculation. Elle est formée de tissu conjonctif, de collagène et d'une lamina élastique externe (LEE) [28]. La population de cellules présente dans la *tunica adventitia* est hétérogène (*Ex.* fibroblastes, cellules progénitrices, innervation) [28-30]. Classé à part, le capillaire est uniquement constitué d'une couche de CEs. Bien qu'ils soient dépourvus de CMLs, les capillaires peuvent être entourés de cellules ayant une fonction contractile nommées «péricytes» [31] qui contrôler le débit sanguin en variant le diamètre des capillaires [32].

La structure artérielle peut être affectée par diverses conditions physiopathologiques. En condition d'hypertension artérielle (HA), une modification du patron de fenestration de la LEI est observée [26, 33]. Par ailleurs, une augmentation soudaine et chronique du débit engendre une fragmentation de la LEI [34]. Cette fragmentation subséquente à une augmentation des contraintes de cisaillements sur la paroi vasculaire modifie le patron d'expression génique des CEs [35], stimule leur prolifération [36] et augmente la sécrétion de métalloprotéinase par celles-ci [37]. Les espaces générés par cette fragmentation se retrouvent couverts de CEs qui sont en contact direct avec les CMLs de la paroi vasculaire [34]. L'athérosclérose fait également partie des pathologies cardiovasculaires où plusieurs composantes de paroi vasculaire sont affectées. Une détérioration de l'intégrité de l'endothélium, une invasion de la paroi vasculaire par les CMLs et les cellules immunitaires, une accumulation de lipides dans la paroi ainsi qu'une altération de la LEI sont observées [38, 39]. La rigidité artérielle découle d'un remodelage vasculaire qui peut limiter la capacité d'absorption de la pression pulsée par les vaisseaux de conductance. Ceci engendre une dysfonction de la microcirculation menant à des dommages au niveau des organes tels qu'observés au niveau cérébral en situation de démence [40, 41].

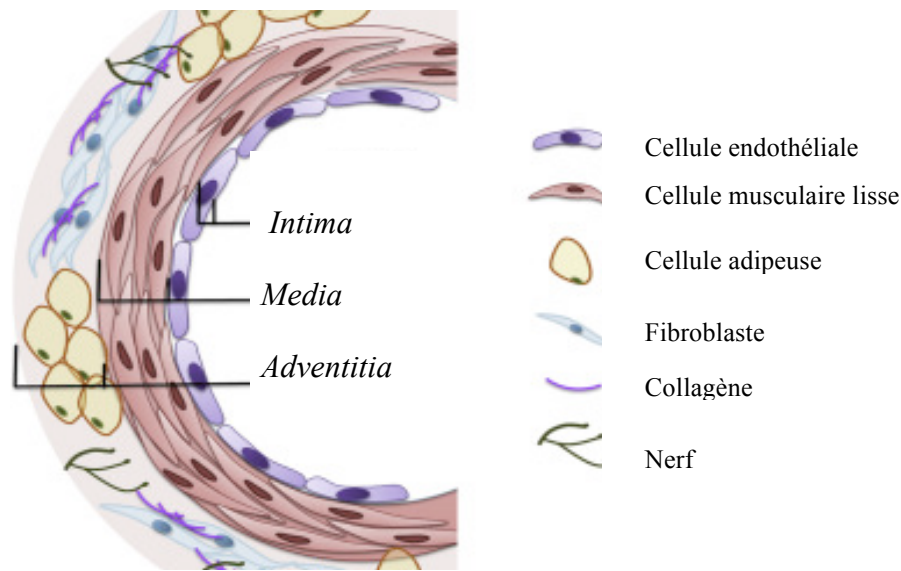


Figure 1. Schématisation simplifiée de la structure de la paroi vasculaire artérielle.

La *tunica intima* comprend les cellules endothéliales et la lamina élastique interne; non-représentée sur le schéma. La *tunica media* comprend les cellules musculaires lisses. La *tunica adventitia* est présente dans les vaisseaux de plus gros diamètre et présente une grande hétérogénéité cellulaire. Modifiée de : [1]

1.1.1.1.3 Les cellules endothéliales

Les CE tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins et elles sont séparées physiquement des CMLs par la LEI. Malgré cette barrière physique, les CEs entrent en contact direct avec les CMLs en formant des extensions cellulaires au travers des fenestrations de la LEI. Ces extensions sont caractérisées sous le terme de projections myoendothéliales (PME) ou de jonctions myoendothéliales [8, 42, 43]. De par leur localisation à l'interface du sang et des CMLs, les CEs occupent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Cette localisation permet aux CEs d'être exposées à plusieurs signaux et elles intègrent ces signaux de façon à moduler la fonction vasculaire en générant par exemple des composés vasoactifs. Une altération de la fonction endothéliale est couramment observée en condition de pathologie cardiovasculaire concordant avec une réponse modifiée à ces différents signaux [44-46]. Le calcium (Ca^{2+}) est un second messenger intracellulaire primordial pour l'intégration de ces signaux ce qui fait de l'étude du Ca^{2+} endothélial un sujet de grand intérêt dans le contexte de la fonction endothéliale et de l'homéostasie vasculaire [47-53].

1.1.1.1.4 Les cellules musculaires lisses

Il y a 3 types de cellules musculaires : (1) les cellules musculaires striées de type squelettique, (2) les cellules musculaires striées de type cardiaque et (3) les CMLs. La

physiologie des CMLs se distingue des cellules musculaires striées entre autres par leur forme, l'organisation du cytosquelette et le mécanisme de contraction. La CML est fusiforme et uninucléée. Son orientation dans la paroi des vaisseaux sanguins est concentrique et donc perpendiculaire au débit sanguin favorisant une contraction efficace.

L'appareil contractile des CMLs, comparativement à l'organisation en sarcomère observée dans les cellules musculaires striées, est de façon apparente beaucoup moins structurée. En effet, les cellules striées possèdent un appareil contractile où les filaments du cytosquelette sont superposés et parallèles les uns par rapport aux autres. Ce type d'organisation permet une contraction longitudinale qui s'effectue par un glissement et chevauchement de l'actine et de la myosine suite à la liaison du Ca^{2+} à l'appareil contractile. Cette réaction est dépendante de l'hydrolyse de l' adénosine triphosphate (ATP) [54]. Quant aux CMLs, elles possèdent plutôt un appareil contractile croisé ou en biais où les filaments

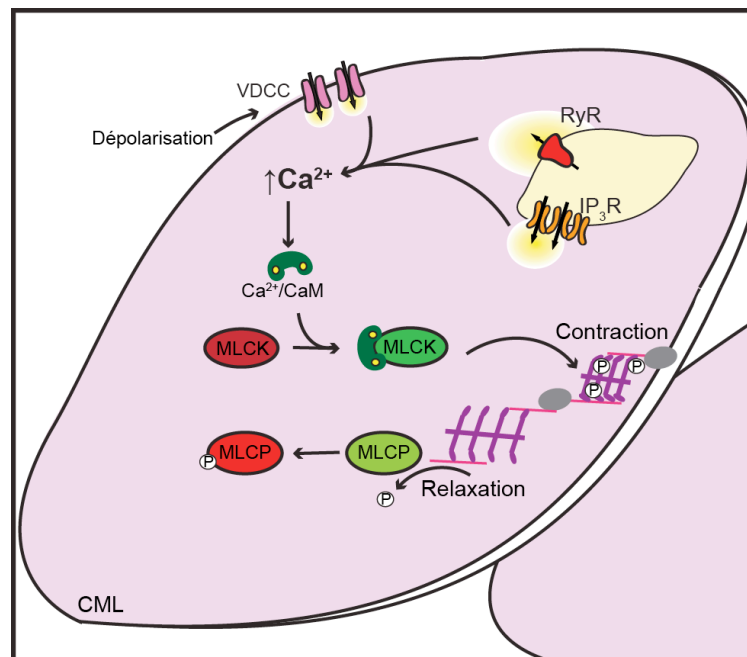


Figure 2. Schématisation simplifiée du mécanisme de contraction du muscle lisse

La contraction est initiée par une augmentation de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire. Le Ca^{2+} se lie à la calmoduline (CaM). Cette dernière active la MLCK qui phosphoryle les chaînes légères de myosine provoquant la contraction. La contraction peut être renversée par une déphosphorylation des chaînes légères de myosine par la MLCP. CML : Cellule musculaire lisse, VDCC : Canaux calciques voltage-dépendants, RyR : Récepteur à la ryanodine, IP_3R : Récepteur à l'inositol 1,4-5 triphosphates, MLCK : Kinase des chaînes légères de myosine, P : Phosphate, MLCP : Phosphatase des chaînes légères de myosine.

d'actine proviennent de part et d'autre de la cellule se croisant en divers endroits au centre de la cellule dans des régions nommées «corps denses». Ces sites servent d'ancrage aux filaments d'actine, mais également à d'autres filaments intermédiaires non impliqués dans la contraction. La contraction dépend de la phosphorylation de la myosine par une kinase dont l'activité est dépendante du complexe Ca^{2+} /calmoduline ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$). Lors d'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire par les diverses sources de Ca^{2+} , le Ca^{2+} libre lie la calmoduline (CaM). Le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ active la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK pour *Myosin-Light-Chain Kinase*) qui phosphoryle la myosine. L'arrêt de la contraction est dépendant de la déphosphorylation de la myosine par la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP pour *Myosin-Light-Chain Phosphatase*) [55, 56]. Bien que la relation Ca^{2+} /contraction soit moins directe dans les CMLs que les cellules musculaires striées, le Ca^{2+} est tout de même essentiel afin que la contraction ait lieu. Il peut provenir de diverses sources (extracellulaire ou réserve intracellulaire), mais l'augmentation de Ca^{2+} est généralement initiée par l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC pour *Voltage-Dependant Calcium Channel*) de la membrane plasmique qui s'activent suite à une dépolarisation (Figure 2).

Le couplage électrique entre les CMLs grâce aux jonctions intercellulaires de type GAP permet la propagation du changement de potentiel membranaire entre les cellules [57] et favorise une coordination de la vasomotion le long de l'arbre artériel [58]. Le potentiel membranaire n'est pas le seul signal transmis entre les CMLs. L'inositol 1,4-5 triphosphate (IP_3) ou le Ca^{2+} peut être transmis de cellule en cellule par ces jonctions GAP ce qui participe à la modulation de l'état contractile des CMLs le long de la paroi vasculaire [59, 60].

1.1.1.1.5 La projection myoendothéliale

Mise en évidence au milieu du 20^e siècle [61], la PME a été initialement décrite comme étant une protubérance de la CE au travers des fenestrations de la *elastica interna* des petites artères. Il avait été rapporté que ces protubérances parvenaient à entrer en contact direct avec les CMLs sous-jacentes (Figure 3). Depuis leurs premières observations, elles ont été étudiées dans plusieurs espèces animales, lits vasculaires ou par diverses techniques telles que la microscopie électronique [62-67]. À ce jour, il est maintenant bien connu que la PME est un microdomaine de signalisation primordial dans l'homéostasie vasculaire. Par contre, bien

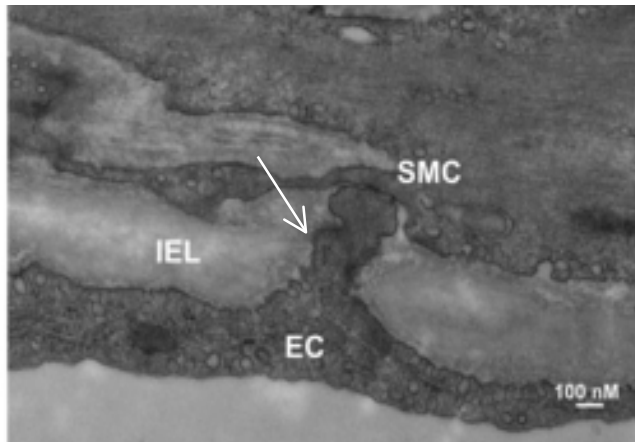


Figure 3. Image représentative d'une projection myoendothéliale d'artère de muscle squelettique de hamster

La projection myoendothéliale (flèche) correspond à la portion de la cellule endothéliale (EC) présente dans la fenestration de la lamina élastique interne (IEL) vers la cellule musculaire lisse (SMC) afin d'établir un contact. Échelle : 100 nm. De : [8]

qu'un nombre grandissant de groupes de recherche s'intéressent aux PME, la dynamique de la formation de ces extensions cellulaires est toujours méconnue.

L'occurrence du nombre de PME semble varier en fonction du diamètre artériel tout comme le nombre de fenestrations dans la LEI. Il a été rapporté qu'un plus grand nombre de PME est observé dans les artères de plus petit calibre comparativement aux artères de plus gros calibre [63, 68]. Cette observation est d'autant plus intéressante qu'en général, on constate un consensus concernant la plus grande importance des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF; *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*) au niveau des artères de petit calibre comparativement aux artères de plus gros calibre [69]. L'EDHF est un phénomène menant à une vasodilatation et qui inclut plusieurs mécanismes localisés (bien que non exclusifs) dans la PME. Il semblerait qu'au niveau des artères de plus gros calibre (où l'occurrence des PME est moins grande), des mécanismes tels que le monoxyde d'azote (NO; pour *Nitric Oxide*) sont plus importants pour la vasodilatation dépendante de l'endothélium que l'EDHF. Ces mécanismes permettant de réguler le tonus vasculaire par l'endothélium seront décrits plus en détail dans la section 1.2. Bien que la relation «quantité de fenestrations» et «quantité de PME» ne semble pas directement établie, une plus grande quantité de PME a également été observée en condition d'HA [70]. Considérant que la projection semble être un lieu primordial pour le contrôle du tonus vasculaire, il est possible que cette différence soit le résultat d'un mécanisme de compensation afin de contrer l'élévation de la PA.

Cette structure anatomique est munie de jonctions de type GAP. La présence de ces jonctions permet un transfert de signaux [63] au niveau de la PME entre les deux types cellulaires. Ce transfert de signaux *via* les connexines (Cx) formant les jonctions GAP peut être des ions tels que le Ca^{2+} ou l' IP_3 [71, 72]. Au niveau vasculaire, la littérature rapporte l'expression des Cx37, Cx40, Cx43 et parfois Cx45 [73-75]. Comme pour la communication CML-CML, les jonctions intercellulaires GAP de la PME permettent la transmission du potentiel membranaire entre les CEs et les CMLs [76]. Ce couplage électrochimique est primordial pour le contrôle du tonus vasculaire.

1.1.1.2 Le système vasculaire veineux (circulation systémique)

Le système vasculaire veineux fait face à des contraintes physiques qui le distingue du système artériel. Tout d'abord, il reçoit un débit en continu et constitue un système à très basse pression qui agit comme un réservoir sanguin. Il a été estimé que le système veineux comprend environ 80% du sang présent dans la circulation [77]. Les veines ont une plus faible proportion de CMLs qu'au niveau artériel résultant en une *media* moins importante et en un faible pouvoir de contraction [78]. Le sang circulant dans les veines doit fréquemment lutter contre la force gravitationnelle comme au niveau du retour veineux des membres inférieurs. Ainsi, la combinaison de basse pression et de gravité engendre une particularité de structure dans les veines comparativement aux artères. Les veines sont munies de valves tout le long de son réseau afin d'éviter le reflux sanguin («backflow») [79, 80]. Finalement, la différence d'oxygénation du sang entre le système veineux et artériel soumet les CEs de la paroi veineuse à un environnement différent pouvant affecter le phénotype de celles-ci.

1.2. L'endothélium vasculaire

Il est maintenant largement détaillé dans la littérature que l'endothélium est essentiel pour le maintien de l'homéostasie vasculaire et que ses fonctions sont fortement dépendantes des concentrations intracellulaires en Ca^{2+} . Ainsi, il est intéressant de mettre en relief que la localisation de l'endothélium peut également affecter son phénotype et les fonctions spécifiques qu'il contrôle.

1.2.1 L'endothélium, bien plus qu'une barrière

Au niveau historique, l'endothélium a longtemps été perçu comme une simple barrière physique entre le sang et les composantes de la paroi vasculaire sous-jacentes aux CEs [81]. Cependant, l'endothélium ne fait pas uniquement que limiter physiquement l'accès des composantes sanguines aux cellules, tissus et organes. Il est un organe paracrine qui présente une pléiade de fonctions diversifiées.

Les rôles fonctionnels de l'endothélium ont entre autres été mis en évidence par Robert F. Furchgott. Ce chercheur est la preuve que des erreurs peuvent parfois mener à de grandes découvertes scientifiques. L'acétylcholine (ACh) est reconnue à ce jour pour être un puissant vasodilatateur *in vivo*. Par contre, lors d'expériences publiées en 1953 utilisant des anneaux aortiques de rats, Dr Furchgott observait une vasoconstriction suite à l'application d'ACh dont l'amplitude variait en fonction des préparations [82]. C'est plusieurs années plus tard qu'il prit conscience que lors de ses premières manipulations expérimentales, l'endothélium était accidentellement détaché de la paroi vasculaire. C'est ainsi que Dr Furchgott a observé la portion dépendante de l'endothélium dans la relaxation induite par l'ACh qui découlait de la production d'une molécule diffusible par les CEs. Ces résultats ont été publiés dans *Nature* et cet article constitue un classique en biologie vasculaire [83]. Ce facteur diffusible stimulait la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) dans les CML [84, 85]. C'était le début de l'identification des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF; pour *Endothelium-Derived Relaxing Factor*) [86]. Dr Furchgott a reçu le prix Nobel de Médecine en 1998 en compagnie de Dr Ignarro et Murad pour l'identification du NO comme facteur vasorelaxant produit par les CEs et de la voie du GMPc [84, 85].

1.2.2 L'hétérogénéité de l'endothélium

Le phénotype des CEs diffère en fonction des spécificités fonctionnelles et des contraintes physiques qu'engendre leur localisation. Cette hétérogénéité constitue une adaptation de l'endothélium à son environnement ce qui peut mener à des changements morphologiques, métaboliques, phénotypiques ou génotypiques divers [87-89].

Les différents types d'endothéliums peuvent être caractérisés en termes de «continuité». L'endothélium est continu lorsqu'il est ancré sur une membrane basale continue et lorsque le contact cellule-cellule est maintenu par des jonctions intercellulaires serrées ou adhérentes [87]. On le retrouve dans la majorité du réseau vasculaire. Cet endothélium peut être fenestré ou non-fenestré (Figure 4). La « fenêtré » est comparée à un large pore muni d'un diaphragme et généré par un amincissement d'une portion de la CE favorisant le transport de part et d'autre de la cellule [90]. L'endothélium continu et fenestré est observé dans les capillaires et les organes présentant des fonctions de filtration comme le rein ou les glandes [87, 91, 92]. L'endothélium discontinué ou sinusoidal tel qu'observé dans le foie [93] est similaire à endothélium fenestré, mais présente de très larges pores caractérisés par une absence de diaphragme (Figure 4) [94].

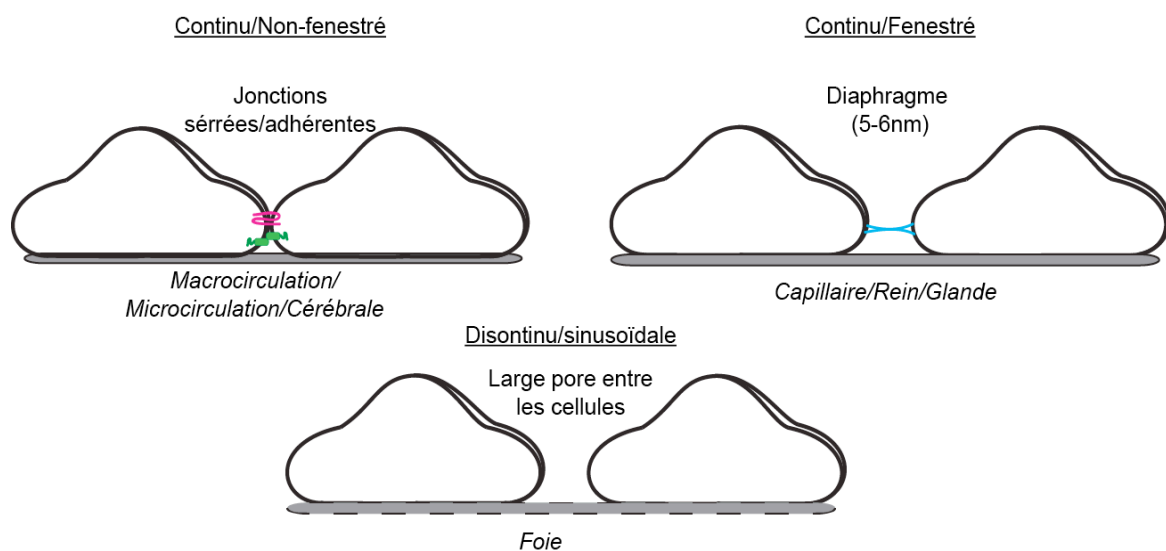


Figure 4. Schématisation de l'hétérogénéité de l'endothélium.

L'endothélium continu et non-fenestré repose sur une membrane et présente une forte expression de jonctions serrées et adhérentes. L'endothélium continu et fenestré repose sur une membrane et présente des pores munis de diaphragme. L'endothélium discontinu ou sinusoidal présente des larges pores entre les cellules et repose sur une membrane désorganisée.

Les CEs de la vasculature cérébrale sont un exemple parfait des spécificités de l'endothélium en fonction de sa localisation [95]. L'endothélium cérébral est non-fenestré et présente une haute densité de jonctions intercellulaires ce qui permet de limiter l'accès des diverses molécules et composantes de la circulation sanguine aux tissus neuronaux (barrière

hématoencéphalique) [96]. Les propriétés hémodynamiques peuvent également induire des spécificités endothéliales génotypiques et phénotypiques [97]. Il a entre autres été démontré que les CEs du système veineux, plus particulièrement au niveau post-capillaire, présentent un patron d'expression des molécules d'adhésion particulier permettant la migration des cellules inflammatoires au travers de la paroi veineuse en condition pro-inflammatoire [98-100]. Ceci serait dû en partie à la réduction des contraintes de cisaillement [100] comparativement aux CEs qui bordent la microcirculation artérielle où les forces de cisaillement sont élevées [101].

1.2.3 Les fonctions endothéliales

L'endothélium est impliqué dans plusieurs fonctions vasculaires ce qui le met au cœur du maintien de l'homéostasie vasculaire. Il participe au processus d'angiogenèse et d'artériogenèse, aux mécanismes d'agrégation plaquettaire, à la régulation de la perméabilité vasculaire ou à la régulation du tonus vasculaire. Son dysfonctionnement est largement associé à plusieurs pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose ou l'HA.

1.2.3.1 L'angiogenèse et l'artériogenèse

L'angiogenèse est généralement initiée par une condition d'hypoxie ou une ischémie [102, 103] telle qu'observée en condition d'athérosclérose où la paroi vasculaire est hypertrophiée [104]. L'endothélium possède un rôle important dans le mécanisme d'angiogenèse puisqu'il joue un rôle d'initiateur ainsi que sur l'ensemble du processus. En réponse à l'hypoxie, la cellule exprime le facteur inductible par l'hypoxie (HIF- α ; pour *Hypoxia Inductible Factor*) qui module l'expression génique du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF; pour *Vascular Endothelial Growth Factor*) [105]. La liaison du VEGF au récepteur tyrosine-kinase de type 2 du VEGF (VEGFR-2) sur la CE mène à l'activation de métalloprotéinases qui dégradent la matrice extracellulaire [106, 107]. S'en suivra la migration et l'alignement des CEs qui est guidée par un gradient de VEGF afin de créer un bourgeonnement similaire à un capillaire [108-110].

Pour sa part, l'artériogenèse est initiée par un stress mécanique [111]. On peut également le percevoir comme le mécanisme responsable de la maturation des vaisseaux néoformés par l'angiogenèse. Il a été démontré qu'un stress mécanique tel que l'augmentation

des contraintes de cisaillement due à l'élévation du flot sanguin modifie le patron d'expression des molécules d'adhésion de l'endothélium par une augmentation de la présence du récepteur ICAM-1 (pour *Inter*cellular *A*dhesion *M*olecule *1*). Ceci favorise l'adhésion de monocytes à la paroi vasculaire [112, 113]. De plus, les contraintes de cisaillement induisent la production par l'endothélium de molécules chemoattractantes pour les monocytes telles que la protéine chemoattractante de monocyte 1 (MCP-1 pour *Monocyte Chimoattractant Protein 1*) [114, 115]. Les monocytes s'infiltrèrent par la suite dans la paroi vasculaire, se différencient en macrophage et sécrètent des facteurs [116, 117] permettant le remodelage vasculaire [113, 118, 119]. L'endothélium est une composante primordiale dans ce processus puisqu'il est l'élément permettant l'ancrage des monocytes à la paroi.

1.2.3.2 L'adhésion et l'agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est définie comme étant la capacité des plaquettes à adhérer entre elles ce qui survient sporadiquement afin de colmater les lésions des vaisseaux sanguins [120]. Il est suggéré que la dysfonction endothéliale favorise l'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire telle qu'observée en athérosclérose [121]. Par ailleurs, une altération des mécanismes d'agrégation plaquettaire peut générer des thrombus menant à des arrêts cardiovasculaires ou des accidents cérébraux vasculaires [122, 123]. Ainsi, l'agrégation plaquettaire n'est ni souhaitée ni observée en condition physiologique et l'endothélium participe fortement dans l'inhibition de ce mécanisme réparateur [124, 125].

L'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire est généralement initiée par l'exposition de la matrice extracellulaire localisée sous les CEs ce qui induit une zone de turbulence du flux sanguin (Figure 5) [126]. Le relargage du facteur de von Willebrand (vWF pour *von Willebrand Factor*) localisé dans les corps de Weibel-Palade de l'endothélium [127] permet l'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire par la liaison des récepteurs GPIb plaquettaire aux vWFs [128]. L'adhésion est renforcie par l'activation du récepteur GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) et la liaison de récepteurs plaquettaires au collagène de la matrice extracellulaire [129]. Cette adhésion enclenche une série de réactions enzymatiques qui stimulent l'interaction plaquette-plaquette [130-132]. La thrombine libérée par les plaquettes activées contribue à la stabilisation de l'agrégat par la conversion du fibrinogène en fibrine [133].

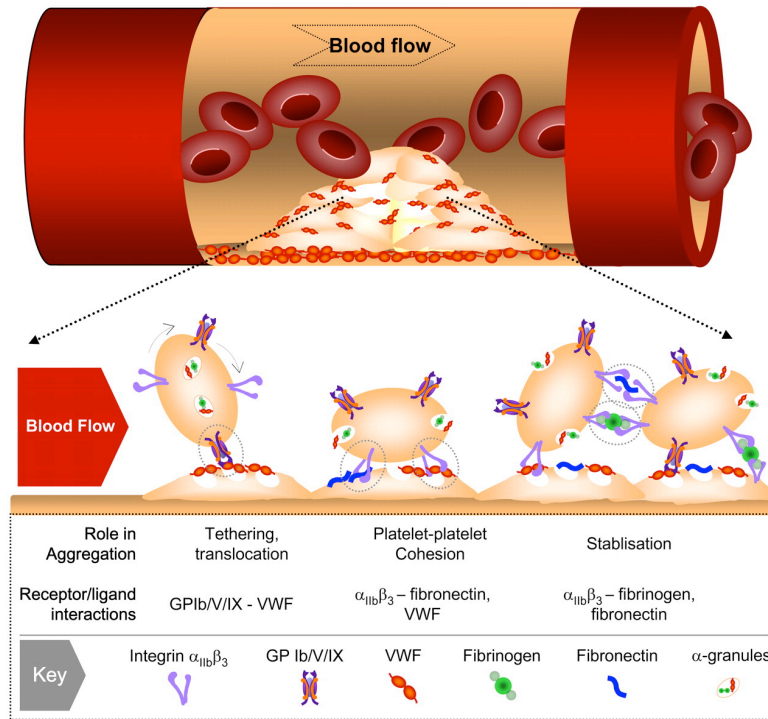


Figure 5. Mécanisme d'aggrégation plaquettaire à la paroi vasculaire.

Les plaquettes se lient *via* leurs récepteurs GPIb aux facteurs de von Willebrand (vWF) présents dans la paroi vasculaire et sécrétés par l'endothélium («tathering»). Cette liaison sera renforcée («cohesion») par la liaison du récepteur GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) plaquettaire au facteur de vWF dans la paroi vasculaire. Finalement, une série de réactions enzymatiques favorisera la liaison de GPIIb/IIIa au fibrinogène (stabilisation). De : [5]

L'effet antiagrégant de l'endothélium est médié par l'effet du NO sur les plaquettes. Le NO induit une augmentation intracellulaire de GMPc plaquettaire [125, 134] qui agit en limitant l'activation des récepteurs à la thromboxane A_2 (TXA₂) plaquettaire [135]. La TXA₂ est une molécule sécrétée par les plaquettes et l'endothélium [136] qui engendre une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} au niveau de la plaquette favorisant l'aggrégation plaquettaire en activant GPIIb/IIIa [137]. L'effet du NO sur la plaquette permet donc de limiter l'effet agrégant de la TXA₂. De façon intéressante, les plaquettes activées libèrent des facteurs tels que l'adénine diphosphate (ADP) ou l'ATP qui agissent sur l'endothélium [138]. Lorsque l'endothélium est fonctionnel, ces facteurs activent des voies favorisant la production NO [139] qui agit en boucle de rétroaction négative afin d'inactiver les plaquettes [140].

1.2.3.3 La perméabilité vasculaire

La perméabilité vasculaire est la capacité des molécules à cheminer entre le sang et les tissus sous-jacents. Ces molécules doivent franchir la monocouche endothéliale qui module

son niveau d'«ouverture» en fonction de la demande. La voie d'entrée est déterminée principalement en fonction de la taille de la molécule. Les molécules de plus petites tailles (moins de 3 nm) empruntent généralement la voie paracellulaire (1) qui permet de passer la barrière endothéliale *via* les jonctions intercellulaires serrées ou adhérentes qui connectent les CEs entre elles [141] et qui sont entre autres formées de la VE-cadhérine [142, 143]. Inhiber la fonction de cette protéine engendre sa redistribution et un réarrangement du cytosquelette d'actine qui favorise une augmentation de la perméabilité de la monocouche de CE [144]. La réorganisation du cytosquelette ainsi que le désassemblage de la VE-cadhérine à la membrane plasmique semblent modulés par les variations intracellulaires en Ca^{2+} induites par l'ouverture des canaux TRPs (pour *Transient Receptor Potential*) à la membrane plasmique [145]. Les molécules de plus grosse taille (>10 nm) empruntent principalement la voie de transport de type transcellulaire (2) [146, 147]. Ce processus permet aux macromolécules de passer littéralement au travers de la cellule *via* un système de vésicules qui agit comme navette entre le côté apical et basolatéral de l'endothélium. Ces vésicules sont observées à des sites enrichis en calvéoles [146] et sont internalisées par un mécanisme nécessitant l'activité enzymatique GTPase de la dynamine localisée au collet de l'invagination [148].

La régulation de la perméabilité est un élément primordial dans plusieurs processus physiopathologiques. À titre d'exemple, une augmentation de perméabilité est observée dans le processus d'angiogenèse où une désorganisation du contact cellule-cellule est nécessaire afin de permettre le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux. En effet, le VEGF engendre l'internalisation de la VE-cadhérine ce qui promeut la perméabilité vasculaire [149].

1.2.3.4 Le tonus vasculaire

Le tonus vasculaire est décrit comme étant la résultante de l'état contractile des CML. Il découle d'une balance entre les mécanismes de contraction et de relaxation permettant de contrôler la résistance périphérique, composante primordiale dans la détermination de la PA [150, 151]. Ainsi, une altération de ces mécanismes peut se traduire par une modification de la PA ce qui est un facteur de risque important de plusieurs pathologies vasculaires [152, 153]. Dans le cadre de cette thèse, une emphase sera mise sur le rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire puisque les mécanismes étudiés influencent cette fonction.

1.2.3.4.1 Régulation endothéliale de la relaxation des CML

Les mécanismes qui promeuvent la relaxation des CMLs sont nombreux et leur importance est variable entre autres en fonction de la localisation dans l'arbre vasculaire. On retrouve parmi ces mécanismes le NO, la prostacycline (PGI2) et l'EDHF [154].

1.2.3.4.1.1 Monoxyde d'azote (NO)

La découverte du NO comme molécule vasodilatatrice produite par l'endothélium fut l'une des plus grandes découvertes dans le domaine de la biologie vasculaire du 20^e siècle. Le NO est une molécule diffusible vasoactive produite au niveau de l'endothélium par la NOS-3. La NOS est traduite sous une forme monomérique qui contient un domaine réductase et un domaine oxygénase couplés à un groupement hème (Figure 6) [155]. La production de NO dépend essentiellement de 3 composantes : 1) la dimérisation de la NOS en présence de tétrahydrobioptérine (BH₄) [155]; 2) des cofacteurs, la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN) [156]; et 3) des substrats, la nicotinamide adénine

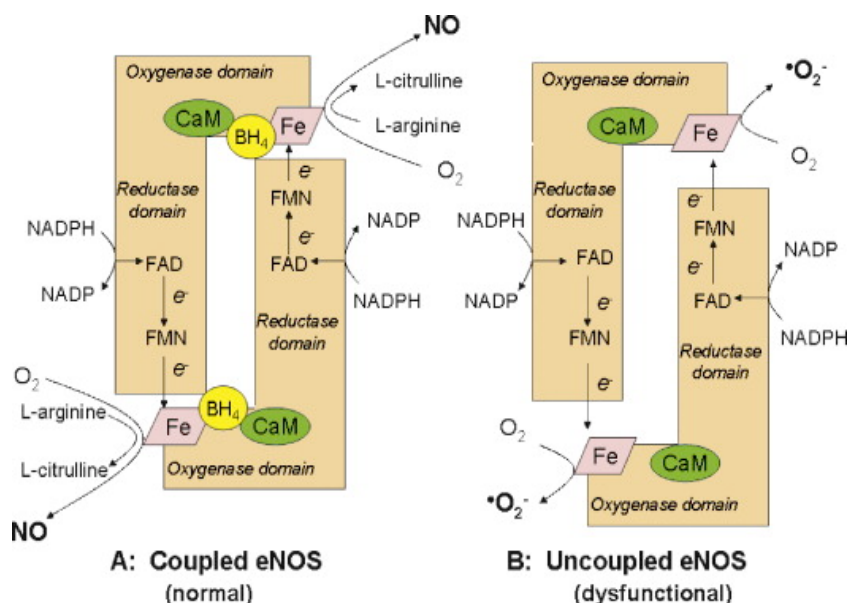


Figure 6. Mécanismes de production de monoxyde d'azote et de l'anion superoxyde par la NOS-3.

La NOS-3 produit le monoxyde d'azote (NO) en présence du BH₄, de la L-arginine, de l'O₂ et du NADPH. Lors d'une réduction de la biodisponibilité du BH₄, la NOS-3 est « découplée » favorisant la production de l'anion superoxyde (O₂^{•-}). NOS-3 (eNOS) : Endothéliale oxyde nitrique synthase, BH₄ : Tétrahydrobioptérine, NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate à l'état réduit, NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, O₂ : Oxygène, CaM : Calmoduline, Fe : Fer (hème), e⁻ : Électron, FAD : Flavine adénine dinucléotide, FMN :

dinucléotide phosphate à l'état réduit (NADPH) et la L-arginine. La L-arginine en présence d'O₂ est transformée en L-citrulline et en NO [157]. On réfère généralement la forme monomérique de la NOS à une forme «découplée». Dans cette condition, le monomère ne peut lier les cofacteurs nécessaires à la production du NO et produit plutôt du stress oxydant sous forme d'anion superoxyde (O₂•⁻) [158, 159]. Cette condition est particulièrement observée en dysfonction endothéliale où un déséquilibre entre la production de NO et d'O₂•⁻ est constaté [160, 161].

L'effet du NO sur la relaxation des CMLs est médié par la stimulation de la guanylate cyclase soluble (GCs) qui produit le GMPc [85]. La PKG activée par le GMPc réduit la disponibilité du VDCC à la membrane plasmique [162, 163] et réduit la concentration intracellulaire en Ca²⁺ en inhibant les récepteurs à l'IP₃ (IP₃R) [164, 165] ou en favorisant l'activité de la pompe SERCA (pour *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase*) [166, 167]. Cette diminution du Ca²⁺ intracellulaire permet la relaxation des CML en mettant fin aux mécanismes de contraction. De plus, la concentration intracellulaire de GMPc favorise l'activité des canaux potassiques induisant l'hyperpolarisation de la CML et la fermeture subséquente des VDCC (Figure 7) [168, 169].

La NOS-3 est contrôlée par plusieurs mécanismes qui incluent des modifications post-traductionnelles permettant de modifier sa localisation intracellulaire [170-172]. Il a été démontré que son activité est dépendante du Ca²⁺ *via* la liaison directe du complexe Ca²⁺/CaM [51, 173] ce qui favorise la dimérisation [50], augmente l'activité réductase de l'enzyme [174] et favorise sa dissociation de la membrane [175]. La NOS-3 est inactive lorsqu'ancrée à la membrane plasmique. La liaison du complexe Ca²⁺/CaM favorise son détachement de la cavéoline et son activation [175]. La dépendance au Ca²⁺ de la NOS-3 peut également être indirecte par sa phosphorylation *via* des kinases Ca²⁺-dépendantes comme la protéine kinase II dépendante du complexe Ca²⁺/CaM (CaMKII; *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) [176, 177].

1.2.3.4.1.2 La prostacycline (PGI₂)

La PGI₂ est un composé vasoactif de la famille des prostanoïdes produit par l'endothélium. Elle découle du métabolisme des acides arachidoniques (AA) et est générée par

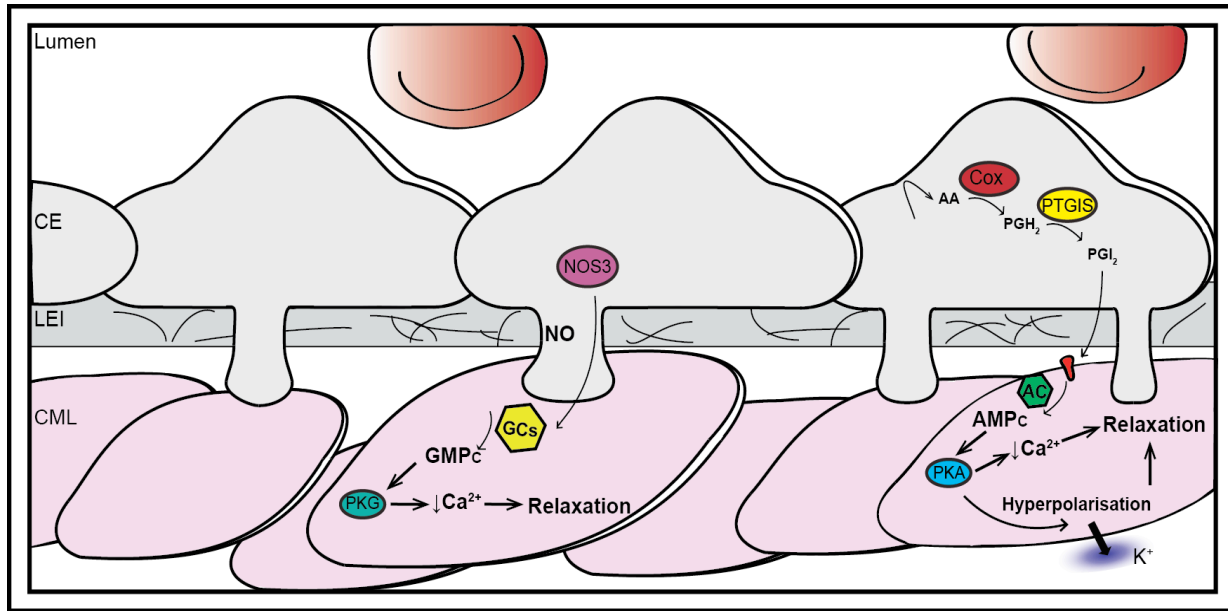


Figure 7. Schématisation simplifiée des mécanismes d'actions du monoxyde d'azote et de la prostacycline.

Le monoxyde d'azote (NO) favorise la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) au niveau des cellules musculaires lisses (CML) en stimulant la guanylate cyclase soluble (GCs). Le GMPc active la protéine kinase G (PKG) qui diminue la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}) induisant la relaxation. La prostacycline (PGI_2) découle du métabolisme des acides arachidoniques (AA) par les cyclo-oxygénases (COX). Les COX produisent la prostaglandine (PGH_2) qui est métabolisée en PGI_2 par la PGI_2 synthase (PTGIS). La PGI_2 induit la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) en liant son récepteur (IP) sur la CML. L'AMPc active la protéine kinase A (PKA) qui active des mécanismes réduisant les concentrations intracellulaires en Ca^{2+} menant ainsi à la relaxation. LEI: Lamina élastique interne, CE: cellule endothéliale, AC: Adénylate cyclase

l'activation de la voie des cyclo-oxygénases (COX) [178]. L'activation de la cascade enzymatique des COX peut également mener à la production de la TXA_2 [179] qui a un effet vasoconstricteur. La PGI_2 et la TXA_2 dérivent du même précurseur, soit les prostaglandines H_2 (PGH_2) [178]. La réaction enzymatique permettant l'isomérisation de la PGH_2 en PGI_2 est effectuée par la prostacycline synthase (PTGIS) [178]. Considérant leurs effets opposés, la balance entre la production de PGI_2 et de TXA_2 doit être finement régulée. En situation de dysfonction endothéliale, un déséquilibre entre la production de ces 2 facteurs vasoactifs favorise la production de TXA_2 [180] et donc, la vasoconstriction [181].

L'effet de la PGI_2 sur la vasodilatation est médié par diverses voies de signalisations au niveau des CMLs sous-jacentes. La plus décrite implique l'activation du récepteur à la PGI_2

(IP) couplé à la protéine G induisant une augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire [182-184]. L'AMPC active la protéine kinase A (PKA) ou la protéine d'échange activée par l'AMPC (Epac) [185]. L'activation de la PKA subséquente à la liaison de la PGI₂ ou d'analogue de la PGI₂ aux récepteurs membranaires module l'activité des canaux potassique (K⁺; potassium) de grandes conductances dépendants du Ca²⁺ (BK_{Ca}) ainsi que les canaux potassiques modulés par l'ATP (K_{ATP}) [186-188]. L'activation indépendante de l'AMPC des canaux potassiques à rectification entrante (K_{ir}) exprimés par les CML a également été rapportée comme étant modulée par la liaison de la PGI₂ [189]. Dans ces trois cas, l'ouverture de ces canaux K⁺ engendre une sortie de K⁺, l'hyperpolarisation et la relaxation subséquente de la CML. De plus, il a été soulevé que l'activation de PKA et d'Epac suite à une augmentation d'AMPC dans les CMLs réduit la libération de Ca²⁺ du RS affectant ainsi le Ca²⁺ disponible pour la contraction (Figure 7) [190].

1.2.3.4.1.3 Les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF)

Les mécanismes inclus dans l'EDHF sont définis comme étant les voies favorisant l'hyperpolarisation des CMLs et qui sont résistantes à l'inhibition de la NOS-3 et des COX [191, 192]. Malgré son appellation qui laisse sous-entendre que l'EDHF est constitué de facteurs diffusibles par l'endothélium, il est également composé de voies de signalisation qui n'impliquent pas la production et libération de facteurs. Nonobstant le nombre grandissant d'études caractérisant l'EDHF, la liste des mécanismes qui le compose n'est pas un consensus et varie dans la littérature. Il sera donc décrit dans cette sous-section les mécanismes généralement acceptés dans l'EDHF et qui sont les plus définis dans la littérature (Figure 8).

Les canaux potassiques Ca²⁺-dépendants (K_{Ca}) et le potassium (K⁺)

L'endothélium natif exprime à sa membrane plasmique les canaux potassiques dépendants du Ca²⁺ (K_{Ca}) de faible conductance (K_{Ca}2.3 ou SK_{Ca} pour *small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel*) et de conductance intermédiaire (K_{Ca}3.1 ou IK_{Ca} pour *intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel*) [193]. Ces canaux sont activés par la liaison du Ca²⁺ à la CaM constitutivement liée au canal et laissent sortir du K⁺ de la cellule selon le gradient électrochimique de cet ion [194, 195]. La sortie de K⁺ rend l'espace

intracellulaire plus négatif et la membrane plasmique hyperpolarisée. La littérature relate une plus grande importance de cette voie de signalisation dans la microcirculation comparativement à la macrocirculation. En effet, il a été démontré que la relaxation induite suite à l'ACh est entièrement dépendante du NO dans l'aorte (macrocirculation) comparativement aux artères mésentériques (microcirculation) de rat qui présentent une relaxation suite à l'ACh qui résiste à l'inhibiteur de la NOS [69]. Tel que décrit auparavant, la microcirculation a tendance à présenter une plus grande abondance de PME [63, 68]. Il a été démontré que la distribution spatiale des $K_{Ca}3.1$ dans l'endothélium est exclusive aux PME [196-198]. Pour sa part, $K_{Ca}2.3$ ne semble pas présenter une expression spécifique aux PME [198]. La proximité de ces canaux dans l'endothélium avec les jonctions GAP favorise un transfert efficace des fins changements de potentiel membranaire aux CMLs sous-jacentes.

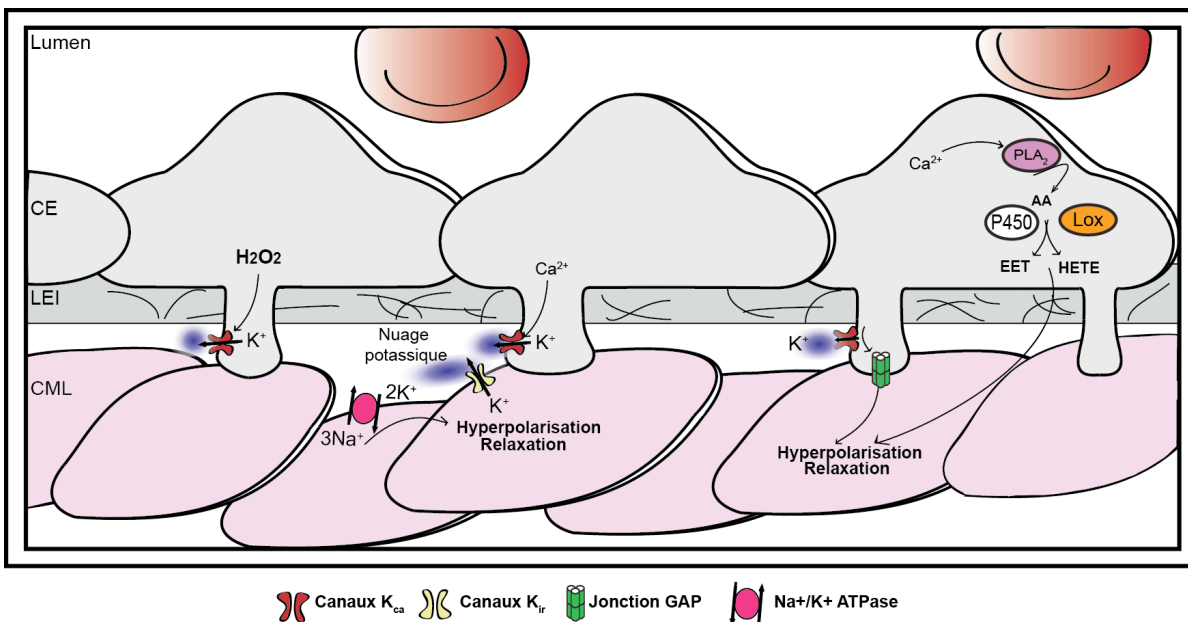


Figure 8. Schématisation simplifiée des mécanismes impliqués dans l'EDHF.

Les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) incluent les K_{Ca} , le nuage potassique, la pompe Na^+/K^+ ATPase, les jonctions GAP, les EET, les HETE et le H_2O_2 . Il induit l'hyperpolarisation de la membrane endothéliale (CE) et subséquentement de la membrane de la cellule musculaire lisse (CML) permettant ainsi la relaxation de la CML. LEI : Lamina élastique interne, H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène, Ca^{2+} : Calcium, K_{Ca} : Canaux potassiques dépendants du Ca^{2+} , K_{ir} : Canaux potassiques à rectification entrante, K^+ : Potassium, Na^+ : Sodium, PLA_2 : Phospholipase A_2 , P450 : Cytochrome P450, Lox : Lipooxygénase, EET : Acides époxyeicosatriénoïques, HETE : Acides hydroxyeicosatétraénoïques

L'ouverture des K_{Ca} de la PME augmente la concentration extracellulaire locale de K^+ due à l'espace restreint de la zone intercellulaire, phénomène retrouvé sous le nom de «nuage potassique». Le nuage potassique a un effet potentialisateur sur l'hyperpolarisation des CMLs subjacentes. Les K_{ir} ont une plus grande conductance sortante en présence d'une augmentation du K^+ extracellulaire. Ainsi, la sortie de K^+ de la CE induit une sortie de K^+ de la CML par les K_{ir} ce qui participe à l'hyperpolarisation de la CML [199, 200]. En plus de l'activation des K_{ir} , il est suggéré que le nuage potassique active les pompes Na^+/K^+ -ATPase des CMLs [201]. Cette pompe fait sortir 3 ions sodium (Na^+) pour 2 ions K^+ par molécule d'ATP hydrolysée [202] résultant en une diminution des charges positives intracellulaire qui potentialise l'hyperpolarisation. Malgré plusieurs évidences suggérant un rôle de cette pompe dans l'EDHF [198, 201, 203], cette voie est souvent sous-estimée ou omise lorsque l'EDHF est abordé probablement dû à la complexité des expériences pouvant confirmer son rôle ainsi qu'à l'utilisation d'inhibiteurs non spécifiques [204].

Les jonctions communicantes GAP

Les CE et les CMLs sont électriquement couplées par les jonctions intercellulaires de type GAP qui relient les deux types cellulaires uniquement au niveau des PMEs [76]. Les jonctions communicantes GAP sont considérées comme étant une partie intégrante de l'EDHF bien qu'à elles seules, elles ne constituent pas un mécanisme en soit, mais bien un outil de transfert de signaux entre les CE et CMLs [74, 205]. Ainsi, l'hyperpolarisation de l'endothélium induite par l'ouverture des canaux K_{Ca} décrite ci-dessus est transmise aux CMLs subjacentes. Cette hyperpolarisation n'est pas favorable à l'ouverture des VDCC des CMLs ce qui diminue l'entrée de Ca^{2+} menant à la relaxation de la CML.

Les dérivés des acides arachidoniques (AA)

La voie dérivée des AA est particulière puisqu'elle entraîne la formation de plusieurs métabolites vasoconstricteurs ou vasodilatateurs. Dans la littérature, il est considéré que la portion de cette voie incluse dans l'EDHF correspond à la portion hyperpolarisante qui est indépendante des COX [206]. La voie dérivée des AA découle de l'activation d'une phospholipase A_2 (PLA_2) qui possède une activité dépendante du Ca^{2+} . Une fois activée, la PLA_2 clive les phospholipides membranaires résultant en la libération d'acides gras insaturés

de type AA [206]. En ce qui concerne la portion incluse dans l'EDHF, ces AA peuvent être convertis en seconds messagers vasorelaxants soit par le cytochrome P450 [207, 208], soit par les lipooxygénases. Ces dérivés vasoactifs incluent les acides époxyeicosatriénoïques (EET) [209] et les acides hydroxyeicosatetraénoïques (HETE) [210, 211]. Il a été proposé que leur effet hyperpolarisant est médié par l'activation de canaux BK_{Ca} des CMLs [212-214].

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

L'implication du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans l'EDHF est plus complexe à définir considérant son rayon d'action limité puisqu'il est hautement réactif, mais également à cause du nombre de cibles potentielles [215, 216]. Cette molécule peut être produite par l'endothélium et par le muscle lisse. Il est suggéré que l'effet du H₂O₂ dans l'EDHF est médié *via* l'oxydation de protéines impliquées dans les dynamiques calciques endothéliales ou par l'effet direct du H₂O₂ sur les K_{Ca} endothéliaux ce qui favorise leur activité [217-219]. Le H₂O₂ favorise également l'activation des BK_{Ca} du muscle lisse dont l'activation engendre la sortie de K⁺ et l'hyperpolarisation de la CML [220].

1.2.3.4.2 Régulation endothéliale de la contraction des CML

L'endothélium produit des facteurs ou active des voies de signalisation pouvant favoriser la contraction des CMLs dont les plus connus seront décrits subséquentement (Figure 9). Ils sont également appelés facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF pour *Endothelial-Derived Constricting Factor*). La balance entre la production de facteurs ou de l'activation de mécanismes vasodilatateurs et vasoconstricteurs par l'endothélium est primordiale afin de maintenir une homéostasie vasculaire adéquate.

La thromboxane A₂ (TXA₂)

La TXA₂ est l'exemple qui représente le plus fidèlement cette balance entre la production de facteurs constricteurs et relaxants par l'endothélium. La TXA₂ découle du même précurseur que la PGI₂, EDRF également produit par l'endothélium par la voie des COX [178]. En condition physiologique, la production de la PGI₂ est favorisée. Par contre, une altération dans la production de ces 2 facteurs au profit de la TXA₂ est fréquemment observée en condition de dysfonction endothéliale [180] ou de vieillissement [221, 222]. Il est

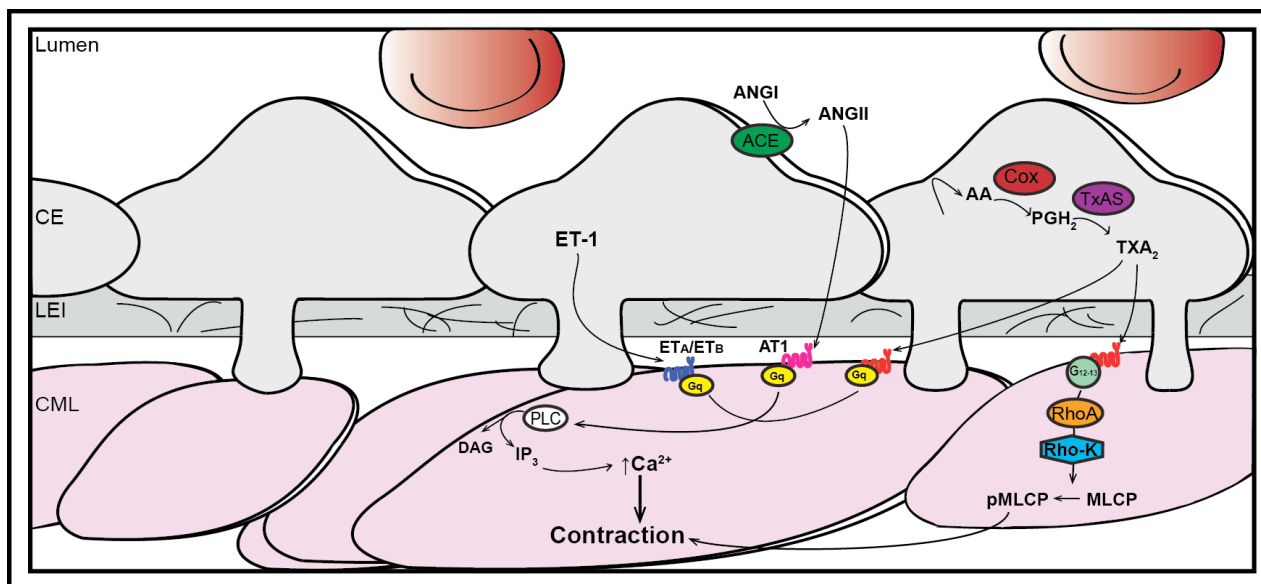


Figure 9. Schématisation simplifiée des mécanismes de contraction dépendants de l'endothélium.

Ces mécanismes incluent la voie de l'angiotensine II (ANGII), de la thromboxane A₂ (TXA₂) ainsi que de l'endothéline 1 (ET-1). La cellule endothéliale (CE) produit l'ANGII *via* l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) à sa surface. Lorsque l'ANGII lie son récepteur sur la cellule musculaire lisse (CML), il induit une augmentation de calcium (Ca²⁺) intracellulaire par la voie de la phospholipase C (PLC) menant à la contraction. La TXA₂ découle du métabolisme des acides arachidoniques (AA) par les cyclo-oxygénases (COX). La prostaglandine (PGH₂) est métabolisée *via* la thromboxane synthase (TxAS) en TXA₂. La TXA₂ active des Rho-kinase (Rho-K) de la CML menant à la phosphorylation de la MLCP et à la contraction. L'ET-1 produit au niveau de la CE agit sur la CML en activant la PLC. LEI: Lamina élastique interne, DAG: Diacylglycérole, IP₃: Inositol 1,4-5 triphosphates, ET_A/ET_B: Récepteur à l'ET-1 de type A/B, AT1: Récepteur à l'ANGII de type 1, ANGI: Angiotensine I, MLCP: Phosphatase des chaînes légères de myosine, pMLCP: MLCP phosphorylée.

suggéré que l'augmentation de l'EDCF dépendant des COX réduit la production de NO qui a un effet inhibiteur sur la TXA₂ [223, 224]. Ceci concorde avec la réduction de la biodisponibilité du NO observée en dysfonction endothéliale [160, 161].

Au niveau des CMLs, l'effet médié par la liaison de la TXA₂ à son récepteur (TP) est la contraction de la CML [136]. Le récepteur TP est un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé aux protéines G (GPCR pour *G Protein-Coupled Receptor*) [225] qui mène à l'activation de la phospholipase C (PLC) [226]. Tel qu'il sera décrit plus en profondeur dans la section 1.3, l'activation de la PLC induit la production d'IP₃ qui peut se lier à son récepteur au niveau du réticulum [227]. Ceci induit une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et la contraction de la CML. La liaison de TXA₂ à son récepteur active également la protéine RhoA suivie de la Rho kinase ce qui favorise la phosphorylation de la

MLCP [228, 229]. Sa phosphorylation réduit son l'activité, prolongeant ainsi l'état phosphorylé et activé des chaînes de myosines [229]. D'autre part, la TXA₂ réduit l'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium en diminuant l'activité des canaux K⁺ dépendant du Ca²⁺ dans l'endothélium [230] ou dans les CMLs [231]. Une hyperpolarisation moins importante permettrait probablement une inactivation plus lente des VDCC menant à un prolongement de l'état de contraction. Cependant, les mécanismes impliqués n'ont pas été mis en évidence lors de ces études.

L'angiotensine II (ANGII)

L'ANGII est un composé vasoactif complexe de par son processus de synthèse en cascade impliquant plusieurs réactions endocriniennes et enzymatiques, mais également par ses sites de production et d'action variés. Nombreuses sont les publications rapportant son importance dans la régulation de la PA et son déséquilibre en conditions pathologiques telles que l'HA [232, 233]. Physiologiquement, la synthèse de l'ANGII *via* le système rénine/angiotensine est initiée par une diminution de la PA détectée par les barorécepteurs du rein [234] ce qui induit la production de la rénine par les cellules de l'appareil juxta glomérulaire [234, 235]. La rénine est une hormone clivant l'angiotensinogène en circulation (essentiellement produit par le foie) afin de générer l'angiotensine I [236]. L'angiotensine I est par la suite métabolisée localement en ANGII par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) qui se retrouve à la membrane plasmique de certains types cellulaires comme l'endothélium [237]. L'endothélium produit donc localement de l'ANGII qui agit sur l'état de constriction des vaisseaux.

Au niveau vasculaire et de façon physiologique, l'ANGII se lie principalement aux récepteurs à l'ANGII de type 1 (AT₁) localisés sur les CMLs ainsi que sur les CEs [238]. Cette liaison active la voie de la PLC/IP₃/diacylglycérol (DAG) menant à une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire [238]. Bien que l'augmentation de Ca²⁺ au niveau endothélial active principalement des mécanismes favorisant la relaxation musculaire, il semble que l'activation en parallèle des AT₁ au niveau musculaire lisse prédomine et que la résultante est plutôt un effet constricteur [233]. Ainsi, l'infusion d'ANGII est communément utilisée dans la littérature comme modèle d'induction d'HA [239].

L'endothéline-1 (ET-1)

L'endothéline 1 (ET-1) est un peptide vasoactif synthétisé par l'endothélium [240]. L'ET-1 active plusieurs voies de signalisation résultant en la contraction des CMLs sous-jacentes, bien que certaines voies menant à la relaxation puissent être parallèlement activées par ce peptide [45]. L'ET-1 peut se lier à 2 types de GPCR, soit le récepteur à l'endothéline de type A (ET_A) et de type B (ET_B). Au niveau vasculaire, l'ET_B est retrouvé sur les CEs ainsi que les CMLs comparativement aux ET_A qui sont observés uniquement sur les CMLs [241, 242]. L'activation de l'ET_A et l'ET_B des CML active la voie de la PLC-IP₃ [243, 244] ce qui augmente la concentration intracellulaire en Ca²⁺. Lors d'une stimulation avec l'ET-1, une augmentation rapide de la phosphorylation des chaînes légères de myosine est observée, phénomène menant à la contraction de la CML [245].

Il est suggéré que l'effet constricteur de l'ET-1 peut être associé avec l'activité de la NOS-3 [246]. Par contre, cette interrelation entre l'ET-1 et le NO est complexe. D'une part, les inhibiteurs de NOS tels que le L-NAME (pour **L**-N^G-**N**itro**a**rginine **M**ethyl **E**ster) amènent une augmentation de la libération d'ET-1 [247] comparativement aux donneurs de NO tels que le SNAP (pour **S**-**N**itroso-**N**-**A**cetyl-**D**,**L**-**P**enicillamine) qui réduit la sécrétion d'ET-1 [248]. D'autre part, il semblerait que ET-1 peut moduler l'expression de la NOS [249], favoriser son activation [250] ou réduire la disponibilité de ses substrats [251]. Ainsi, une condition de dysfonction endothéliale généralement associée à un environnement favorable pour la vasoconstriction pourrait être associée à une réduction de la biodisponibilité du NO corrélée avec une augmentation de l'effet constricteur d'ET-1 [252].

1.3. Le calcium endothélial

Quel que soit le type cellulaire dont il est question, le Ca²⁺ cytosolique est un second messenger important pour l'ensemble des fonctions cellulaires, que ce soit pour l'expression génique, les fonctions métaboliques ou pour des fonctions spécifiques [253-255]. Lorsque l'on se concentre sur un type cellulaire précis, il est constaté que ses fonctions spécifiques sont finement modulées par le Ca²⁺. De plus, il est établi qu'une augmentation prolongée de Ca²⁺ intracellulaire est fortement dommageable pour la cellule, découlant en l'activation des cascades apoptotiques (*i.e* menant à la mort cellulaire) [256, 257]. Un dérèglement de ces

dynamiques est également associé à des dysfonctions cellulaires ce qui met en relief l'importance de bien comprendre les dynamiques calciques intracellulaires ainsi que leurs mécanismes de régulation. Les progrès technologiques des dernières décennies nous permettent maintenant d'observer des changements de fluorescence associés à de fins mouvements ioniques comme le Ca^{2+} présentant des cinétiques très rapides de l'ordre des millisecondes, de faibles amplitudes ainsi qu'une localisation cellulaire restreinte. C'est entre autres l'arrivée du microscope confocal à double disque rotatif (*i.e* « *spinning disk* ») dans les années 2000 qui a favorisé l'avancement rapide de la cueillette de données scientifiques et qui nous a permis de caractériser une variété de signaux calciques intracellulaires [258, 259].

1.3.1 L'origine du calcium cytosolique endothélial

Au niveau de l'endothélium, le Ca^{2+} cytosolique peut provenir de 3 compartiments principaux distincts *i.e* le réticulum endoplasmique (RE), la mitochondrie et le milieu extracellulaire, bien que le Ca^{2+} puisse également provenir d'autres localisations telles que le noyau [260]. Les mécanismes qui permettent le passage du Ca^{2+} de chacun des compartiments au milieu cytosolique et *vice versa* sont complexes et incluent plusieurs effecteurs. Cette grande diversité d'effecteurs permet de répondre dynamiquement aux besoins physiologiques. En condition basale, le Ca^{2+} libre cytosolique est maintenu à une faible concentration (*i.e* ≈ 100 nM [261]) afin de limiter l'activation des diverses fonctions cellulaires dépendantes du Ca^{2+} ou d'éviter le déclenchement de la mort cellulaire [256, 257].

1.3.1.1 Le réticulum endoplasmique

Le RE est l'organe où se produit la synthèse protéique [262] ainsi que la synthèse des phospholipides membranaires [263]. Le RE constitue la plus grande réserve de Ca^{2+} intracellulaire dans l'ensemble des types cellulaires (pour les cellules musculaires, l'analogue du RE est le réticulum sarcoplasmique; RS). Le réticulum constitue environ 75% des réserves intracellulaires en Ca^{2+} [264]. Sa concentration approximative en Ca^{2+} libre se situe aux alentours de 500 μM [265]. Il a été estimé que la concentration totale en Ca^{2+} (libre et lié) du RE pourrait s'élever dans certains cas jusqu'à 3 mM [266]. En effet, le Ca^{2+} peut se lier à des protéines chaperonnes ou à des protéines tampons telles que la calsequestrine, la calreticuline,

la GRP78 ou la calnexine. Ces différentes protéines sont impliquées dans le maintien du Ca^{2+} intra-réticulum [267], mais également dans le bon fonctionnement des fonctions de synthèse protéique [268, 269]. Bien qu'il soit généralement considéré que le RE constitue un compartiment homogène en termes de concentration de Ca^{2+} , ce concept reste sujet à discussion [270]. Une hétérogénéité au niveau de la répartition des protéines tampons/chaperonnes ou des effecteurs modulant la concentration du RE en Ca^{2+} pourrait affecter cette homogénéité et générer des microdomaines calciques intraréticulum [271]. Le RE est une réserve dynamique où les cinétiques de libération et de recapture du Ca^{2+} varient en fonction des stimulations extracellulaires et des signaux intracellulaires. En fonction des différents types cellulaires, les effecteurs permettant ces mouvements de Ca^{2+} peuvent varier (Figure 10).

1.3.1.1.1 La libération de calcium par les récepteurs à l'IP₃

Le Ca^{2+} peut être libéré du RE par 2 différents effecteurs qui sont des canaux calciques. Le Ca^{2+} peut soit être relâché *via* les IP₃Rs, soit *via* les récepteurs à la ryanodine (RyR) [272]. En ce qui concerne les CEs natives, les IP₃Rs constituent le seul effecteur permettant la libération de Ca^{2+} du RE. Bien que l'activité des RyRs ait été rapportée dans divers modèles cellulaires en culture [273, 274], l'utilisation de ryanodine (antagoniste de ce canal) n'engendre aucune modification du patron des dynamiques calciques endothéliales *in situ* et ce, dans de nombreux lits vasculaires (mésentérique [197, 275], artères du muscle crémaster [276], carotide [277], coronaire [278]) suggérant l'absence de cet effecteur dans les CEs non isolés.

L'existence des IP₃Rs a été mise en évidence dans les années 80 suite à la démonstration qu'une augmentation d'IP₃ et que sa liaison à la membrane du RE engendrait un signal calcique intracellulaire [279, 280]. Il a rapidement été mis de l'avant que le Ca^{2+} jouait un rôle dans l'activation de ce canal, bien que les dynamiques complexes d'activation/déactivation de ce dernier n'étaient pas très bien comprises [280]. La structure de ce canal correspond à un tétramère (*i.e* 4 sous-unités) résultant en une protéine de 1200 kDa. Les sous-unités de l'IP₃Rs sont exprimées sous 3 isoformes : IP₃R type 1 (IP₃R1), IP₃R type 2 (IP₃R2) et IP₃R type 3 (IP₃R3). Ces différentes isoformes possèdent environ 65% d'homologie

de séquence [281] et chacune possède des sensibilités distinctes pour les différents éléments régulateurs [2, 282, 283]. Les différentes isoformes pourraient s'hétéromériser permettant la formation d'homo ou d'hétérotétramère [284]. Ceci suggère la présence d'une diversité au

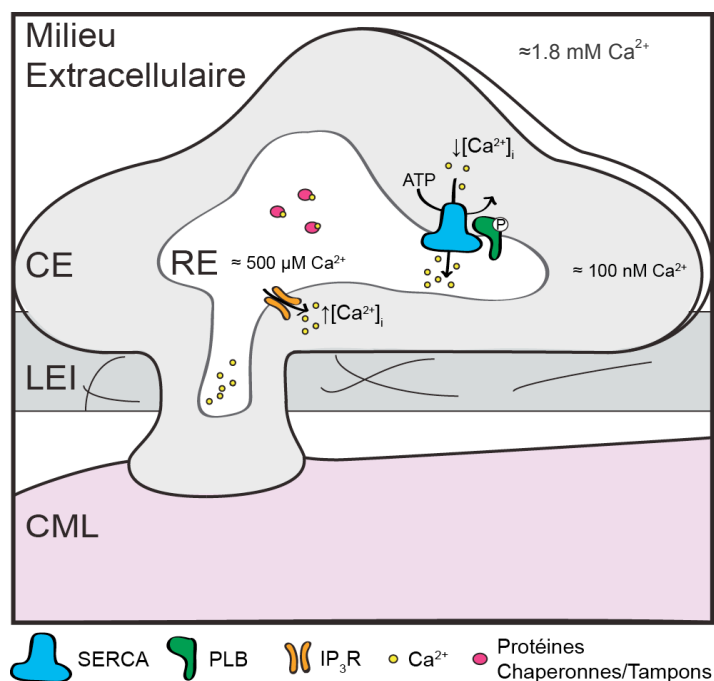


Figure 10. Protéines impliquées dans les dynamiques calciques liées au réticulum endoplasmique dans l'endothélium natif.

La libération de calcium (Ca^{2+}) du réticulum endoplasmique (RE) dans la cellule endothéliale (CE) s'effectue par les récepteurs à l'inositol 1,4-5 triphosphates (IP_3) (IP_3R). Le Ca^{2+} entre dans le RE *via* la pompe SERCA régulée par le phospholamban (PLB). Des protéines chaperonnes ou tampons auxquelles se lie le Ca^{2+} sont présentes dans le RE. La concentration de Ca^{2+} libre dans le RE est estimée à $500 \mu\text{M}$. LEI: Lamina élastique interne, CML: Cellule musculaire lisse, SERCA: *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase*, ATP: Adénosine triphosphate

niveau des propriétés biophysiques de chaque unité fonctionnelle (*i.e* tétramère).

À ce jour, de nombreux éléments modulant l'activité des IP_3Rs tels que l'ATP, le stress oxydant ou des protéines kinases/phosphatases dont CaMKII ont été identifiés. Par contre, il est clairement établi que les 2 éléments primordiaux pour leur activation sont le Ca^{2+} et l' IP_3 . Ces deux éléments influencent l'état structural du canal ce qui module l'ouverture du canal et le passage des ions calciques [285-287]. Il est important de noter que techniquement parlant, le Ca^{2+} serait le véritable ligand de ce canal puisque la liaison de l' IP_3

permet plutôt de moduler la sensibilité du récepteur au Ca^{2+} [288]. Il est suggéré que la liaison de l' IP_3 engendre un changement de conformation permettant de varier l'exposition des sites de liaisons au Ca^{2+} [289]. De plus, il a été rapporté que l'ouverture de l' IP_3R peut également être observée en l'absence d' IP_3 renforçant ainsi l'énoncé selon lequel le Ca^{2+} constitue le véritable ligand [290]. Globalement, il est donc possible de caractériser l'état du récepteur lié à l' IP_3 comme étant un état intermédiaire entre l'état fermé et ouvert; l'état ouvert pouvant uniquement être atteint lors de la liaison de l'ion calcique [285]. De nombreuses études ont permis de mettre en lumière l'effet inhibiteur du Ca^{2+} sur l' IP_3R . Ce double effet du Ca^{2+} sur le récepteur engendre une courbe sur un graphique de la probabilité d'ouverture (P_0) en fonction du Ca^{2+} qui s'apparente à une forme de cloche (*i.e* « *bell shape* ») [291]. Par exemple, on constate que la P_0 de l' $\text{IP}_3\text{R1}$ est maximale à 257 nM de Ca^{2+} (154 nM pour $\text{IP}_3\text{R2}$, 107 nM pour $\text{IP}_3\text{R3}$; valeurs obtenues dans des membranes de bicouche lipidique en présence de 2 μM d' IP_3 et 0.5 mM d'ATP du côté cytoplasmique du récepteur [2]), une probabilité qui décroît par la suite lorsque les concentrations cytosoliques en Ca^{2+} dépassent ce seuil. En d'autres mots, l'ouverture du canal par des faibles concentrations cytoplasmique en Ca^{2+} est observée, mais s'ensuit une inhibition lorsque le seuil de concentration favorisant l'activation est dépassé [2]. L'effet double du Ca^{2+} sur le récepteur serait expliqué par la présence de 2 sites distincts de liaison au Ca^{2+} présentant soit un effet de stimulation, soit un effet d'inhibition sur la libération de Ca^{2+} . Ces sites ont des constantes d'affinités (K_d) distinctes pour le Ca^{2+} ce qui permet cet effet biphasique sur l'activité du canal [2, 288]. La stimulation du canal par le Ca^{2+} est une caractéristique des l' IP_3Rs qui permet le phénomène de libération de Ca^{2+} induit par le Ca^{2+} (CICR pour C a^{2+} Induced-C a^{2+} Release). La libération de Ca^{2+} par un IP_3R induit la libération de Ca^{2+} par le récepteur adjacent permettant une activation en cascade de plusieurs récepteurs côte à côte [292]. Tel que rapporté précédemment, l' IP_3 permet de moduler la sensibilité du récepteur au Ca^{2+} . En plus de favoriser la liaison du Ca^{2+} au site simulateur, la liaison de l' IP_3 décroît le K_d du site inhibiteur [288]. En ce qui concerne la régulation par le Ca^{2+} de l' IP_3R , certaines études suggèrent une influence du Ca^{2+} intraréticulum sur l'activité du canal [293, 294], probablement *via* une protéine accessoire [295] ce qui modifierait la sensibilité du canal à ses ligands, mais cet aspect de régulation ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique [296, 297].

La sensibilité du récepteur pour l'IP₃ varie pour l'ensemble des isoformes ce qui influence le type de dynamiques calciques en résultant. On rapporte que l'IP₃R2 est nécessaire pour maintenir des oscillations calciques soutenues tandis que l'IP₃R3 est associé aux transients calciques monophasiques [283, 298]. Il est suggéré que la plus grande sensibilité

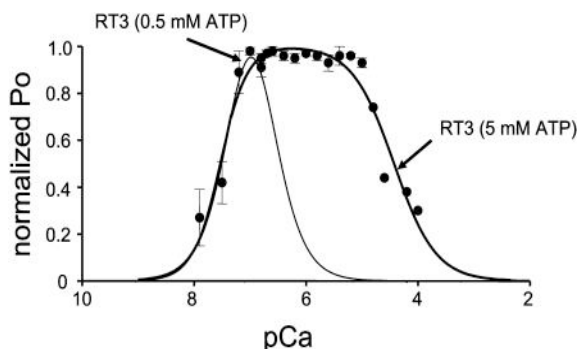


Figure 11. Effet de l'ATP sur la probabilité d'ouverture du récepteur à l'IP₃ de type 3.

L'augmentation de la concentration d'adénosine triphosphate (ATP) du côté cytoplasmique du récepteur à l'inositol 1,4-5 triphosphates de type 3 (IP₃R3; RT3) augmente la gamme de concentration de Ca²⁺ maintenant le canal dans une configuration ouverte représentée par une probabilité d'ouverture (P₀) d'une valeur de 1. Modifiée de : [2]

pour l'IP₃ du récepteur à l'IP₃R2 serait en cause (IP₃R2 > IP₃R1 > IP₃R3 [282, 299]; K_d pour l'IP₃: 0.10 μ M, 0.27 μ M, 0.40 μ M [282]). La liaison de l'IP₃ à chacune des 4 sous-unités du tétramère serait nécessaire afin de permettre son rôle modulateur sur l'ouverture du canal subséquente à la liaison du Ca²⁺ [300]. Il a ainsi été suggéré que les IP₃Rs peuvent agir à titre de protéine tampon d'IP₃ puisque l'IP₃ peut se lier à certaines sous-unités, mais pas toutes, ce qui ne permet pas l'activation du canal, mais limite toutefois la diffusion de l'IP₃ dans la cellule [301].

De façon intéressante, augmenter de manière importante la concentration en ATP (5 mM en comparaison avec 0.5 mM) modifie drastiquement la P₀ pour l'IP₃R3 (Figure 11). Ceci permettrait un maintien de l'état ouvert du canal de cette isoforme, et ce, pour un plus grand éventail de concentrations cytosoliques en Ca²⁺. Ceci serait expliqué par une diminution d'environ 200 fois de la valeur du K_d pour le Ca²⁺ au niveau du site inhibiteur signifiant que la concentration nécessaire afin d'engendrer une inhibition du canal par le Ca²⁺ est plus élevée. L'atteinte de la P₀ maximale pour cette isoforme en présence de 5 mM d'ATP est maintenue sur l'intervalle de concentration en Ca²⁺ d'environ 100 nM jusqu'à 10 μ M [2]. L'ATP peut

également influencer l'activité de l'IP₃R1. Par contre, cette modulation surviendrait à des concentrations submillimolaires comparativement à l'IP₃R3. Finalement, modifier les concentrations en ATP n'affecterait pas la valeur de P₀ d'IP₃R2 [282].

1.3.1.1.2 La recapture du calcium par la pompe SERCA

Jusqu'à ce jour, une seule voie de recapture du Ca²⁺ par le RE a été identifiée, la pompe SERCA qui est exprimée sous 3 isoformes (SERCA1 à 3) et qui possède plusieurs variants laissant place à une grande diversité de propriétés biochimiques [302]. Cet élément est impliqué dans l'ensemble des dynamiques calciques endothéliales puisqu'il permet de limiter dans le temps l'élévation de Ca²⁺ intracellulaire. La pompe SERCA utilise l'énergie de l'hydrolyse d'ATP afin de permettre le transport des ions calciques au travers de la membrane du RE (2 ions par ATP hydrolysée) [303]. Ainsi, l'état énergétique de la cellule est un facteur essentiel afin de permettre le bon fonctionnement de ce mécanisme [304]. Une colocalisation des mécanismes produisant l'ATP et la pompe SERCA permettrait un couplage structure-fonction d'intérêt tel que suggéré au niveau musculaire [305].

L'activité de la pompe SERCA est régulée par différents éléments, dont des protéines accessoires telles que le phospholamban (PLB) ou la sarcopiline [306-308]. Le PLB est une protéine ancrée dans la membrane du RE/RS et son rôle dans la régulation de SERCA a largement été décrit au niveau du myocarde [309, 310]. Une altération dans sa capacité à réguler SERCA est rapportée dans plusieurs conditions pathologiques cardiaques comme la cardiomyopathie dilatée [311, 312] ou la défaillance cardiaque [313, 314]. Dans son état non-phosphorylé, le PLB inhibe la pompe SERCA en diminuant son K_d pour le Ca²⁺ [315]. La phosphorylation du PLB par PKA (Ser16) ou CaMKII (Thr17) [316, 317] engendre un changement de sa conformation [315]. Certaines publications ont rapporté une dissociation subséquente du PLB avec la pompe [315] pour générer une pentamérisation du PLB [318]. Dans les deux cas, la phosphorylation du PLB relève l'effet inhibiteur exercé sur la pompe et augmente la sensibilité de SERCA au Ca²⁺ stimulant ainsi la recapture du Ca²⁺ intracellulaire. Cette régulation semble spécifique à l'isofome SERCA1 et SERCA2 qui possèdent le domaine de liaison au PLB comparativement à SERCA3 qui ne semble pas l'exprimer [319, 320]. En co-transfectant les différentes isoformes de la pompe avec le PLB, seuls SERCA1 et SERCA2

démontraient une diminution de leur activité en présence du PLB. Ces résultats suggèrent que les variations au niveau de la séquence de SERCA3 élimineraient la région permettant la régulation par le PLB de cette isoforme [319]. Les isoformes de SERCA se distinguent également par leur sensibilité au stress oxydatif. Il est suggéré que le variant 3a de la pompe SERCA soit largement plus résistant aux dommages causés par les espèces réactives d'oxygène (ROS) telles que le H_2O_2 ou le $O_2\cdot^-$ que le variant 2b. [321, 322].

Le patron d'expression de SERCA est fortement influencé par le processus de mise en culture cellulaire. Lorsque fraîchement isolées, les CEs d'aorte de rat (RAEC) expriment les isoformes SERCA2b et SERCA3. Par contre, l'expression de SERCA3 semble rapidement perdue au fil des passages cellulaires au profit de l'expression exclusive de SERCA2b [323]. L'expression de SERCA au niveau des CEs de la veine ombilicale humaine (HUVEC) se distingue des RAECs en exprimant exclusivement l'expression de SERCA3. Cette expression se poursuit au fil des passages bien que SERCA2b soit rapidement l'isoforme majoritairement exprimée [323]. Des études effectuées par des groupes distincts suggèrent que SERCA3 soit l'isoforme prédominante dans l'endothélium fraîchement isolé [324, 325]. Ces études renforcent l'importance des études *in vivo* particulièrement en ce qui concerne les dynamiques endothéliales.

1.3.1.2 La mitochondrie

Le rôle principal de la mitochondrie est la production d'énergie. Cependant, le rôle de cet organelle dans la régulation des dynamiques calciques ne fait plus aucun doute [326, 327]. La littérature rapporte que la mitochondrie constitue la deuxième réserve intracellulaire en Ca^{2+} (25% de cette réserve calcique) [264]. Elle possède plusieurs mécanismes spécifiques permettant le mouvement de l'ion calcique au travers de ses membranes. Ces mécanismes sont décrits dans la section 1.5 entièrement dédiée à la mitochondrie.

1.3.1.3 Le milieu extracellulaire

La concentration extracellulaire en Ca^{2+} est d'environ 1.8 mM comparativement à environ 100 nM pour sa concentration intracellulaire générant ainsi un important gradient électrochimique entre les 2 compartiments. Le milieu extracellulaire est donc une source

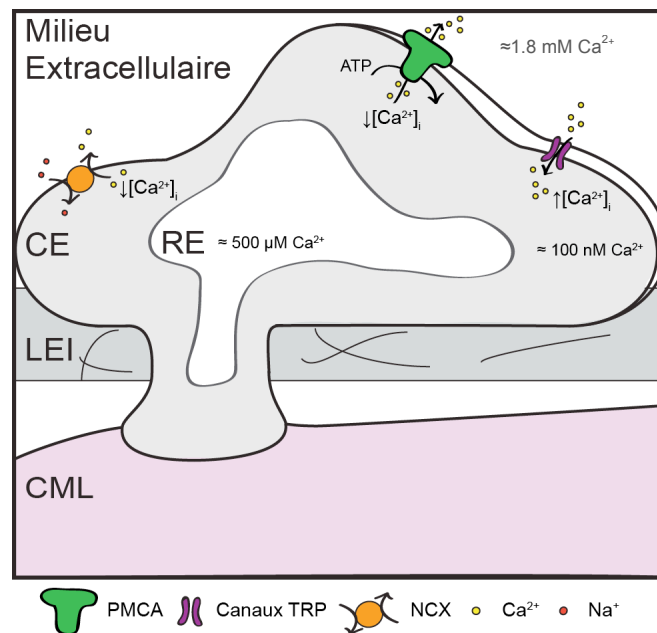


Figure 12. Protéines impliquées dans les dynamiques calciques reliées au milieu extracellulaire et à la membrane plasmique.

L'efflux de calcium (Ca^{2+}) du milieu intracellulaire de la cellule endothéliale (CE) est possible grâce à la pompe PMCA de la membrane plasmique et à l'échangeur sodium (Na^+)/ Ca^{2+} (NCX). Le Ca^{2+} entre dans la cellule par des canaux non sélectifs au Ca^{2+} de la famille des TRPs. La concentration de Ca^{2+} extracellulaire est estimée à 1.8 mM. LEI : Lamina élastique interne, CML : Cellule musculaire lisse, RE : Réticulum endoplasmique, PMCA : *Plasma membrane Ca^{2+} ATPase*, ATP: Adénosine triphosphate

virtuellement illimitée de Ca^{2+} . Plusieurs mécanismes permettent de contrôler l'entrée de Ca^{2+} , mais également l'extrusion du Ca^{2+} intracellulaire (Figure 12).

1.3.1.3.1 Mécanisme d'influx calcique du milieu extracellulaire

La membrane plasmique exprime plusieurs protéines qui permettent l'entrée de Ca^{2+} vers le milieu intracellulaire, dont les TRPs. Les TRPs sont une famille de canaux dont l'importance a été notée dans plusieurs fonctions cellulaires endothéliales telles que la régulation du tonus vasculaire [328]. Ce sont des canaux à 6 passages transmembranaires dont le pore est localisé entre le 5^e et 6^e passage transmembranaire. Les TRPs pourraient être retrouvés sous forme de tétramère laissant place à la possibilité d'hétéromérisation [329]. Leur sélectivité pour le Ca^{2+} varie considérablement puisqu'ils sont également perméables au Na^+ , K^+ ainsi que d'autres ions tels que le Mg^{2+} [330]. Parmi les TRPs identifiés dans l'endothélium, on retrouve les TRPV1/4, TRPA1 ou TRPC1/3/4/6 [145, 331]. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de TRPA1 et TRPV4 dans les dynamiques calciques endothéliales locales. L'activité de ces canaux est influencée par de multiples facteurs dont la température,

l'environnement lipidique, l'étirement de la membrane, la CaM ou l'épuisement du RE en Ca^{2+} [332, 333]. La littérature fait maintenant largement état d'un mécanisme cellulaire palliant à la déplétion du RE du Ca^{2+} . Ce mécanisme survient *via* une voie de signalisation appelée SOCE (pour Store-Operated Ca^{2+} Entry; aussi rapportée comme étant le CCE : Capacitive Calcium Entry) (Figure 13). Lors d'une diminution importante de la concentration

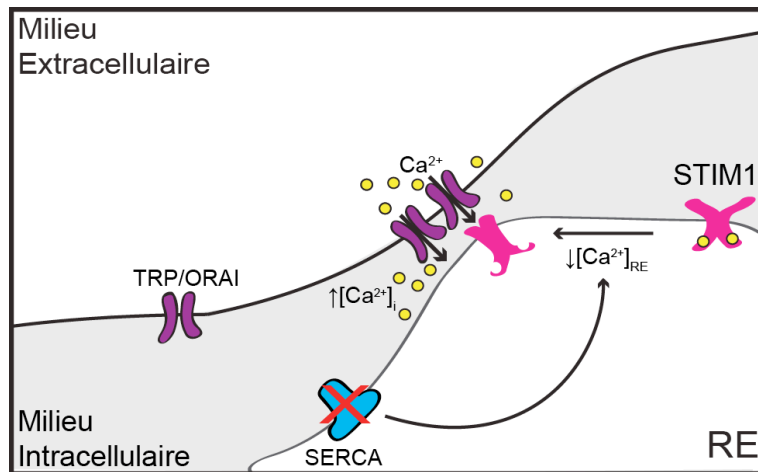


Figure 13. Schématisation simplifiée du mécanisme du SOCE.

Le mécanisme du SOCE (*Store-Operated Calcium Entry*) est observé expérimentalement par l'inhibition de la pompe SERCA (*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase*). Ceci réduit le contenu en calcium (Ca^{2+}) du réticulum endoplasmique (RE). Le Ca^{2+} se dissocie de la protéine STIM1 (*Stromal interaction molecule 1*) ce qui induit un changement de sa conformation. Un rapprochement de STIM1 avec la membrane plasmique permet l'activation du courant I_{crac} (courant des canaux activés par la libération de Ca^{2+} ; CRAC : *Calcium Release Activated Channel*) généré par l'ouverture des canaux TRP ou ORAI ce qui permet l'entrée subséquente de Ca^{2+} du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire.

de Ca^{2+} intraréticulum, le Ca^{2+} se dissocie d'une protéine localisée à la membrane du réticulum nommée STIM1 (pour STromal Interaction Molecule 1). Le côté intraliminaire de cette protéine à 1 passage transmembranaire possède un domaine EF (« *EF-hand* ») qui agit à titre de senseur calcique [334]. La dissociation du Ca^{2+} du domaine EF engendre un changement de conformation de STIM1 [335] qui permet son interaction avec des canaux à la membrane plasmique, interaction qui induit leur ouverture et l'entrée de Ca^{2+} [336, 337]. Le SOCE est induit expérimentalement en bloquant la recapture du Ca^{2+} par SERCA [338]. L'identification du canal responsable de cette entrée de Ca^{2+} a fait l'objet d'une longue quête qui est toujours en cours. Un consensus sur l'identité de ce canal permettant le courant I_{crac}

(courant des canaux activés par la libération de Ca^{2+} ; CRAC : *Calcium Release Activated Channel*) n'est toujours pas obtenu [339]. Plusieurs canaux ont été suggérés tels que TRPC1/2/4/6 [336, 340] ou ORAI1 [341, 342]. Il pourrait être suggéré que les canaux responsables du SOCE varient entre les types cellulaires.

1.3.1.3.2 Mécanismes d'efflux calcique vers le milieu extracellulaire

La pompe PMCA

La PMCA (pour *Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*) appartient à la même famille que la pompe SERCA, soit les pompes de type P [343]. Comparativement à la pompe SERCA qui possède une stœchiométrie de 2 Ca^{2+} : 1 ATP [303], la PMCA possède une stœchiométrie de 1 Ca^{2+} : 1 ATP [344]. Ce mécanisme d'extrusion est donc plus énergivore en termes de molécules nettes transportées par ATP que la recapture du Ca^{2+} par le RE. La PMCA possède une grande affinité pour le Ca^{2+} signifiant qu'elle s'active à d'aussi faibles concentrations de Ca^{2+} que 200 nM [345, 346]. Le maintien du niveau basal de Ca^{2+} (« *resting level* ») est donc contrôlé par la PMCA puisqu'elle s'active suite à de fins changements de Ca^{2+} intracellulaire par rapport au niveau de base (≈ 100 nM). De plus, il est rapporté que son rendement est peu élevé l'impliquant davantage dans un rôle de maintien. La CaM constitue un des mécanismes de régulation le plus décrits de la PMCA [347]. En absence d'interaction avec la CaM, la PMCA se retrouve dans un état d'autoinhibition. Lors d'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se lie à la pompe modifiant son K_d pour le Ca^{2+} et sa vitesse de transport (V_{max}) de façon à favoriser l'extrusion du Ca^{2+} [344]. Bien que la régulation par la CaM soit le plus décrite, il est rapporté que le rôle des phospholipides membranaires serait tout aussi important en réduisant également le K_d de la pompe pour le Ca^{2+} tout en augmentant son V_{max} [345, 348, 349]. La pompe PMCA est exprimée sous 4 isoformes (PMCA1 à 4) [350], dont l'isoforme 1 et 4 ont été identifiés au niveau des CEs [351, 352]. L'expression de nombreux variants de ces isoformes permet une grande diversité de pompe ayant par exemple des affinités distinctes pour la CaM [353, 354]. Ainsi, une expression différentielle de ces différentes isoformes/variants pourrait être impliquée dans la présence de microdomaines calciques et dans la régulation fine du Ca^{2+} intracellulaire en modulant localement l'extrusion du Ca^{2+} à des taux distincts. Cette possibilité a été mise en

évidence par la présence de la PMCA4 préférentiellement localisée dans les radeaux lipidiques des synapses du cervelet [355]. Le rôle de la PMCA est principalement étudié suite à la déplétion du RE (*i.e* SOCE) [356, 357]. Cette condition expérimentale nécessite l'inhibition de la pompe SERCA ce qui limite le retour aux valeurs de base du Ca^{2+} intracellulaire. Il est donc primordial de considérer cet aspect lorsque le rôle de la PMCA est évalué.

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

La découverte de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) comme mécanisme d'extrusion du Ca^{2+} a eu lieu au milieu des années 1960. Il avait été suggéré qu'il existait un mécanisme d'efflux du Ca^{2+} qui requerrait peu d'énergie et qui était dépendant des gradients de concentration de Ca^{2+} et du Na^+ [358, 359]. Il est maintenant bien connu que le NCX est un mécanisme d'extrusion de Ca^{2+} qui est essentiellement dirigé par le gradient électrochimique de Na^+ qui est en plus grande concentration à l'extérieur de la cellule. Le NCX engendre la sortie de Ca^{2+} à un ratio de 3 Na^+ : 1 Ca^{2+} , résultant en un gain net d'une charge positive au niveau intracellulaire [360]. Cet échangeur peut dans certaines conditions inverser le sens de son transport ionique (« *reverse mode* »), particulièrement au niveau des cellules excitables qui possèdent des canaux sodiques dépendants du voltage (Na_v), de façon à favoriser une extrusion du Na^+ et permettant une entrée de Ca^{2+} [361]. La littérature démontre que cette inversion semble impliquée dans la perte de l'homéostasie ionique favorisant une surcharge calcique (« *Ca²⁺ overload* ») observée en cas de pathologie au niveau des myocytes cardiaques [362, 363].

En condition physiologique, le NCX est reconnu pour permettre une sortie de Ca^{2+} du milieu intracellulaire d'où l'inclusion du NCX dans la liste des mécanismes d'efflux calcique. Ses cinétiques d'extrusion se distinguent de la PMCA par sa faible affinité pour le Ca^{2+} (environ 10 fois moins) et la rapidité de son transport (de 10 à 50 fois plus rapide) [364]. Ainsi, de par ses propriétés biochimiques, le NCX régule des augmentations calciques transitoires de grandes amplitudes (*i.e* générant une élévation importante de la concentration en Ca^{2+}) afin de rétablir rapidement le niveau basal de Ca^{2+} [364]. Le NCX est exprimé sous 3 gènes distincts résultant en 3 isoformes (NCX1 à 3) qui présentent plusieurs variants [365]. Il est rapporté que le NCX1 est exprimé dans tous les types cellulaires chez le mammifère, dont les CEs [351], expliquant probablement pourquoi il constitue l'isoforme la plus décrite [366].

Son rôle dans les dynamiques calciques endothéliales a été mis en évidence par sa capacité à totalement restituer le niveau basal de Ca^{2+} suite à une déplétion du RE couplée à une inhibition de PMCA [367]. Retirer le Na^+ extracellulaire diminue de près de 50% la capacité de la cellule à réduire le Ca^{2+} intracellulaire suite à une déplétion du RE induit par l'ajout d'acide cyclopiazonique (CPA) [368]. Ces résultats suggèrent que le NCX peut fonctionnellement jouer un rôle dans l'efflux calcique au niveau des CEs. Cependant, la déplétion du RE constitue une condition non-physiologique et le rôle du NCX reste à montrer.

1.3.2 Les dynamiques calciques endothéliales

Les signaux calciques sont généralement catégorisés selon leur niveau de dispersion dans la cellule (caractéristique spatiale; dispersion globale ou locale) et selon leur durée (caractéristique temporelle) [369]. Ils sont finement contrôlés afin de rétablir le niveau basal de Ca^{2+} soit en se liant à des protéines accessoires ou tampons, en étant extrudé de la cellule ou en réentrant dans les compartiments qui agissent comme réserve. Comparativement aux autres seconds messagers, le Ca^{2+} ne peut être métabolisé ou dégradé. Les mécanismes permettant le retour aux valeurs de base sont majoritairement des pompes nécessitant l'hydrolyse d'ATP et sont donc énergivores. Il est ainsi avantageux pour la cellule de développer des signalisations qui permettent d'atteindre des concentrations élevées en Ca^{2+} localement, mais qui de façon absolue génèrent une plus faible quantité de Ca^{2+} à extruder/recapter du milieu intracellulaire.

1.3.2.1 Les dynamiques d'ordre global

Les dynamiques calciques ont longtemps été étudiées en termes d'augmentation globale de Ca^{2+} . Le terme « global » signifie une augmentation de Ca^{2+} qui occupe une portion importante, si ce n'est pas l'ensemble, de la cellule. Les vagues calciques (« Ca^{2+} wave ») sont caractérisées comme étant une augmentation importante de Ca^{2+} intracellulaire qui se déplace dans la cellule et sont généralement incluses dans cette catégorie. Le terme « global » est également utilisé lors d'analyses d'imagerie calcique qui inclut simultanément plusieurs cellules d'un même champ optique. On parle alors de changement d'« ordre global » de Ca^{2+} sans offrir une spécificité sur l'état de cette augmentation au niveau intracellulaire. [370].

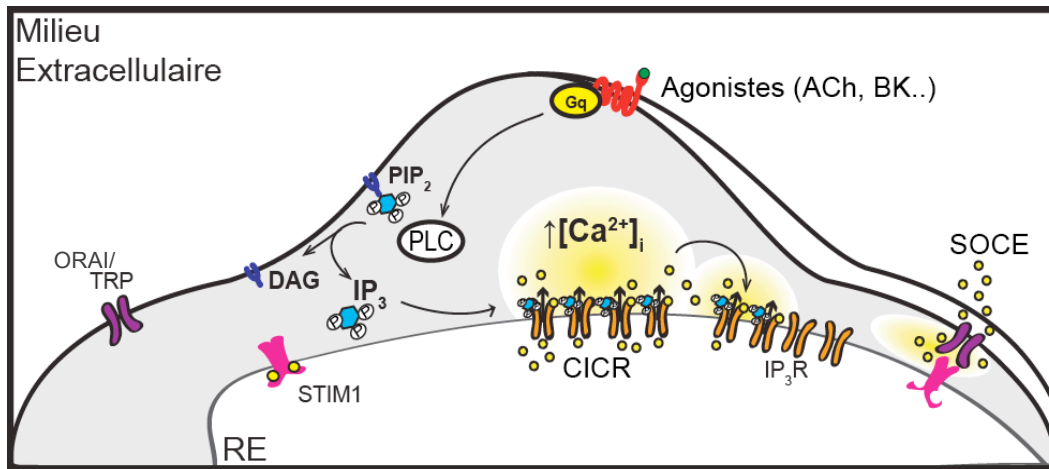


Figure 14. Schématisation simplifiée des voies de signalisation menant à une augmentation intracellulaire d'ordre global de calcium.

La dynamique calcique d'ordre global est initiée par la liaison d'agonistes à leurs récepteurs membranaires activant la voie de la phospholipase C (PLC). La PLC activée clive le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) de la membrane plasmique en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4-5 triphosphate (IP₃). L'IP₃ lie son récepteur (IP₃R) localisé à la membrane du reticulum endoplasmique (RE) induisant la libération de calcium (Ca²⁺) du RE. Par un mécanisme de CICR (*Ca²⁺ Induced-Ca²⁺ Release*), plusieurs IP₃R sont activés simultanément réduisant la concentration intraréticulum en Ca²⁺. Le Ca²⁺ intraréticulum se dissocie de la STIM1 (*Stromal interaction molecule 1*) engendrant son changement de conformation, son rapprochement des canaux TRP/ORAI à la membrane plasmique et l'entrée de Ca²⁺ par le mécanisme de SOCE (*Store-Operated Calcium Entry*). ACh : Acétylcholine, BK : Bradykinine

Au niveau de l'endothélium, les dynamiques d'ordre global sont souvent générées expérimentalement par des agonistes tels que l'ACh ou la bradykinine (Figure 14) [371, 372], mais sont également générées par des stimuli physiques comme les forces de cisaillement [373]. Les récepteurs à l'ACh sont des GPCR qui mènent à l'activation de la PLC [374]. Cette phospholipase clive le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂), un constituant lipidique de la membrane plasmique. Le PIP₂ clivé résulte en deux molécules, DAG et l'IP₃, qui agissent comme second messenger [375]. Il a été démontré que le DAG module directement l'activité de certaines pompes ou canaux, mais il a principalement été étudié pour son rôle dans l'activation de la PKC [376]. Pour sa part l'IP₃ qui diffuse dans le cytosol génère un signal calcique classique de type biphasique. Une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire importante est initialement observée (« *Ca²⁺ peak* ») correspondant à l'ouverture de nombreux IP₃R suivi d'un maintien de l'augmentation de Ca²⁺ à un niveau supérieur que le niveau basal (« *sustained Ca²⁺ increase* ») correspondant au mécanisme de SOCE [377, 378]. D'après la

littérature, ces dynamiques calciques induites par des agonistes endothéliaux peut résulter en une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} près de $1 \mu\text{M}$ [261, 378].

Le Ca^{2+} est un élément qui en grande concentration sur un décours temporel prolongé est toxique pour la cellule et mène à sa mort [256]. Il n'est donc pas bénéfique pour la cellule de se munir uniquement de ce type de réponses ce qui activerait de nombreux mécanismes dépendants du Ca^{2+} à chaque stimulation. Bien qu'un grand nombre de publications aient utilisé les dynamiques d'ordre global pour montrer une altération endothéliale [379, 380], ce type de signal est peu présent de façon basale ou physiologique [370].

1.3.2.2 Les dynamiques d'ordre local

Les dynamiques d'ordre local se distinguent des dynamiques d'ordre global par leur observation en condition basale (*i.e* en absence de stimulation par des agents pharmacologiques), leur restriction spatiale, leurs caractéristiques temporelles ainsi que la concentration de Ca^{2+} absolue libérée. La restriction du signal permet d'obtenir des concentrations locales élevées en Ca^{2+} tout en requérant une quantité de Ca^{2+} absolue plus faible ce qui permet de cibler certains mécanismes sans déployer l'ensemble du Ca^{2+} en réserve. Ces dynamiques auraient donc un meilleur rendement énergétique tout en permettant un ciblage des fonctions cellulaires spécifiques. Notons que malgré qu'ils puissent être observés en absence d'agents pharmacologiques, les signaux d'ordre local peuvent tout de même être amplifiés par l'ajout d'agonistes [370]. Les dynamiques calciques locales sont régulièrement définies comme étant une composante des microdomaines de signalisations. Le groupe de Brant E. Isakson a offert une définition intéressante des microdomaines de signalisation. Celle-ci met en évidence différentes caractéristiques d'un microdomaine telles que la concentration de certaines protéines dans une région spécifique de la cellule permettant une association protéine-mécanisme d'activation [381]. Les éléments structurels comme la PME sont un facteur considérable pour l'établissement de microdomaines de signalisations.

Le rôle des dynamiques calciques globales dans la fonction endothéliale a largement été décrit dans la littérature. Par contre, la caractérisation des dynamiques calciques locales a nécessité un avancement majeur au niveau des technologies d'imageries disponibles. À ce jour, plusieurs signaux calciques locaux endothéliaux ont été identifiés.

1.3.2.2.1 Les pulsars calciques

Chronologiquement, les pulsars calciques furent les premiers éléments locaux caractérisés dans l'endothélium natif (Figure 15). Pour étudier cette signalisation, des artères mésentériques de résistance, entières, mais ouvertes longitudinalement ont été utilisées par le groupe de Mark T. Nelson. L'étude publiée en 2008 [197] dénotait la présence d'oscillations calciques spécifiquement au niveau des fenestrations de la LEI par microscopie confocale à haute vitesse de type « *spinning disk* ». Ces fenestrations sont les sites potentiels des PME. Un marquage par immunofluorescence dirigé contre les IP₃Rs a montré la présence d'une concentration importante de marqueur fluorescent au niveau des fenestrations de la LEI suggérant que la signalisation calcique observée par microscopie confocale à haute vitesse

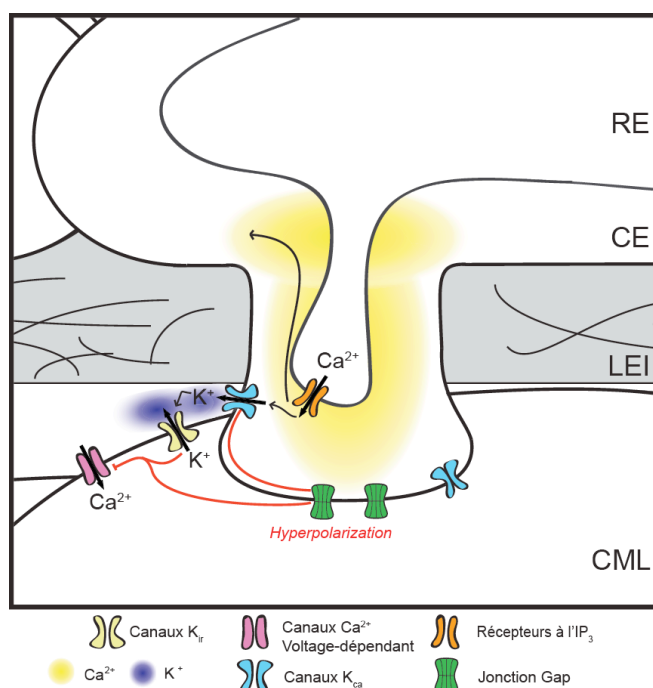


Figure 15. Schématisation simplifiée des pulsars calciques endothéliaux.

Les pulsars calciques sont une libération de calcium (Ca²⁺) du réticulum endoplasmique (RE) par les récepteurs à l'inositol 1,4-5 triphosphate (IP₃; IP₃R) localisée dans la projection myoendothéliale (PME). Les pulsars activent les canaux potassiques dépendants du Ca²⁺ (K_{Ca}) à la membrane plasmique de la PME. Ceci engendre une sortie de potassium (K⁺) de la cellule endothéliale (CE) ce qui induit son hyperpolarisation. L'hyperpolarisation est transmise aux cellules musculaires lisses (CML) par les jonctions GAP provoquant la fermeture des canaux calciques dépendants du voltage de la CML et la relaxation de la CML. L'hyperpolarisation de la CML peut être augmentée par l'ouverture de canaux K_{ir} (canaux potassiques à rectification entrante) qui présentent une plus grande conductance en présence de K⁺ extracellulaire. Leur ouverture engendre une sortie de K⁺ de la CML. LEI : Lamina élastique interne

pourrait être la résultante d'une libération de Ca^{2+} spécifiquement dans ces régions par ces récepteurs. Afin de relier les 2 types d'observations, des outils pharmacologiques altérant le fonctionnement des différentes composantes des dynamiques calciques ont été utilisés en combinaison avec de l'imagerie calcique. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs des IP_3Rs démontre une disparition de ces signaux calciques locaux tout comme l'utilisation d'inhibiteurs de pompe SERCA. En contrepartie, le retrait du Ca^{2+} extracellulaire n'affecte pas la stochasticité des pulsars calciques ce qui suggère qu'il s'agit d'une libération des réserves intracellulaires en Ca^{2+} . Ces résultats démontrent que les pulsars calciques résultent d'une libération de Ca^{2+} du RE *via* les IP_3Rs localisés dans cette PME. Au niveau des cinétiques, les pulsars calciques ont une amplitude d'environ $1.75 F/F_0$, une dispersion d'environ $15 \mu\text{m}^2$, une durée d'environ de 260 ms et une fréquence d'environ 0.09 Hz. [197]. Ces observations ont été effectuées en conditions basales suggérant l'importance de cette signalisation dans les fonctions fondamentales de l'endothélium. Il est important de mettre en relief que l'observation des pulsars calciques nécessite que l'on conserve la structure artérielle afin de préserver la PME. Ce type de signalisation ne peut donc pas être observé dans des cellules en culture en monocouche.

Il a été démontré que le Ca^{2+} libéré spécifiquement dans la PME module l'activité des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ localisés à la membrane plasmique de cette structure et dont l'activation est Ca^{2+} dépendante [196-198]. Plusieurs études effectuées par d'autres groupes de recherche ont également permis de mettre en lumière le rôle de ce microdomaine calcique pour la modulation du potentiel membranaire endothélial. Ainsi, on retrouve dans la littérature les appellations pulsars calciques (« *Ca²⁺ pulsars* ») [197], événements calciques spontanés (« *spontaneous Ca²⁺ events* ») [275] ou wavelettes calciques (« *Ca²⁺ wavelets* ») [298] pour des libérations de Ca^{2+} localisées dans les PMEs, qui sont résistantes à l'élimination du Ca^{2+} extracellulaire et abolies par les inhibiteurs d' IP_3Rs ou de pompe SERCA. Ces signalisations ont toutes été reliées à l'activation des canaux K_{Ca} dans la PME.

Notons que ces dynamiques calciques locales IP_3R -dépendantes peuvent être modulées par un mécanisme de rétroaction myoendothéliale [275, 276]. Des signaux tels qu'une augmentation d' IP_3 ou de Ca^{2+} provenant des CMLs peuvent être transmis aux CEs *via* les jonctions GAP [382]. Ceci permet une augmentation du Ca^{2+} dans l'endothélium [276, 383] et

l'activation des mécanismes favorisant la relaxation des CMLs sous-jacentes [276]. Le couplage au niveau des augmentations de Ca^{2+} intracellulaire de ces deux types cellulaires peut être expérimentalement observé par l'ajout à la préparation artérielle de phényléphrine (PE), un agoniste des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergique des CMLs [275, 276, 384]. L'activation de ces récepteurs engendre une vasoconstriction artérielle en augmentant la concentration intracellulaire de Ca^{2+} au niveau des CMLs [385]. Sur des préparations artérielles ouvertes longitudinalement ou sur des préparations d'artères pressurisées (*i.e* artères montées sur un système où une pression intraluminal est imposée) en microscopie confocale à haute vitesse, il est possible d'observer une augmentation du Ca^{2+} dans l'endothélium spécifiquement dans les PMEs suite à l'ajout de PE. Ces études suggèrent ainsi la présence de mécanismes de rétroaction négatifs par l'endothélium en fonction de l'état contractile des CMLs [275, 276].

Les diverses études citées ci-dessus ont été effectuées dans différents lits vasculaires (mésentérique [197, 275], muscle crémaster [276]) ou différentes espèces animales (souris [197], rat [275], hamster [276]) ce qui peut expliquer la disparité observée lors de la caractérisation de ces événements calciques. Ces disparités peuvent être expliquées par des différences structurelles permettant des variations en termes de durée ou de dispersion du signal calcique. Par exemple, les fenestrations de la LEI présentent un plus grand diamètre apparent dans les artères provenant du muscle crémaster où ont été caractérisées les wavelettes calciques comparativement aux fenestrations des artères mésentériques où ont été caractérisés les pulsars calciques. Ceci suggère la possibilité de PMEs de plus grandes dimensions dans les artères qui proviennent du muscle crémaster [197, 276]. Ainsi, les signaux calciques se retrouvant dans les PMEs des vaisseaux du muscle crémaster peuvent diffuser dans un plus grand volume résultant en l'observation de signaux calciques avec une plus grande superficie, mais ayant également une plus longue durée comparativement aux pulsars calciques (wavelette calcique: $45 \mu\text{m}^2$, 450 ms *Vs.* pulsar calcique: $15 \mu\text{m}^2$, 260 ms). Finalement, de petites variations au niveau des méthodes d'analyse ou des définitions des diverses cinétiques peuvent expliquer la dispersion des résultats pour un critère qui peut sembler identique de prime abord.

Les études présentées dans cette thèse ont été effectuées sur des artères mésentériques de souris et basées sur l'étude caractérisant les pulsars calciques [197]. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, l'appellation pulsar calcique sera favorisée.

1.3.2.2.2 Les «*TRP sparklets*»

L'influx calcique est principalement étudié *via* le mécanisme de SOCE qui permet de remplir le RE suite à une déplétion complète de cette réserve intracellulaire en Ca^{2+} . La littérature démontre que cette entrée de Ca^{2+} qu'on qualifie d'ordre global provient principalement de TRPs. Par contre, l'entrée de Ca^{2+} par les canaux TRPs peut également être responsable de signaux calciques de plus faibles amplitudes et dispersions que la réponse calcique observée lorsque le SOCE est déclenché. La diversité de signalisations calciques locales résultant des TRPs prend sans cesse de l'ampleur et ces signalisations sont généralement nommées selon l'isoforme des TRPs impliquée, suivi du terme « *sparklets* » (Figure 16). Il ne faut pas confondre ces signalisations avec les « *Ca²⁺ sparklets* » observés dans les cellules musculaires qui résultent d'une entrée de Ca^{2+} *via* les VDCC et qui induisent du CICR avec les RyRs à proximité [386, 387]. La libération de Ca^{2+} par les RyRs dans les cellules musculaires est désignée « *Ca²⁺ spark* » [388, 389].

Les premiers effecteurs des dynamiques calciques locales endothéliales résultant d'un influx calcique à avoir été identifiés sont les TRPV4. Ce canal est reconnu dans la littérature pour sa capacité à agir à titre de mécanosenseur [390]. Ainsi, les TRPV4 sont intéressants à considérer dans un type cellulaire constamment soumis à des variations d'étirement tel que les cellules de la paroi vasculaire. Les *TRPV4 sparklets* ont été caractérisés dans les artères mésentériques de souris. Bien qu'ils soient observés au niveau de la PME (40%), on les retrouve également vers les extrémités des cellules (31%). Comparativement aux pulsars calciques, les *TRPV4 sparklets* endothéliaux présentent une très faible amplitude, soit environ $1.19 F/F_0$. Les résultats obtenus sur des CE fraîchement isolées suggèrent que l'activation de TRPV4 module l'activité des K_{Ca} résultant en une hyperpolarisation de la CE. De façon basale, ces signaux calciques semblent toutefois peu fréquents [391]. Il est possible d'augmenter leur activité en utilisant des agonistes de TRPV4 tels que le GSK1016790A [392]. Bien que l'occurrence des *TRPV4 sparklets* semble de prime abord faible, l'étude menée par le groupe

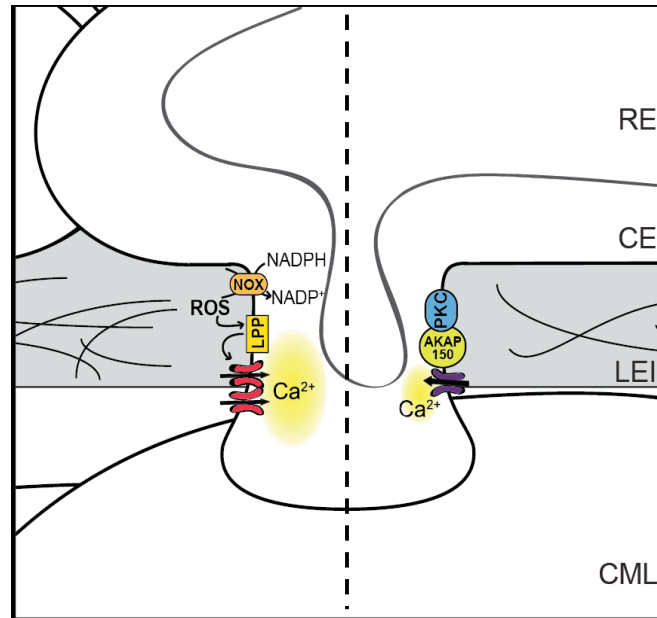


Figure 16. Schématisation simplifiée des mécanismes de régulation des *TRPA1 sparklets* et *TRPV4 sparklets* endothéliaux.

Les *TRPA1 sparklets* (gauche) résultent d'un influx de calcium (Ca^{2+}) par les canaux TRPA1 (rouge). La production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) extracellulaires par la NADPH oxydase (NOX) favorise la peroxydation de lipides membranaires (LPP). Les produits de peroxydation en découlant stimulent les TRPA1 permettant une entrée de Ca^{2+} localisée. Les *TRPV4 sparklets* (droite) résultent d'un influx de Ca^{2+} par les TRPV4 (mauve) entre autres localisées dans la projection myoendothéliale (PME). Cette entrée est stimulée par la protéine kinase C (PKC) ancrée à proximité du TRPV4 par la protéine d'ancrage AKAP150. NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate à l'état réduit, NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, CE : Cellule endothéliale, RE : Réticulum endoplasmique, LEI : Lamina élastique interne, CML : Cellule musculaire lisse

de Mark T. Nelson démontre que l'ouverture de seulement 3 canaux TRPV4 endothéliaux est suffisante pour causer une vasodilatation maximale de l'artère *via* des mécanismes dépendants des K_{Ca} suggérant une grande efficacité en termes de couplage mécanisme d'activation-effecteur [391]. Il est démontré qu'au niveau de la PME, la PKC était ancrée à proximité des canaux TRPV4 *via* une protéine d'ancrage (*i.e* AKAP150). En condition d'hypertension, ce microdomaine est perdu et la vasodilatation dépendante de TRPV4 en est affectée suggérant que cette voie de signalisation possède son importance au niveau physiologique [391, 393]. Notons qu'expérimentalement parlant, l'observation des *TRPV4 sparklets* a été essentiellement effectuée en condition de déplétion du RE par l'ajout de CPA. Considérant la faible amplitude des *TRPV4 sparklet*, il était essentiel pour visualiser ces derniers d'éliminer les signaux calciques de plus grande amplitude générés par la libération de Ca^{2+} du RE

[391]. Les *TRPV4 sparklets* ont également été rapportés dans les CML où les partenaires AKAP150-PKC semblent être conservés [394].

Les *TRPA1 sparklets* ont été caractérisés au niveau des artères cérébrales de rat [395]. Initialement, le rôle potentiel des *TRPA1 sparklets* a été mis en évidence en démontrant l'effet vasodilatateur dépendant de l'endothélium d'un agoniste de ces canaux, d'allyl isothiocyanate (AITC), sur des artères pressurisées. Des études d'immunofluorescence ont par la suite permis de localiser TRPA1 majoritairement au niveau des fenestrations de la LEI suggérant que l'effet observé découlerait de l'activation des mécanismes présents dans la PME tels que les $K_{Ca}3.1$. De ce fait, l'effet vasodilatateur induit par l'AITC ne semble pas être affecté par les inhibiteurs de NOS ou de COX, mais plutôt par les inhibiteurs des K_{Ca} [395]. Parallèlement, l'ajout d'AITC à des artères cérébrales ouvertes longitudinalement et chargées avec une sonde calcique fluorescente démontre des augmentations de Ca^{2+} restreintes (*i.e* non globales; qui ne se propagent pas) au niveau de l'endothélium. Une corrélation entre ces événements obtenus par imagerie calcique à haute vitesse et le marquage fluorescent de TRPA1 dans les fenestrations de la IEL a été soulevée [396]. Les cinétiques des *TRPA1 sparklets* ont été déterminées par microscopie par réflexion totale interne (TIRF pour *Total Internal Reflection Fluorescence microscopy*), une technique permettant d'observer spécifiquement les dynamiques présentes à la membrane plasmique [397]. Par contre, cette technique nécessite de travailler sur des cellules isolées où certaines fonctions cellulaires sont perdues par l'absence de la structure artérielle. Il est donc impossible de relier les dynamiques observées par TIRF sur des cellules isolées à des dynamiques observées sur cellules natives et plus particulièrement à la PME. Ainsi, la valeur d'amplitude des *TRPA1 sparklets* sur cellules isolées correspond à $1.13 F/F_0$, une valeur qui se rapproche des *TRPV4 sparklets*. La majorité des TRPA1 sparklets résulte d'un influx calcique couvrant une surface aussi faible que $1 \mu m^2$ [398]. Dans le but de comprendre les mécanismes pouvant moduler cette signalisation calcique locale, le groupe de Scott Earley a évalué l'implication possible des ROS [398]. Il a ainsi été suggéré que la production de ROS extracellulaire *via* l'isoforme 2 de la NADPH oxydase (NOX2) qui est colocalisée avec les TRPA1 dans les fenestrations de la LEI favorise la peroxydation des lipides membranaires. Ces produits de peroxydation tels que le 4-hydroxyhexenal (4-HNE) stimulent l'activité des TRPA1 [398, 399] ce qui engendre la

dilatation d'artères cérébrales *via* l'ouverture des canaux K_{Ca} [398]. Une étude comparative a permis d'établir la présence de TRPA1 dans l'endothélium vasculaire cérébral, mais pas au niveau de l'endothélium coronaire, mésentérique ou rénal [398]. Notons que de façon basale, l'ajout d'inhibiteur de TRPA1 n'affecte pas les dynamiques calciques endothéliales, bien qu'il abolisse l'augmentation de l'activité calcique observée par l'AITC [396]. Puisque les TRPA1 sont exprimés physiologiquement, il serait intéressant d'évaluer les conditions dans lesquelles une entrée de Ca^{2+} est observée afin de comprendre leur rôle physiologique.

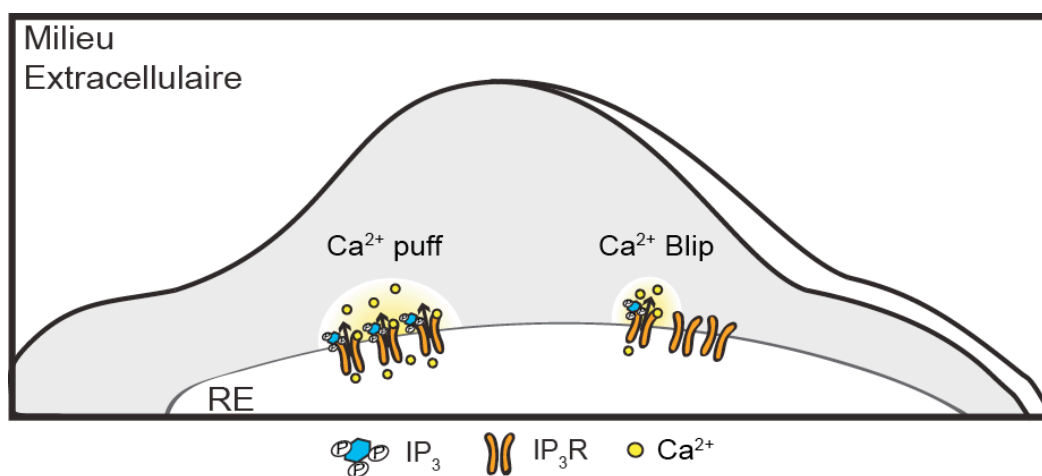


Figure 17. Schématisation simplifiée des Ca^{2+} puffs et Ca^{2+} blips endothéliaux.

Les Ca^{2+} puffs sont une libération de calcium (Ca^{2+}) par un groupe de récepteurs à l'inositol 1,4-5 triphosphate (IP_3) (IP_3R) localisé sur le réticulum endoplasmique (RE). Les Ca^{2+} blips sont caractérisés par la libération de Ca^{2+} par un ou quelques IP_3Rs .

1.3.2.2.3 Les calcium «blips» et calcium «puffs»

Plusieurs autres types de signaux calciques locaux sont rapportés dans la littérature dont les Ca^{2+} blips ou les Ca^{2+} puffs (Figure 17). Leur nom fait essentiellement référence à l'amplitude et la durée du signal calcique. Des signalisations identifiées sous les mêmes noms ont été rapportées dans plusieurs types cellulaires, principalement des cellules non excitables, suggérant qu'ils ne sont pas spécifiques aux CEs. Ces signaux dépendent de l'intensité de la stimulation ce qui engendre un recrutement des effecteurs (*i.e* nombre d' IP_3Rs activés) permettant de faire varier l'intensité du signal calcique généré [400, 401]. Les Ca^{2+} blips (ou «*elementary Ca^{2+} events*»), correspondent à l'ouverture rapide d'un seul ou d'un très petit groupe de IP_3Rs (« *IP_3Rs cluster*») et ont lieu en présence d'une faible quantité d' IP_3 [402].

Dans des CEs provenant d'artères pulmonaires de veau (CPAE pour *Calf Pulmonary Artery Endothelial Cell*), les Ca^{2+} blips ont une durée de moins de 100 ms, présentent une amplitude de 23 nM de Ca^{2+} et ont une dispersion d'environ 1-3 μ m. Les Ca^{2+} blips peuvent déclencher des vagues calciques qui correspondent à des dynamiques d'ordre global. Les Ca^{2+} puffs ont entre autres été observés au niveau de CEs natives d'artérioles irriguant l'uretère de rat [403] ou dans les CPAEs [402]. Ils sont définis par l'ouverture d'un plus grand nombre d'IP₃R à un seul site pouvant couvrir près de 30 μ m, mais sans propagation du signal à l'ensemble de la cellule [402]. Les Ca^{2+} puffs ont des amplitudes d'environ 50-100 nM et sont oscillatoires. Tout comme les Ca^{2+} blips, ils peuvent déclencher des vagues calciques [400].

En résumé, l'endothélium possède une grande diversité de signaux calciques soit en termes de localisation cellulaire, d'effecteurs, du degré d'amplitude ou de dispersion du signal ou de son déroulement temporel. Les oscillations calciques de la PME présentent un intérêt particulier considérant qu'ils ont un rôle dans la régulation du tonus vasculaire en favorisant la relaxation des CMLs. Le tonus vasculaire dépend d'une balance adéquate entre les mécanismes contractants et relaxants. Ainsi, il est intéressant de relier ces signaux oscillatoires à des protéines réagissant spécifiquement aux signaux calciques de fréquence variable.

1.4. La protéine kinase II dépendante du complexe Calcium-Calmoduline («CaMKII»)

Rapportée au début des années 1980 sous le nom de la synapsine I kinase dépendante de la CaM («*calmodulin-dependent synapsin I kinase*») [404], CaMKII a rapidement été identifiée comme étant une protéine très abondante au niveau cérébral, pouvant atteindre près de 2% de la quantité totale de protéines dans la région de l'hippocampe [405]. L'engouement face à cette kinase est lié à sa forte expression, mais également au rôle du Ca^{2+} dans la fonction neuronale tel que la libération de neurotransmetteurs [406, 407]. Une augmentation suite à un influx calcique de la phosphorylation d'une protéine spécifique aux neurones (désignée «*Protein I*») avait initié la recherche de la kinase responsable de cette réponse [408]. Les premières études sur CaMKII ont démontré que l'unité fonctionnelle était formée de plusieurs sous-unités qui lient individuellement la CaM [404]. À ce point, l'ensemble des

isoformes de CaMKII n'avait pas été identifié, bien qu'on caractérisait les différentes sous-unités sous les termes α et β [404].

Peu de temps a été nécessaire avant de faire le lien entre cette kinase dépendante du Ca^{2+} et les fonctions neuronales. Il a rapidement été suggéré que sa capacité à présenter un niveau augmenté d'activité suite à son autophosphorylation est représentative de l'activité synaptique [409]. À ce jour, il ne fait plus aucun doute que CaMKII décode les oscillations calciques en présentant un niveau d'activité variable selon la fréquence des élévations calciques. Le rôle de CaMKII n'est plus restreint aux neurones et on lui attribue maintenant un nombre impressionnant de fonctions dans une grande variété de types cellulaires.

1.4.1 Les bases de l'enzyme CaMKII

Un survole de la littérature permet rapidement de corréler les niveaux d'activité variable de CaMKII à son rôle dans un très grand nombre de fonctions cellulaires qu'elles soient de base ou spécifique. Cette singularité lui provient de sa structure et de son mécanisme d'activation qui permettent à CaMKII un ciblage précis des fonctions cellulaires en réponse à diverses stimulations cellulaires. Un grand nombre d'outils pharmacologiques ou moléculaires ont été développés afin de moduler l'expression ou l'activité de CaMKII dont certains imposent des limites qui ne peuvent être passées sous silence.

1.4.1.1 Structure et particularité des isoformes

CaMKII est exprimée sous 4 isoformes soit α , β , δ et γ qui se déclinent sous différents variants. Elles partagent la même organisation structurale monomérique qui est composée d'un domaine catalytique en N-terminal, un domaine régulateur central et un domaine d'association en C-terminal (Figure 18). C'est *via* ce dernier que CaMKII peut s'agencer en une unité fonctionnelle. L'unité fonctionnelle est constituée de 6 à 12 monomères qui sont disposés en forme d'anneau [410, 411]. La faculté de CaMKII à décoder les oscillations calciques lui provient d'une part de cette structure multimérique où chaque monomère peut avoir un niveau d'activité distinct. De plus, chaque multimère peut être formé d'un agencement de différentes isoformes comme au niveau neuronal où la forme multimérique est constituée de l'isoforme α et β [412]. Un agencement de différents variants d'une même

isoforme est également rapporté particulièrement en ce qui concerne CaMKII δ [413]. Cette capacité d'hétéromultérisation permet à l'unité fonctionnelle d'acquérir des fonctions ou aptitudes spécifiques dues à la présence d'une région variable dans le domaine régulateur [414-416]. Un des exemples le plus décrit est la présence dans CaMKII β d'un domaine de liaison à la F-actine lui permettant de s'ancrer au cytosquelette ce qui module la translocation de l'unité fonctionnelle en fonction des stimuli. CaMKII α ne présente pas cette signature, mais que son association avec CaMKII β lui permet de suivre le même patron de translocation au niveau synaptique [417, 418]. L'hétéromultimérisation permet également de générer des unités fonctionnelles avec des sensibilités différentes pour le complexe Ca²⁺/CaM. Cette diversité permet à CaMKII de répondre à une large gamme d'oscillations calciques avec des fréquences et des cinétiques variées [412, 419, 420] qui seront traduites en des réponses cellulaires variables. Une sous-unité particulière de CaMKII, α KAP, a été identifiée dans le muscle squelettique. Elle ne possède pas d'activité enzymatique et agit à titre d'ancrage aux membranes *via* sa région N-terminale. Elle permet une compartimentalisation de l'enzyme en s'assemblant avec les autres sous-unités de CaMKII [421].

1.4.1.2 Mécanismes d'activation

CaMKII est une kinase dont l'activation est modulée par le complexe Ca²⁺/CaM. La liaison de ce complexe est essentielle pour l'initiation de son activation. Cependant, CaMKII possède également une activité indépendante du Ca²⁺, ainsi qu'une régulation par le stress oxydant (Figure 18). Ceci ajoute un niveau de complexité dans ses mécanismes d'activation et de modulation élargissant la gamme de signaux intracellulaires qu'elle peut décoder.

De façon plus exhaustive, une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire est tout d'abord nécessaire pour permettre la formation du complexe Ca²⁺/CaM. Le site de liaison du complexe Ca²⁺/CaM est localisé dans le domaine régulateur de CaMKII. En absence de complexe, la portion catalytique du monomère est repliée sur le domaine régulateur, une conformation inactive caractérisée comme étant « autoinhibitrice ». La liaison du complexe engendre le dépliement du monomère ce qui relève l'autoinhibition et expose le domaine catalytique le rendant ainsi accessible à l'ATP (*i.e* le substrat permettant la phosphorylation) [422, 423]. La protéine est ainsi activée. On caractérise l'activation suite à la liaison du complexe Ca²⁺/CaM

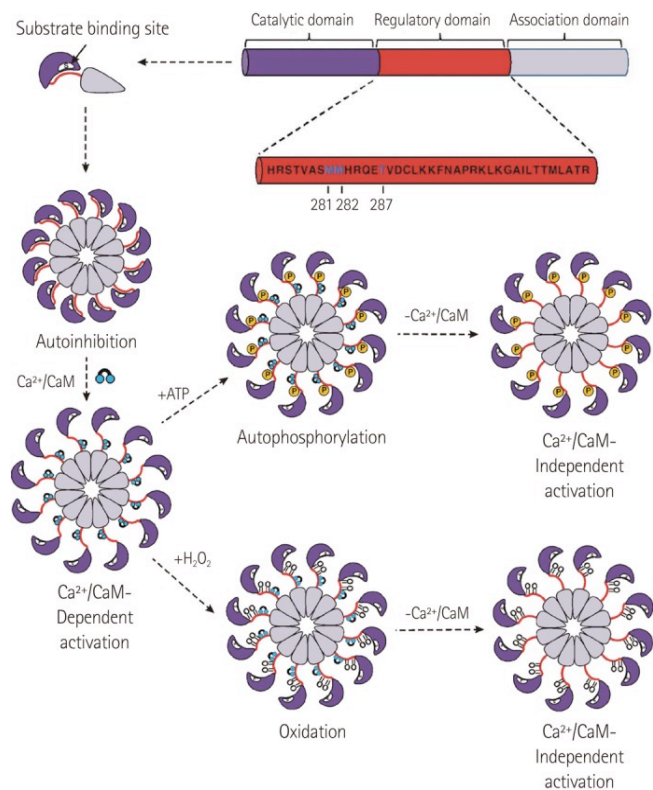


Figure 18. Structure et mécanismes d'activation de CaMKII.

La forme monomérique de la protéine kinase II dépendante du complexe calcium-calmoduline (CaMKII) possède 3 domaines (catalytique en N-terminal, régulateur central, association en C-terminal). L'unité fonctionnelle est constituée de 6 à 12 monomères. En condition d'autoinhibition, le domaine catalytique est replié sur le domaine régulateur. Une augmentation de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire permet la formation du complexe Ca^{2+} -calmoduline ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) qui une fois lié au monomère engendre son dépliement et son activation. Une autophosphorylation ou une oxydation de certains résidus permet de maintenir une activité indépendante du Ca^{2+} lors de la dissociation du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. De : [6]

comme étant l'activité Ca^{2+} -dépendante de CaMKII. De façon intéressante, CaMKII est également son propre substrat. En présence de 2 monomères adjacents liés au complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, il est possible d'observer un mécanisme d'autophosphorylation croisée à la position thréonine (Thr) 287 (Thr287; Thr 286 pour l'isoforme α , Thr286). C'est *via* ce mécanisme d'autophosphorylation que CaMKII acquiert sa réelle capacité de decodeur d'oscillations calciques. Le premier effet de cette autophosphorylation en Thr286/287 est connu sous le nom de « *CaM-trapping* » (*i.e* prendre au piège la CaM). Le *CaM-trapping* est défini par une diminution de 1 000 fois du taux de dissociation du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ permettant de prolonger l'état activé de la protéine [424]. La phosphorylation en Thr286/287 permet également le maintien de l'activité catalytique malgré la dissociation du complexe

[425, 426] ce qui correspond à l'activité Ca^{2+} -indépendante de CaMKII (désignée « *autonomous activity* »). Malgré un retour à la valeur de base du Ca^{2+} intracellulaire, la phosphorylation en Thr286/287 maintient CaMKII dans un état partiellement activé. C'est lors d'une augmentation subséquente de Ca^{2+} que ce mécanisme d'autophosphorylation procure à CaMKII son rôle de senseur calcique. Si la fréquence des oscillations calciques ne permet pas aux phosphatases de déphosphoryler les monomères de CaMKII, CaMKII peut atteindre des niveaux d'activation supérieurs lors de la deuxième augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (*i.e* un plus grand nombre de monomères sous forme active) comparativement à la première augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Figure 19) [420, 427]. CaMKII est déphosphorylée par différentes phosphatases telles que PP1, PP2A et PP2C [428, 429]. Puisque qu'un consensus dans la littérature converge vers l'appellation « Thr286 » pour désigner ce site de phosphorylation, cette appellation sera favorisée pour l'ensemble de cette thèse.

La phosphorylation en Thr286 est l'état phosphorylé le plus décrit dans la littérature, mais CaMKII peut également s'autophosphoryler en Thr306/307 (Thr305/306 pour l'isoforme α) [430]. Celle-ci requiert la liaison initiale du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ et la phosphorylation en Thr286. L'autophosphorylation en Thr286 est essentielle puisque le monomère doit être dans un état actif, mais non lié au complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ puisque les résidus Thr305/306/307 (en fonction des isoformes) sont inaccessibles en présence du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ [431]. L'autophosphorylation en Thr305/306/307 limite la liaison subséquente du complexe empêchant ainsi une réactivation du monomère. Dans la littérature, cette autophosphorylation est couramment exprimée en termes d'inhibition de la protéine [430]. Par contre, puisque cette autophosphorylation est subséquente à l'autophosphorylation du site Thr286, le monomère est dans les faits toujours actif jusqu'à déphosphorylation du site Thr286. L'enzyme n'est donc pas directement inhibée par l'autophosphorylation en Thr305/306/307 [432].

La caractérisation de la modulation de CaMKII par les stress oxydant a récemment été effectuée particulièrement par le groupe de Mark E. Anderson. L'effet des ROS sur son activité avait préalablement été rapporté suite à une stimulation par le H_2O_2 en présence de chélateurs calciques [433]. Ce mécanisme est intéressant dans le contexte vasculaire puisque cet environnement est reconnu pour être constamment soumis à des variations de stress oxydatif, particulièrement en conditions pathologiques [434]. Ce mécanisme de régulation

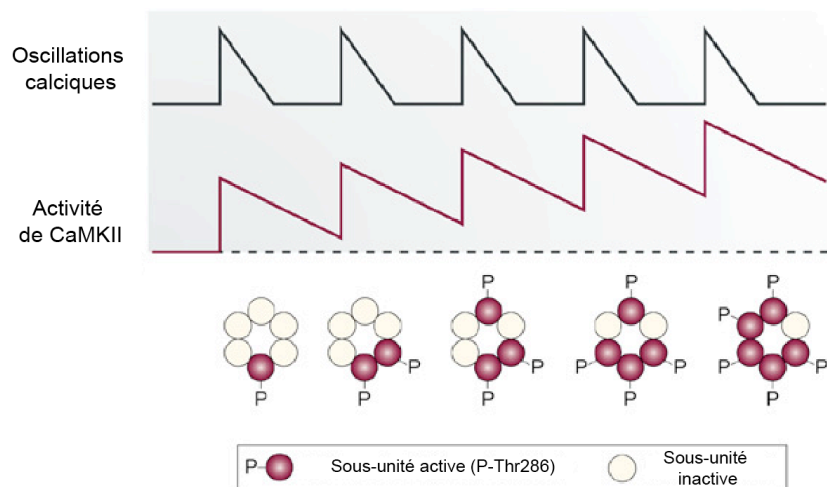


Figure 19. Niveau d'activité de CaMKII en fonction des oscillations calciques.

Une première augmentation de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire induit l'activation et l'autophosphorylation (P-Thr286) d'un certain nombre de sous-unités de la protéine kinase II dépendante du complexe calcium/calmoduline (CaMKII). Une deuxième augmentation de Ca^{2+} intracellulaire suffisamment rapprochée dans le temps permet d'obtenir un niveau d'activité supérieur de CaMKII si cette dernière n'a pas subi préalablement une déphosphorylation de ses sous-unités actives par les phosphatases. Ce mécanisme lui permet de décoder les oscillations calciques en présentant plusieurs niveaux d'activation. De : [9]

survient suite à la liaison du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ menant à l'activation de la kinase. Il a été observé que CaMKII pouvait alors être soumise à l'oxydation des méthionines (Met) en position 281 et 282 (Met281/282) localisées dans le domaine régulateur. Ce mécanisme d'oxydation est similaire à l'autophosphorylation en Thr286, *i.e* qu'il permet à CaMKII d'acquérir une activité indépendante du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ [435]. Notons que la paire de Met281/282 est conservée pour les isoformes β , δ et γ , tandis que la Met281 est substituée par une cystéine dans l'isoforme α [435]. Par contre, les cystéines sont également susceptibles d'être oxydées [436].

CaMKII est donc une kinase pouvant intégrer les signaux calciques et oxydants, deux seconds messagers ubiquitaires et impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires particulièrement au sein de l'endothélium.

1.4.1.3 CaMKII : les outils pharmacologiques et moléculaires

Plusieurs outils pharmacologiques permettent de moduler l'activité de CaMKII à des fins de recherche fondamentale. La première molécule inhibitrice a été synthétisée en 1990 par le groupe de Hiroyoshi Hidaka. Le 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-méthyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine (KN-62) cible le domaine de liaison de la CaM dans le domaine régulateur

plutôt que le domaine de liaison d'ATP tel qu'il est rapporté pour les inhibiteurs de kinases classiques [437]. Puisque cette molécule est de type compétitrice, elle n'affecte pas l'activité des monomères ayant une activité indépendante du complexe. Les monomères phosphorylés doivent être déphosphorylés avant d'être inhibés par le KN-62. Tout juste un an plus tard, ce même groupe publie une nouvelle étude avec une molécule améliorée très similaire, le N-[2-[[[3-(4'-Chlorophenyl)-2-propenyl]methylamino]methyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4'-methoxybenzenesulfonamide (KN-93). La constante d'inhibition du KN-93 est près de 3 fois plus faible que le KN-62 (0,37 μM *Vs* 0,9 μM) [438]. Il a été rapporté que cet inhibiteur affecte l'activité des canaux calciques dépendants du voltage de type-L ($\text{Ca}_v1.2$), les canaux potassiques voltage-dépendants (K_v) et le courant potassique rectifiant (I_{kr}) [439-441]. Il est donc important de considérer ces effets lors d'études effectuées sur des types cellulaires exprimant ces canaux ou courants.

En plus des molécules pharmacologiques disponibles, plusieurs outils moléculaires permettent de limiter l'activité de CaMKII. On retrouve les peptides inhibiteurs de CaMKII basés « sur le substrat » [442]. Ils sont dérivés de la région autoinhibitrice de CaMKII qui empêche l'exposition du domaine catalytique. Le principe de ces peptides inhibiteurs repose sur la compétition signifiant que CaMKII interagit avec ces peptides au lieu de ses réels substrats. On retrouve dans cette catégorie l'AC2-I (pour *Autocamtide-2 derived inhibitory peptide*), l'AC3-I (pour *Autocamtide-3 derived inhibitory peptide*) et l'AIP (pour *Autocamtide-2 related Inhibitory Peptide*) [443-446]. Il existe des souris transgéniques qui expriment ces peptides de façon cellule spécifique [447]. Plusieurs publications optent plutôt pour l'utilisation de CaMKIIN (ou d'un peptide dérivé de cette protéine [448]) qui correspond à une petite protéine inhibitrice endogène. CaMKIIN se lie au domaine catalytique de CaMKII l'empêchant d'effectuer son activité enzymatique [444, 449] et il peut être surexprimé de façon tissus-spécifique *via* des souris transgéniques ou *in vitro* par infection virale [450, 451].

1.4.2 Les fonctions de CaMKII

Au fil des années, CaMKII a été identifiée comme étant capable de phosphoryler un large éventail de cibles cellulaires d'où son appellation de protéine multifonctionnelle. En agissant comme senseur calcique, elle est un effecteur de choix en permettant d'intégrer

différents signaux intracellulaires et de fournir une réponse cellulaire adaptée. Il est possible de constater un engouement particulier pour CaMKII dans le domaine neuronal et cardiovasculaire. Ainsi, une attention particulière sera portée sur ces champs de recherche dans les prochaines sous-sections.

1.4.2.1 CaMKII et les neurones

Parmi ses nombreuses fonctions, CaMKII est reconnue pour son rôle dans le mécanisme nommé « *long-term potentiation* » (LTP), une forme de plasticité synaptique définie comme étant la capacité du système nerveux de s'adapter à des circonstances extérieures et d'emmagasiner les informations qui en découlent [452]. Cette kinase est donc essentielle dans les processus physiologiques permettant l'apprentissage et la mémoire à long terme en modulant divers aspects fonctionnels des neurones (Figure 20).

Un des premiers aspects est son rôle dans la transmission synaptique. Il a été démontré que la région terminale (ou pré-synaptique) est enrichie de CaMKII. Elle y est maintenue par son interaction avec les canaux calciques voltage dépendant 2.1 ($Ca_v2.1$). Ce complexe favorise son activation *via* le Ca^{2+} entrant par $Ca_v2.1$ ainsi que son autophosphorylation. Il est suggéré que CaMKII fait partie d'une boucle de rétroaction positive en modulant l'activité du $Ca_v2.1$ [453]. La région terminale est enrichie en synapsine 1, une protéine associée aux vésicules synaptiques et primordiale pour la relâche de neurotransmetteurs dans la fente synaptique [454]. Des études montrent que CaMKII phosphoryle la synapsine 1 ce qui engendre la libération des vésicules contenant des neurotransmetteurs de leur ancrage au cytosquelette permettant leur fusion avec la membrane pré-synaptique [455, 456].

En plus d'agir au niveau pré-synaptique, CaMKII permet l'intégration et la régulation de signaux en région post-synaptique. Cette région exprime des canaux qui sont perméables au Ca^{2+} dont l'ouverture est régulée par la liaison du glutamate relâché dans la fente synaptique. Ces canaux sont nommés en fonction des agonistes spécifiques qui modulent leur activité, soit les NMDAR pour *N-Methyl-D-aspartate acid* et les AMPAR pour *2-Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoazol-4-yl propionic acid* [457]. Il a été démontré que l'entrée de Ca^{2+} par les NMDAR active CaMKII [373] et favorise son autophosphorylation en Thr286 [458]. Il en résulte la libération de CaMKII de son ancrage au cytosquelette et sa translocation afin de

moduler l'activité des AMPAR [373, 458]. Ce mécanisme de rétroaction positive sur les AMPAR relie CaMKII aux fonctions cognitives. La phosphorylation de la sous-unité GluR1 du AMPAR par CaMKII augmente sa conduction [459, 460]. Cette phosphorylation en sérine (Ser) 831 est observée lors du mécanisme de LTP [461, 462] et une mutation de ce site de phosphorylation altère la capacité d'apprentissage de la souris [463]. La plasticité synaptique dépend du recrutement des canaux AMPAR à la surface, un processus favorisé par CaMKII qui induit la translocation de la sous-unité GluA2 du RE vers la synapse [464] et leur ancrage dans la membrane en agissant sur des protéines régulatrices telles que la stargazin [465, 466]. L'expression à la surface de AMPAR est affectée par une accumulation de β -amyloïde en condition d'Alzheimer. Cette accumulation modifie le patron de localisation de CaMKII en réduisant sa présence en région post-synaptique ce qui affecte l'expression à la surface et le

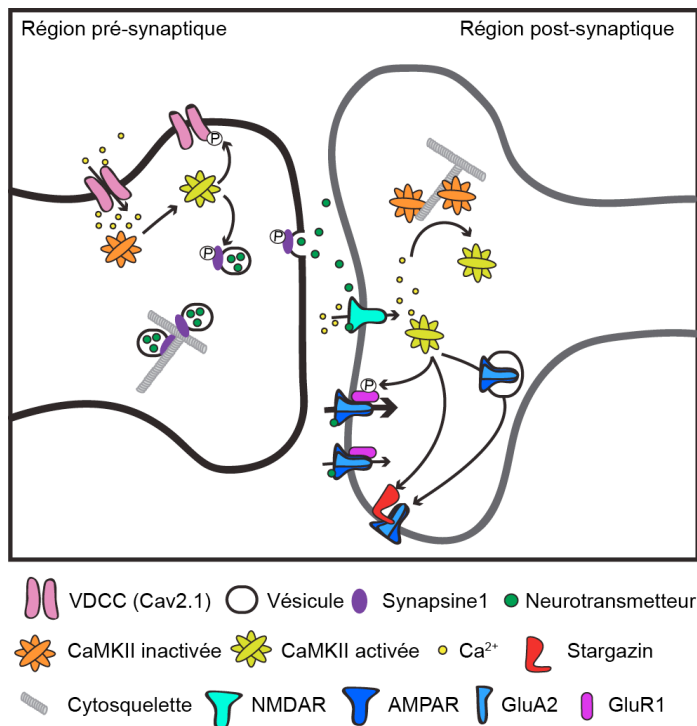


Figure 20. Schématisation simplifiée des fonctions de CaMKII dans le neurone.

L'activation de la protéine kinase II dépendante du complexe calcium/calmoduline (CaMKII) favorise la libération de neurotransmetteurs en région pré-synaptique. En région post-synaptique, l'activation de CaMKII par le calcium (Ca^{2+}) entrant par les NMDAR potentialise l'entrée d'ions par les récepteurs AMPA. Ces mécanismes sont impliqués dans les processus d'apprentissage en favorisant l'intégration des signaux permettant la mémoire à long terme. VDCC : Canaux calciques voltage-dépendants (isoforme 2.1), NMDAR: Récepteur à l'acide N-Methyl-D-aspartate, AMPAR : Récepteur à l'acide 2-Amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoazole-4-yl propaïque, GluA2 : Sous-unité de l'AMPA, GluR1 : Protéine régulatrice de l'AMPA.

fonctionnement des AMPAR [467]. Ainsi, les souris déficientes en CaMKII ou dont la capacité d'autophosphorylation en Thr286 était altérée démontrent un déficit du LTP et des troubles cognitifs [468, 469].

1.4.2.2 CaMKII et les cardiomyocytes

Une part importante du rôle de CaMKII dans la physiopathologie cardiaque passe *via* ses actions sur les acteurs impliqués dans les dynamiques calciques cardiaques (Figure 21). Une altération de la régulation de ces différents effecteurs a été mise en évidence dans plusieurs pathologies cardiaques et fait l'objet de plusieurs revues de littérature [470-473].

Le mécanisme de contraction des cardiomyocytes dépend de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire qui repose essentiellement sur le couplage fonctionnel de 2 canaux calciques [474]. Elle est initiée par un influx calcique provenant des $Ca_v1.2$ (« Ca^{2+} sparklets ») qui sont activés par la dépolarisation de la membrane. Cet influx stimule la libération de Ca^{2+} par un mécanisme de CICR avec les RyR de type 2 (RyR2; « Ca^{2+} sparks ») juxtaposés en face des $Ca_v1.2$ [388]. Cette proximité [475, 476] permet une libération rapide du Ca^{2+} du SR en réaction à un changement de potentiel membranaire perçu par les $Ca_v1.2$ [474]. La littérature rapporte que CaMKII peut influencer l'activité de ces 2 effecteurs calciques primordiaux à la contraction cardiaque.

Plusieurs études ont démontré que l'inhibition de CaMKII affecte grandement l'activité des $Ca_v1.2$ [477-479]. Cet effet provient entre autres de sa capacité à phosphoryler la sous-unité régulatrice auxiliaire β_{2a} en position Thr498 ce qui prolonge l'ouverture des $Ca_v1.2$ [480]. Une association entre CaMKII et cette sous-unité est essentielle dans le mécanisme de facilitation du courant calcique modulé par CaMKII [480, 481]. CaMKII phosphoryle également la sous-unité principale constituant le canal dans la membrane plasmique en position sérine (Ser) 1512 et Ser1570. Des mutations à ces deux positions altèrent également le mécanisme de facilitation du courant de ce canal par CaMKII tel que démontré dans un système d'expression [482] ou dans des cardiomyocytes de souris transgéniques exprimant une mutation pour ces deux sites [483]. Il est important de rappeler que l'utilisation du KN-93 dans le cadre de l'étude du rôle de CaMKII sur les $Ca_v1.2$ cardiaque doit être considérée comme une limite importante tel que mentionnée précédemment [441, 484].

Le RyR2 est également un substrat de CaMKII dont la phosphorylation stimule la libération de Ca^{2+} [485]. En effet, l'utilisation d'AIP pour inhiber CaMKII réduit l'activité des Ca^{2+} sparks qui résulte des RyRs [486]. Des études d'immunoprécipitation ont d'ailleurs

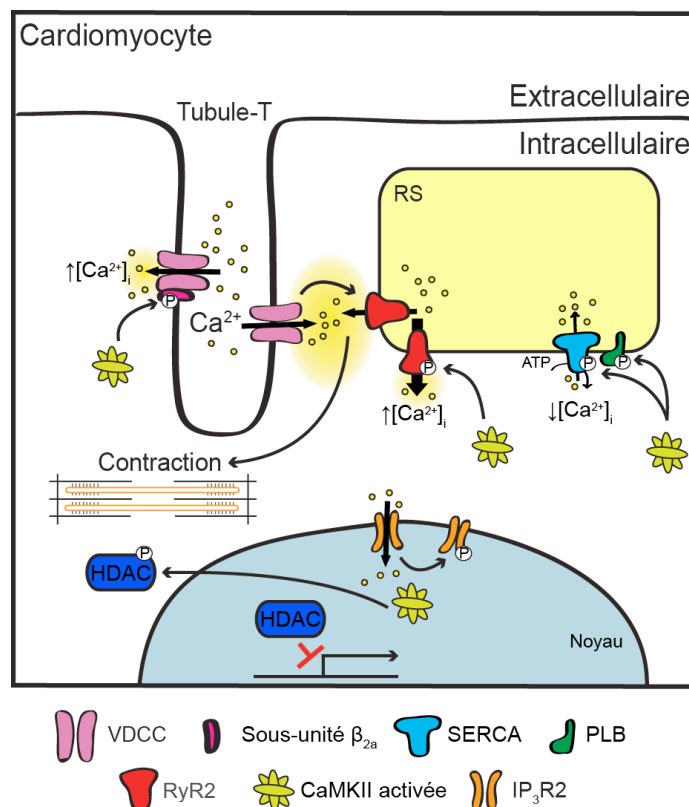


Figure 21. Schématisation simplifiée des fonctions de CaMKII dans le cardiomyocyte.

L'activation de la protéine kinase II dépendante du complexe calcium/calmoduline (CaMKII) permet d'augmenter la concentration intracellulaire en Ca^{2+} du cardiomyocyte ce qui favorise sa contraction. Inversement, CaMKII participe à la réduction de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} en augmentant l'activité de la pompe SERCA favorisant le retour du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique (RS). CaMKII contrôle la transcription des gènes en induisant l'exportation nucléaire des HDAC. Parallèlement, elle contrôle son propre niveau d'activité en phosphorylant les récepteurs à l'inositol 1,4-5 triphosphate de type 2 (IP₃R2). Ca^{2+} : Calcium, VDCC : Canaux calciques voltage-dépendants, SERCA : *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase*, PLB : Phospholamban, RyR : Récepteur à la ryanodine, ATP: Adénosine triphosphate, HDAC: Histone désacétylase

établi que CaMKII δ , l'isoforme la plus étudiée au niveau cardiaque [487], s'associe directement avec le RyR2 [486]. Les souris dont la séquence du RyR2 a été mutée de façon à mimer un récepteur constitutivement phosphorylé (S2814D, remplacement de la Ser par un aspartate) développent des problèmes cardiaques en vieillissant tels que des troubles

arythmiques [488]. Chez les patients avec une cardiomyopathie dilatée, une augmentation de la phosphorylation à ce site est observée [489]. Le rôle de ce site de phosphorylation par CaMKII dans le développement de pathologies cardiaques est renforcé par la protection qu'apporte chez les souris sa mutation de façon à éliminer la possibilité de phosphorylation (S2814A, remplacement de la Ser par une alanine) [488]. Ces résultats suggèrent que CaMKII aurait un effet amplificateur délétère sur la libération de Ca^{2+} puisqu'elle est elle-même activée par les oscillations calciques générées lors des cycles de contraction cardiaque.

Outre son rôle modulateur de l'influx ou de la libération de Ca^{2+} , CaMKII module le retour du Ca^{2+} dans le SR. La recapture du Ca^{2+} s'effectue *via* la pompe SERCA dont l'activité est contrôlée par le PLB qui exerce une fonction inhibitrice sur la pompe. Nombreuses sont les études qui ont décrit comment cette fonction inhibitrice peut être relevée par une phosphorylation en Thr17 par CaMKII [317, 490, 491]. Cette phosphorylation en Thr17 est modulée par la fréquence de stimulation des cardiomyocytes. Cette modulation fréquence-dépendante est éliminée par l'ajout d'inhibiteur de CaMKII suggérant que cette kinase favorise cette sensibilité [492]. CaMKII régulerait également SERCA *via* une phosphorylation directe de la pompe ce qui augmente la vitesse de recapture de près de 70% [493] et double son activité catalytique [494]. L'effet de CaMKII sur la recapture de Ca^{2+} permet de limiter l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire dans le temps et de favoriser un retour à l'état de relaxation du myocyte cardiaque.

En plus de réguler le cycle du Ca^{2+} cytosolique, CaMKII contrôle le Ca^{2+} nucléaire modulant ainsi l'expression génique cardiaque. L'enveloppe nucléaire exprime des $\text{IP}_3\text{R}2\text{s}$ [495, 496]. L'entrée de Ca^{2+} par ces IP_3R s dans le noyau module l'activité de CaMKII tel que démontré par une augmentation de sa phosphorylation en Thr286 suite à une stimulation des récepteurs à l'ET-1 nucléaires [497, 498]. L'activation de CaMKII favorise l'exportation nucléaire des histones désacétylases (HDAC). Cette extrusion du noyau relève la répression exercée par les HDACs sur la transcription [498, 499]. Une fois activée, il est suggéré que CaMKII agit en rétroaction sur sa voie d'activation. En effet, CaMKII diminue la P_0 des $\text{IP}_3\text{R}2\text{s}$ en phosphorylant le résidu Ser150, un acide aminé juxtaposé au domaine de liaison à l' IP_3 [495, 500]. Un alignement de séquence souligne le remplacement de la Ser150 par une Thr pour l' $\text{IP}_3\text{R}1$ et 3, un résidu qui pourrait être également phosphorylable par CaMKII [500].

1.4.2.3 CaMKII et les cellules musculaires lisses

L'intérêt de CaMKII au niveau vasculaire passe également *via* son importance au niveau des CMLs. Plus particulièrement, son rôle dans la prolifération et la migration cellulaire a largement été détaillé. Le patron d'expression de CaMKII au niveau des CMLs dépend de l'état prolifératif et donc phénotypique de ce type cellulaire. Les CMLs qui sont dans un état prolifératif expriment plus fortement l'isoforme δ comparativement aux CMLs différenciées qui expriment principalement l'isoforme γ [501]. L'activation de CaMKII est une étape essentielle pour la migration et la prolifération des CMLs. Par exemple, l'inhibition de CaMKII avec le KN-62 ou le KN-93 élimine la migration cellulaire induite par l'ajout de molécules attractantes telles que le PDGF (pour *Platelet-derived growth factor*) [502, 503]. Cette corrélation entre l'augmentation de prolifération des CMLs et l'activation de CaMKII a été transposée en condition pathologique où une augmentation de l'épaisseur de la média due à une augmentation de la proportion de CMLs était observée. Dans cette condition, une augmentation de l'expression de CaMKII δ était notée. Inversement, une réduction de la prolifération des CMLs était observée dans un modèle de souris déficientes pour cette isoforme. Ces résultats suggèrent que la présence de CaMKII favorise l'établissement de cette condition pathologique [504]. Des CMLs provenant de souris déficientes en CaMKII γ présentent une augmentation de leur capacité proliférative tandis que la surexpression de CaMKII γ réduit d'environ 40% la prolifération observée en culture cellulaire [505]. Ces résultats suggèrent que CaMKII γ agit comme un facteur inhibiteur de la prolifération comparativement à CaMKII δ qui la favorise impliquant la modulation de plusieurs voies distinctes par CaMKII. Entre autres, CaMKII est un facteur modulant la transition entre la phase G1 (état quiescent) et S (initiation et réplication de l'ADN) du cycle cellulaire (Figure 22) [506]. Cette transition requiert plusieurs facteurs tels que des régulateurs de transcription ou des protéines kinases de type Cdk (pour *Cyclin-dependent kinase*) [506, 507]. Il a été démontré que CaMKII influence l'expression de plusieurs de ces éléments régulateurs comme la Cdk2 ou la cycline E qui agissent en concert. Une déficience en CaMKII δ permet de prévenir l'augmentation d'expression de ces deux éléments observés dans un modèle pathologique induit par la ligation de la carotide [504]. Ces éléments sont régulés par p21, un répresseur de la progression du cycle cellulaire. Il s'avère qu'une augmentation de

l'expression de p21 est observée dans les souris CaMKII $\delta^{-/-}$ ayant subi la ligation [504] suggérant que CaMKII favorise une réduction de l'expression de p21 et la progression dans le cycle cellulaire. Cette modulation de l'expression de p21 par CaMKII a également été démontrée dans des fibroblastes [508] signifiant que le rôle de CaMKII dans la progression du cycle cellulaire ne serait pas exclusif aux CMLs. Comme pour les cardiomyocytes, CaMKII régule la transcription génique du muscle lisse en favorisant la phosphorylation des HDAC. Suite à une stimulation par le PDGF ou à une surexpression de CaMKII constitutivement active, une augmentation de la phosphorylation de HDAC4/5 est observée relevant ainsi l'inhibition qu'elles exercent sur la transcription génique [509]. Ainsi, le rôle de CaMKII dans les fonctions de base ne semble pas restreint à un type cellulaire et pourrait être ubiquitaire.

La migration et la prolifération nécessitent une interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire afin de favoriser leur déplacement. Il est suggéré que CaMKII influence entre autres les métalloprotéinases (MMP pour *Matrix metalloproteinase*) qui ont pour fonction la dégradation de la matrice extracellulaire. Une comparaison entre des CMLs présentant une délétion de l'expression de CaMKII δ et des CMLs contrôles démontre une diminution de la présence de MMP9 dans le milieu de culture des CMLs CaMKII $\delta^{-/-}$. Une réduction d'expression de MMP9 dans les carotides provenant de souris CaMKII $\delta^{-/-}$ est également observée [510] suggérant un rôle de CaMKII dans la régulation de l'expression de

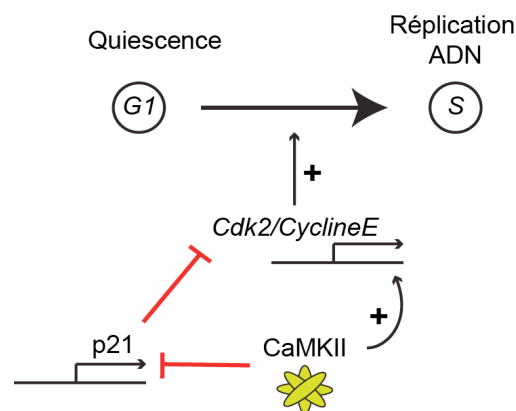


Figure 22. Rôle de CaMKII dans la progression du cycle cellulaire des cellules musculaires lisses.

La protéine kinase II dépendante du complexe calcium/calmoduline (CaMKII) diminue l'expression du répresseur du cycle cellulaire p21. CaMKII favorise l'expression de cdk2 et de la cycline E qui permettent le passage de la phase G1 à la phase S. Ces deux protéines sont contrôlées par p21. CaMKII stimule donc la progression dans le cycle cellulaire.

MMP9. Cette relation a également été soulevée au niveau du myocarde [511, 512]. Par ailleurs, l'activation des molécules d'adhésion génère des augmentations calciques transitoires qui activent CaMKII et qui favorisent la migration des CMLs [513]. L'inhibition de certaines de ces intégrines diminue de 2 fois l'activation de CaMKII perçue par une altération de l'état phosphorylé en Thr286 suite à une stimulation au PDGF [514].

Le rôle de CaMKII dans la modulation des courants ioniques semble sans équivoque (Figure 23). Tout comme pour les cardiomyocytes, CaMKII favorise l'entrée de Ca^{2+} par les $\text{Ca}_v1.2$ des CMLs. Dans des CMLs provenant de souris transgéniques qui expriment le peptide inhibiteur de CaMKII, une réduction de la phosphorylation de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta3$ est observée [515]. Conséquemment, les propriétés électrophysiologiques de la CML des souris

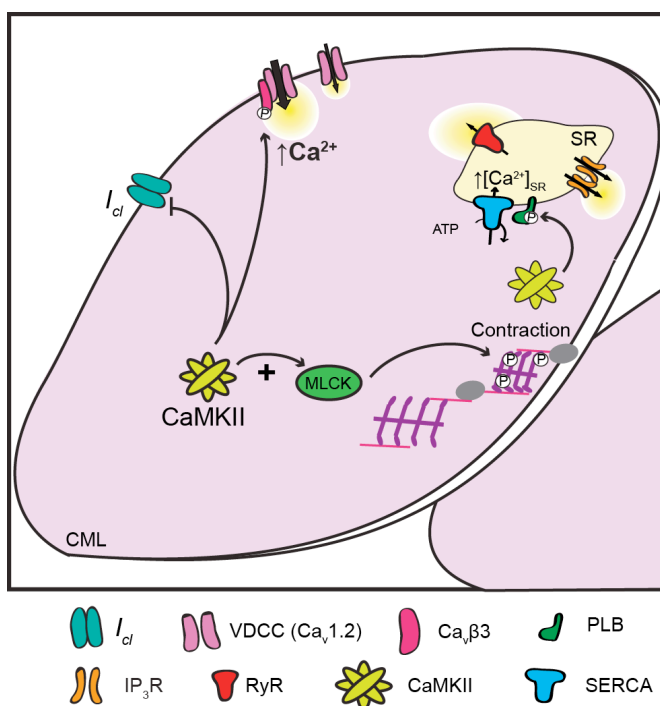


Figure 23. Voies de signalisation modulées par CaMKII et pouvant contrôler la contraction de la cellule musculaire lisse.

La protéine kinase II dépendante du complexe calcium/calmoduline (CaMKII) favorise l'activité de la MLCK ce qui augmente la phosphorylation des chaînes légères de myosine et favorise la contraction de la cellule musculaire lisse (CML). CaMKII favorise l'entrée de calcium (Ca^{2+}) par les canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) en phosphorylant la sous-unité $\text{Ca}_v\beta3$ du canal. La phosphorylation par CaMKII du phospholamban (PLB) diminue le Ca^{2+} intracellulaire en favorisant l'activité de SERCA (*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase*). CaMKII module l'équilibre ionique en réduisant le courant chlore (I_{Cl}) ce qui potentialise la dépolarisation et la contraction subséquente de la CML. MLCK : Kinase des chaînes légères de myosine, SR : Réticulum sarcoplasmique, P : Phosphate

transgéniques sont modifiées puisque l'entrée de Ca^{2+} est réduite suite à une stimulation d'ANGII comparativement aux CMLs de souris contrôles [515]. Par ailleurs, une diminution du contenu en Ca^{2+} du SR est observée dans les CMLs exprimant le peptide inhibiteur. Ces résultats sont corrélés avec une réduction de la phosphorylation du PLB suggérant une réduction de la recapture de Ca^{2+} par SERCA en présence d'une inhibition de CaMKII [512]. Il a été rapporté dans des cellules HeLa que αKAP permet d'ancrer CaMKII à proximité de la pompe SERCA. Cette proximité permet de contrôler le niveau de phosphorylation du PLB par CaMKII [516]. Cette relation pourrait également être présente dans les CML, mais cette hypothèse reste à évaluer. En plus de moduler les courants calciques, CaMKII semble contrôler les courants chlore (Cl^-) (I_{Cl}) dans les CMLs. Ce courant est fortement impliqué dans l'établissement du potentiel membranaire de cette cellule excitable [517]. L'utilisation d'AIP engendre une augmentation des I_{Cl} dépendants du Ca^{2+} telle qu'observée dans des CMLs provenant d'artères coronaires ou d'artères pulmonaires de lapin [518, 519] suggérant que CaMKII peut réduire ces courants.

L'utilisation d'agonistes qui favorisent la contraction des CMLs démontre une augmentation importante du niveau d'activité de CaMKII [520]. Il a donc été suggéré qu'une relation entre CaMKII et le mécanisme de contraction des CMLs pouvait être établie. De ce fait, CaMKII contrôle positivement l'état d'activité de la MLCK résultant en une augmentation de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine, étape essentielle à la contraction [521]. Une inhibition spécifique de CaMKII γ_2 réduit la phosphorylation de ces chaînes légères suggérant un rôle spécifiquement pour cette isoforme dans la contraction. Bien qu'il ait été démontré dans les cardiomyocytes que CaMKII peut directement phosphoryler les chaînes légères de myosine [522], ceci ne semble pas avoir été évalué au niveau des CMLs qui possèdent une organisation distincte des cardiomyocytes. Plusieurs autres études ont établi le rôle de CaMKII dans la contraction des CMLs, que ce soit au sein des mêmes ou d'autres voies de signalisation. Par contre, plusieurs d'entre elles ont été effectuées avec le KN-93 qui possède plusieurs cibles non spécifiques présentes dans la CML et qui peuvent fortement influencer ces mécanismes de contraction. Ainsi, il serait essentiel de reproduire ces études avec les nouveaux outils disponibles pour s'assurer de la validité des résultats.

1.4.3 CaMKII et l'endothélium

L'étude de la fonction endothéliale est complexe dû au fort potentiel de différenciation et de modification du patron d'expression protéique des CEs en culture. De plus, la perte de la structure qu'est la PME engendre inévitablement une modification de l'homéostasie endothéliale *via* une relocalisation des effecteurs naturellement localisés dans ce microdomaine. Ainsi, l'utilisation d'artères entières permet de conserver l'intégrité artérielle et la polarité fortement affectée par le processus de culture. Tout comme pour les autres types cellulaires, les diverses fonctions endothéliales semblent fortement requérir CaMKII.

1.4.3.1 Les isoformes exprimées dans les cellules endothéliales

De nombreux résultats discordants sont retrouvés dans la littérature concernant les isoformes de CaMKII exprimées dans l'endothélium. Puisque les premières études concernant CaMKII semblaient localiser CaMKII α et β strictement au niveau neuronal, tandis que CaMKII δ et γ étaient plutôt considérées comme étant présentes dans les autres tissus [523, 524], plusieurs études sur l'endothélium ont considéré uniquement l'étude de CaMKII δ et γ en excluant la présence potentielle des isoformes « strictement localisées au niveau cérébral ». À titre d'exemple, des études d'immunobuvardage de type Western sur différents types de CEs en culture (HUVEC, CEs artérielles bovine; BAEC, et CEs de microvaisseaux du derme humain; HDMEC) utilisant un anticorps reconnaissant toutes les isoformes de CaMKII résultaient en la présence d'une bande correspondant à un poids moléculaire d'environ 50 kDa [525]. Cette bande a été directement associée par les auteurs à CaMKII δ bien que CaMKII α possède un poids moléculaire similaire. Une autre étude examinant la présence de CaMKII dans des CEs cérébrales de rat (RBEC) par une technique d'hybridation *in situ* a ciblé CaMKII α comme isoforme exprimée. Cependant, lors de cette étude, la présence de CaMKII δ et γ n'a pas été évaluée [526]. Ainsi, plusieurs lacunes peuvent être soulevées dans la méthode d'identification telle que l'exclusion de prime abord de la possibilité de certaines isoformes. Des études au laboratoire ont permis d'effectuer une évaluation complète de l'expression et de la localisation des 4 isoformes de CaMKII dans l'endothélium natif d'artères de résistance de souris. Les résultats démontrent une expression de CaMKII α , β et δ au niveau de

l'endothélium. CaMKII α et β présentent une localisation homogène dans le cytoplasme de la cellule ainsi qu'une expression particulière au sein des fenestrations de la LEI (régions correspondant aux PMEs). CaMKII δ semble restreinte à la membrane plasmique ainsi qu'à la région périnucléaire qui pourrait correspondre à l'appareil de Golgi. La présence de CaMKII δ dans la PME n'a pas été observée [527]. L'observation d'une localisation spécifique des isoformes suggère un rôle différentiel de ces dernières dans la fonction endothéliale.

1.4.3.2 Les fonctions endothéliales régulées par CaMKII

Plusieurs études ont ciblé CaMKII comme étant un régulateur de fonctions cellulaires de bases en jouant le rôle d'intermédiaire au second messager qu'est le Ca²⁺. Il a été détaillé dans la section 1.3 que l'endothélium présente une vaste gamme de dynamiques calciques, dont des oscillations calciques. L'intérêt de CaMKII réside dans sa capacité à présenter des niveaux d'activation variés en fonctions des oscillations calciques intracellulaires. Ainsi, le lien entre CaMKII et les fonctions endothéliales a été étudié.

La perméabilité vasculaire consiste en la capacité des composés (ions, molécules, cellules immunitaires) à traverser la monocouche endothéliale afin d'atteindre la média. Une altération des mécanismes de perméabilité vasculaire peut mener à des conditions pathologiques telles que l'athérosclérose [528]. La thrombine est un agoniste largement utilisé dans le domaine vasculaire afin d'induire une augmentation de la perméabilité vasculaire [529]. L'ajout de thrombine augmente le niveau d'activité de CaMKII reflété par son état de phosphorylation en Thr286 [525] et l'inhibition ou la réduction de l'expression de CaMKII réduit la perméabilité vasculaire induite par cet agoniste [525, 530] suggérant que CaMKII favorise la perméabilité vasculaire. Cette perméabilité repose sur plusieurs mécanismes, dont l'intégrité des jonctions intercellulaires qui dépend fortement des dynamiques reliées au cytosquelette. L'utilisation d'agents pharmacologiques inhibant CaMKII a permis de démontrer qu'elle contrôle le réarrangement du cytosquelette induit par la thrombine [530-532]. La communication intercellulaire semble être un facteur primordial dans cette altération de la perméabilité induite par l'inhibition de CaMKII. D'une part, une inhibition des jonctions GAP réduit la perméabilité vasculaire [533]. D'autre part, l'expression des Cx induite par la bradykinine (BK) qui augmente également la perméabilité vasculaire est réduite lors de

l'inhibition de CaMKII [531]. Bien que cela n'ait pas été évalué dans l'endothélium, il a été démontré que CaMKII pouvait directement phosphoryler la Cx43 provenant de ventricules [534] qui constitue une des trois Cx exprimées dans l'endothélium [74]. L'ensemble de ces résultats positionne CaMKII comme régulateur de la perméabilité et de la communication endothéliale, mais l'identification des voies de signalisation spécifiques n'est pas complétée.

Le rôle des dynamiques calciques dans la fonction endothéliale est sans équivoque. Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en lumière le rôle de CaMKII dans la régulation des dynamiques calciques intracellulaires dans d'autres types cellulaires. Au niveau de l'endothélium, CaMKII joue un rôle dans le mécanisme de SOCE. Il est possible d'induire ce dernier par l'application extracellulaire d'ATP qui, *via* la liaison aux récepteurs purinergiques, induit un relargage des réserves intracellulaires en Ca^{2+} suivi d'un influx calcique [535]. Il s'avère que l'inhibition de CaMKII dans des BAECs altère les cinétiques des augmentations calciques transitoires induites par l'ATP, plus spécifiquement la deuxième phase du signal calcique associée à l'entrée de Ca^{2+} . Ceci suggère que l'établissement du SOCE requiert l'activation de CaMKII [377]. De façon surprenante, l'application de KN-93 ou d'AIP sans aucune stimulation supplémentaire engendre une libération de Ca^{2+} similaire à l'ATP ce qui suggère que CaMKII exerce une inhibition basale des protéines impliquées dans la libération de Ca^{2+} par les réserves intracellulaires. L'inhibition des IP_3 Rs par l'application de 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) affecte considérablement les augmentations calciques transitoires induites par l'ATP ou par le KN-93 suggérant que la libération de Ca^{2+} est générée par les IP_3 Rs [377, 536]. Ces résultats appuient le fait que CaMKII peut réguler négativement les IP_3 Rs endothéliaux tel qu'observé dans les myocytes cardiaques.

L'activation Ca^{2+} -dépendante de la NOS-3 a été décrite en détail précédemment. Cependant, l'activité de cette enzyme ne se résume pas à une régulation directe par le Ca^{2+} puisque plusieurs aspects de son activité peuvent être régulés des kinases comme CaMKII qui présente une activité dépendante du Ca^{2+} (Figure 24). La modulation des dynamiques calciques endothéliales par CaMKII peut constituer une régulation indirecte de la NOS-3. Une régulation indirecte peut également provenir de la régulation de sa transcription. L'augmentation de l'ARNm de NOS-3 induit par l'histamine sur des HUVECs [537] ou par le H_2O_2 [538] ou les contraintes de cisaillement [539] sur des BAECs est considérablement

affectée par l'inhibition de CaMKII suggérant un rôle de cette kinase dans l'aspect transcriptionnel de ce gène. Finalement, la modulation indirecte de NOS-3 *via* CaMKII peut être générée par l'interaction entre CaMKII et la NOS-3 qui favorise le détachement de NOS-3 de la membrane plasmique favorisant son activation [531, 540]. Pour sa part, la modulation directe par CaMKII s'effectue *via* la phosphorylation de divers sites de la NOS-3. Le site le plus décrit correspond à la Ser1177, un site phosphorylable par AKT, PKA et CaMKII, localisé dans le domaine réductase de l'enzyme [541-543]. L'application de KN-93 sur des HUVECs stimulés par la BK réduit la phosphorylation de ce site [540]. Une mutation de ce site (Ser \Rightarrow aspartate) mimant une enzyme constitutivement phosphorylée augmente considérablement l'activité de la NOS-3 comparativement à une mutation par une alanine [544]. En condition de diabète, une diminution de la phosphorylation en Ser1179 de NOS-3 (équivalent à Ser1177) est observée. Les auteurs suggèrent qu'une réduction de la phosphorylation en Thr286 de CaMKII due à une augmentation de l'activité des phosphatases est en cause. Ceci expliquerait l'atténuation de la production de NO observée dans les aortes du groupe de rats diabétiques [176]. Ces résultats suggèrent que CaMKII est un modulateur de l'activité de la NOS-3 *via* diverses voies et qu'un déséquilibre pathologique de ces dynamiques d'activation peut affecter la quantité de NO produit.

Tout comme pour les CMLs, CaMKII régule la migration et la prolifération cellulaire des CEs. Ces mécanismes sont essentiels dans le processus d'angiogenèse. L'ajout de KN-93 à une population de CEs de rétines bovines (BREC pour *Bovine Retinal Endothelial Cell*) et stimulée par du VEGF réduit fortement plusieurs aspects angiogéniques tels que la migration, la prolifération ou la formation de tubes endothéliaux [545] suggérant que ces mécanismes requièrent l'activité enzymatique de CaMKII. L'inhibition de CaMKII réduit également la migration endothéliale dans des essais de cicatrisation sur des CEs d'artères pulmonaires bovines (PAEC pour *Pulmonary Arterial Endothelial Cell*) [531]. Une augmentation de l'état phosphorylé d'AKT est également observée dans ces conditions [545]. AKT est reconnue pour être un élément central à plusieurs mécanismes permettant l'angiogenèse [546, 547]. Il s'avère que l'ajout de KN-93 aux BREC stimulées par le VEGF réduit d'approximativement 80% la phosphorylation d'AKT [545]. Ces résultats suggèrent que CaMKII régule la migration et la

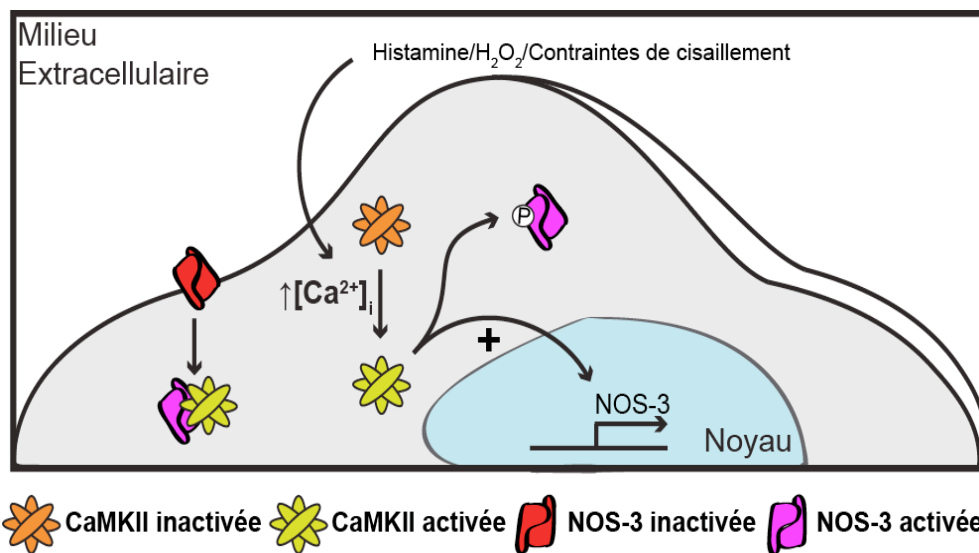


Figure 24. Régulation de la NOS-3 par CaMKII.

La protéine kinase II dépendante du complexe calcium/calmoduline (CaMKII) contrôle l'activité de l'oxyde nitrique (NO) synthase endothéliale (NOS-3) par phosphorylation directe, en contrôlant sa localisation ou en augmentant son expression. Ca^{2+} : Calcium, H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène, P : Phosphate

prolifération des CE lors de l'angiogenèse, un effet probablement médié *via* la modulation de l'état de phosphorylation d'AKT par CaMKII.

1.5. La mitochondrie

La mitochondrie est un organite spécifique aux eucaryotes aérobiques qui utilisent l' O_2 afin de produire de l'énergie, soit l'ATP. Elle constitue l'apport majeur en ATP pour la majorité des cellules, particulièrement au niveau musculaire. Cependant, il a été rapporté que dans l'endothélium, la glycolyse était la principale source d'énergie et qu'elle comptait pour environ 85% de la production d'ATP [548, 549] suggérant que la mitochondrie pourrait y avoir des fonctions accessoires à la production d'ATP. Puisque la mitochondrie joue un rôle dans la régulation des dynamiques intracellulaires en Ca^{2+} d'une multitude de types cellulaires où elle agit comme tampon calcique [550-552], elle pourrait avoir un rôle similaire au sein de l'endothélium. Le Ca^{2+} est également un élément essentiel pour la fonction mitochondriale lui permettant de répondre aux variations intracellulaires en Ca^{2+} et d'adapter sa production d'énergie aux besoins cellulaires [553-555].

1.5.1 Dynamiques mitochondriales

1.5.1.1 Structure et morphologie mitochondriale

La mitochondrie est constituée de 2 membranes (membrane interne mitochondriale, MIM; membrane externe mitochondriale, MEM). L'aspect en forme de crête de la MIM constitue un aspect morphologique distinctif rapporté pour la première fois au début des années 50 suite à l'observation par microscopie électronique de « protubérances de la surface interne de la membrane vers l'intérieur » [556]. La composition lipidique des membranes mitochondriales se distingue des autres membranes biologiques [557, 558]. Par exemple, la MIM exprime une forte proportion de phospholipides de type cardiolipine, un lipide spécialisé qui stabilise les éléments de la chaîne de transport d'électrons [559, 560]. La présence de ces 2 membranes engendre l'établissement de 2 compartiments mitochondriaux, soit l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (*i.e* l'intérieur de la mitochondrie) [558]. Le fonctionnement mitochondrial repose fortement sur la présence d'une différence de potentiel membranaire ($\Delta\psi_m$) *i.e* le gradient de charge ou électrique entre la MIM et la matrice dont la valeur moyenne se situe près de 180 mV. Ainsi, la mitochondrie est généralement considérée comme étant dans un état hyperpolarisé présentant une différence de voltage par rapport à l'espace intermembranaire [561]. L'expression différentielle des protéines au niveau des 2 membranes mitochondriales est un élément clé pour la génération de la $\Delta\psi_m$. La phosphorylation oxydative dirige principalement la valeur de la $\Delta\psi_m$, bien que tout mouvement ionique au sein des membranes participe à l'établissement de cette différence de charges particulièrement en ce qui a trait au Ca^{2+} .

Les avancements scientifiques des dernières années ont permis de mettre en lumière l'aspect dynamique des mitochondries en termes d'activité, de localisation et de morphologie [562, 563]. De façon macroscopique, il est possible d'observer un changement de l'aspect mitochondrial passant de mitochondries individuelles à un réseau mitochondrial; résultant en l'observation de mitochondries parfois stationnaires, parfois en mouvement [564, 565]. Au niveau vasculaire, des travaux du groupe de John G. McCarron ont démontré de façon élégante que ces dynamiques sont influencées par l'état prolifératif cellulaire [566]. Ils ont également démontré que des facteurs tels que l'âge influencent la motilité et l'aspect

morphologique mitochondrial suggérant une perte de la motilité mitochondriale avec le vieillissement au niveau des CMLs [567]. Les pathologies vasculaires telles que l'HA semblent influencer ces caractéristiques morphologiques. Par exemple, les CMLs d'animaux hypertendus présentent des mitochondries de plus grande taille comparativement aux animaux normo-tendus [568].

1.5.1.2 Biogenèse : fusion et fission mitochondriale

L'aspect morphologique mitochondrial est régulé par une balance entre les processus de fusion et de fission qui reposent sur une machinerie complexe.

La fusion s'effectue en plusieurs étapes nécessitant tout d'abord la fusion des MEMs qui dépend principalement de deux protéines de type GTPase nommées mitofusine 1 (Mtf1) et mitofusine 2 (Mtf2) [569]. C'est lors d'une interaction de type *trans* entre les mitofusines de mitochondries adjacentes que la fusion est initiée [569, 570]. Il a été démontré que la suppression des deux mitofusines simultanément élimine complètement la fusion mitochondriale [571], tandis qu'une surexpression résulte en des mitochondries avec un phénotype allongé [572]. La fusion des MIMs est dépendante de la protéine OPA1 ancrée dans la MIM et qui possède également une activité GTPase. Le mécanisme d'action derrière cette protéine est encore méconnu. Toutefois, une étude a permis de mettre en évidence qu'une seule des deux mitochondries en fusion doit exprimer OPA1 pour permettre la fusion des MIMs [573]. Une délétion de l'expression d'OPA1 résulte en une fragmentation du réseau mitochondrial suggérant sa nécessité dans ce processus [571].

La fission mitochondriale requiert des protéines distinctes de la fusion, dont la Drp1 (pour *D*ynamine-*r*elated *p*rotein *1*) qui est retrouvée en périphérie de la mitochondrie et dont la localisation corrèle avec les événements de fission [574]. La Drp1 s'apparente aux dynamines qui sont des GTPase permettant la fission des membranes [575]. Les dynamines s'assemblent en anneaux aux alentours des invaginations de membranes [576]. Un changement de conformation suite à l'hydrolyse du GTP induit une constriction de la membrane et sa fission [577]. Considérant la particularité de sa distribution péri-mitochondriale, il a été suggéré que la Drp1 agit de façon similaire en induisant la constriction de la membrane mitochondriale ce qui permettrait de scinder en deux la mitochondrie. Drp1 s'associe à une protéine

membranaire mitochondriale ayant récemment été définie comme étant son récepteur mitochondrial, soit le Mff (pour *Mitochondrial fission factor*). Un *Knockdown* de Mff réduit le recrutement de Drp1 à la MEM, ainsi que la fission mitochondriale [578].

1.5.1.3 Motilité mitochondriale

Les mitochondries sont sujettes à des modifications de leur localisation et l'arrêt de leur motilité corrèle avec les augmentations de Ca^{2+} . Il est intéressant de noter que les oscillations calciques ont un effet supérieur en termes d'arrêt à long terme de cette motilité comparativement aux augmentations de Ca^{2+} transitoire, mais non-oscillatoires [579]. Comme

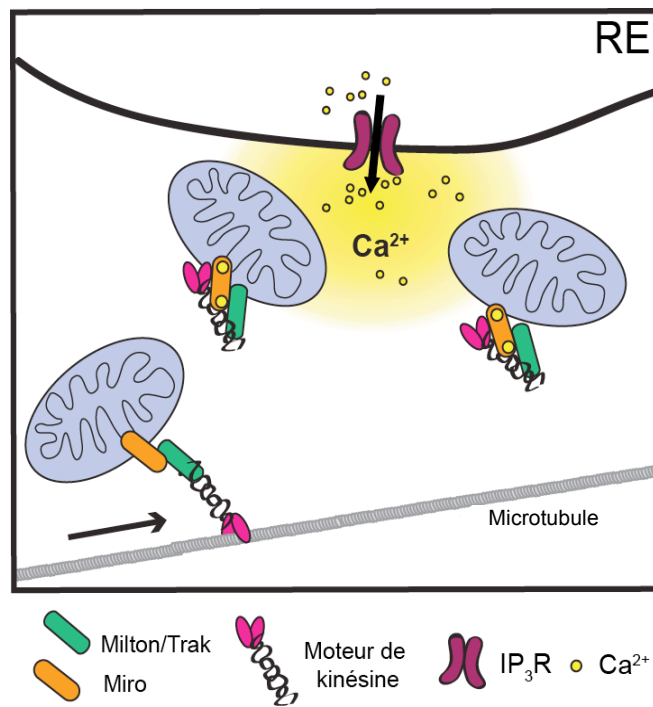


Figure 25. Schématisation simplifiée du mécanisme de motilité mitochondriale.

La mitochondrie se déplace sur les microtubules grâce aux moteurs de kinésine (KIF) reliés à la protéine miro par la protéine milton/trak. Le calcium (Ca^{2+}) lie miro induisant le relâchement du complexe mitochondrie-milton-miro-KIF du microtubule ce qui immobilise la mitochondrie. RE : Réticulum endoplasmique, IP_3R : Récepteur à l'inositol 1,4-5 triphosphate il a été rapporté précédemment, l'ensemble des fonctions cellulaires requiert le Ca^{2+} . Ceci suggère que la mitochondrie peut agir à titre de senseur des dynamiques calciques en lui permettant de s'immobiliser pour répondre à la demande métabolique induite par ces augmentations. Le processus de la motilité mitochondriale a largement été détaillé dans les

neurones (Figure 25) [580]. Elle se déplace le long du cytosquelette par l'entremise de moteurs moléculaires de kinésine (KIF) [580] dont la délétion engendre une dysfonction du transport mitochondrial perçue par un nombre accru de mitochondries au centre de la cellule [581, 582]. Le lien entre les kinésines et les mitochondries nécessite la présence de deux protéines adaptatrices, Trak1/2 [583] et Miro1/2 [584]. Miro est une Rho GTPase atypique ancrée dans la membrane mitochondriale [585]. Elle confère la dépendance au Ca^{2+} du mouvement mitochondrial par ses domaines de liaison au Ca^{2+} de type EF [586]. L'immobilisation de la mitochondrie est causée par la dissociation des kinésines des microtubules permettant une interaction avec Miro suite à la liaison du Ca^{2+} [587].

1.5.1.4 Altérations pathologiques

Des altérations de ces différents mécanismes ont été associées à des pathologies. Notamment, une altération du transport mitochondrial associée à une déficience de Miro est notée dans la pathologie de sclérose latérale amyotrophique [588]. La maladie de Charcot-Marie-Tooth est pour sa part associée à plus d'une vingtaine de mutations dans le gène de la Mtf2 [589]. Ceci met donc l'accent sur l'importance du bon fonctionnement de ces mécanismes pour le maintien d'un organisme sain.

1.5.2 La production d'ATP

La cellule possède plusieurs mécanismes de production d'énergie lui permettant d'effectuer les réactions chimiques nécessaires à son bon fonctionnement. Ces mécanismes découlent du catabolisme complexe de diverses molécules organiques (glucose, acides gras) et résultent en la libération d'ATP. La production d'ATP est initiée dans le cytosol et les réactions finales sont effectuées au niveau mitochondrial [590].

1.5.3.1 La production d'énergie cytosolique

L'étape de la production d'énergie localisée au niveau du cytosol est décrite sous le nom de la glycolyse. Ce processus permet de convertir le glucose en 2 molécules de pyruvate qui constitue le principal substrat pour les étapes subséquentes au niveau mitochondrial. La dégradation du glucose requiert l'intervention de 10 enzymes distinctes [591]. La séquence

complète de réactions enzymatiques permet la production de molécules de nicotinamide adénine dinucléotide à l'état réduit (NADH) qui constitue un co-facteur pour les étapes de production d'ATP au sein de la mitochondrie [592]. La glycolyse produit 4 molécules d'ATP, mais en utilise 2, résultant en la production nette de 2 ATP [590].

1.5.2.2 La production d'énergie mitochondriale

1.5.2.2.1 Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs constitue une suite de 9 réactions enzymatiques générant 9 métabolites intermédiaires. Ce cycle débute *via* une réaction enzymatique nécessitant l'Acétyl-Coa qui provient du pyruvate (transformé en Acétyl-CoA *via* la pyruvate deshydrogénase) ou de la β -oxydation des acides gras [593]. Plusieurs des enzymes du cycle de Krebs ont une activité dépendante du Ca^{2+} , plus précisément la pyruvate deshydrogénase, l'isocitrate deshydrogénase et la α -ketoglutarate deshydrogénase [594] signifiant que l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie est essentielle pour le bon fonctionnement de ce processus et pour ceux qui découlent des éléments formés lors ce dernier. Lors de l'oxydation de l'Acétyl-CoA, le transfert d'électrons aux transporteurs d'électrons soit la nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD^+) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) permet la génération des co-facteurs NADH et la flavine adénine dinucléotide à l'état réduit (FADH_2) essentiels à la phosphorylation oxydative ayant lieu subséquentement au niveau de la MIM. Un tour de cycle avec une molécule de pyruvate permet la production d'une seule 1 molécule d'ATP [590].

1.5.2.2.2 La phosphorylation oxydative

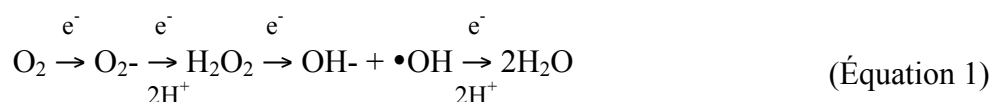
La phosphorylation oxydative (ou chaîne de transport des électrons) présente le plus grand rendement des diverses étapes incluses dans la dégradation complète d'une molécule de glucose avec une production de 28 molécules d'ATP produites [595]. Elle est localisée dans la MIM et est formée de 5 complexes (numérotés de I à V). À ces 5 complexes s'ajoutent des protéines accessoires de transport d'électrons, soit l'ubiquitone permettant le transfert d'électrons entre le complexe I/II et III, et le cytochrome C permettant le transfert entre le complexe III et IV [596]. La production d'ATP repose sur une série de réactions de réduction des co-facteurs (NADH et FADH_2) résultant en une réaction finale de réduction au complexe IV impliquant l' O_2 afin de former deux molécules d'eau (H_2O). Ces réactions engendrent la

production d'hydrogènes (H^+ ; proton) qui seront simultanément transloqués dans l'espace intermembranaire *via* les complexes I, III et IV [596, 597]. Ce phénomène résulte en un fort gradient électrique ($\Delta\psi$) et chimique d' H^+ (ΔpH) entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale [598]. Ce gradient est utilisé comme force motrice par l'ATP synthase (Complex V) afin de produire l'ATP dans la matrice mitochondriale [599, 600]. Notons que toute manipulation expérimentale altérant le gradient d' H^+ peut favoriser l'inversion de l'ATP synthase. L'application d'un inhibiteur de l'ATP synthase (*i.e* oligomycine [601]) en combinaison avec les protonophores (ou découpleur) permet de contrer cet effet.

En plus de permettre la production d'ATP et l'établissement de la $\Delta\psi_m$ en créant un gradient d' H^+ , la phosphorylation oxydative régénère les transporteurs d'électrons (NAD^+ , FAD). Notons qu'un dysfonctionnement de ce processus engendrant une fuite d'électrons dans la matrice est associé à la production de ROS [602]. Finalement, l'ATP mitochondriale parvient au cytosol par une translocase localisée dans la MIM qui permet l'échange de l'ATP mitochondrial contre l'ADP cytosolique (*Adenine Nucleotide Translocase*; ANT) [603, 604].

1.5.3 Les espèces réactives d'oxygène («ROS»)

Les ROS sont produits de façon extracellulaire ou cytosolique, bien qu'au niveau physiologique, ils sont essentiellement de source mitochondriale [605]. On qualifie de stress oxydant une condition où la production de ROS dépasse la capacité du système biologique à éliminer ceux-ci *via* ses systèmes de « défense ». Un dérèglement de la balance pro-oxydante et anti-oxydante endothéliale a été proposé comme étant un élément important dans l'instauration de la dysfonction endothéliale telle qu'observée en HA [160]. Les ROS



résultent essentiellement de la réaction de réduction de l' O_2 en H_2O , une réaction qui présente plusieurs éléments réactifs intermédiaires (équation 1). Ces éléments intermédiaires peuvent réagir entre eux ou avec d'autres composantes cellulaires hautement réactives (*Ex.* le NO) afin de générer une multitude de types de ROS dont le peroxy-nitrite ($ONOO^-$) [606, 607].

1.5.3.1 La production de ROS mitochondriales

La principale source de ROS mitochondriales provient des protéines incluses dans la chaîne de transport des électrons. Initialement rapporté comme produisant du H₂O₂, il a été démontré en 1974 que l'O₂•⁻ mitochondrial était le précurseur du H₂O₂, réaction catalysée par la superoxyde dismutase présente dans l'organite [608]. Les ROS mitochondriaux sont essentiellement générés au sein des réactions du complexe I et III de la chaîne tel que démontré sur des complexes isolés [609] ou sur des mitochondries isolées [610]. Plusieurs facteurs qui débalencent le fragile équilibre mitochondrial peuvent engendrer la production de ROS comme la présence d'un ratio élevé de NADH/NAD⁺ [611]. L'inhibition du complexe I par la roténone ou du complexe III par l'antimycine A est communément utilisée afin d'augmenter la production d'O₂•⁻ et d'H₂O₂ par la mitochondrie [610].

1.5.3.2 Les ROS mitochondriaux dans la fonction endothéliale

L'endothélium est un type cellulaire soumis à un fort taux de stress oxydants. Cependant, bien que la littérature fasse largement état du rôle et des mécanismes de production de ROS endothéliales par les NOX ou la NOS-3, un nombre plus restreint d'informations est disponible sur celui résultant d'une production de ROS par la mitochondrie. Plusieurs études ont tenté d'évaluer le rôle de ces ROS dans les fonctions vasculaires [612]. À titre d'exemple, l'utilisation d'antioxydants spécifiquement dirigés contre les ROS mitochondriaux a permis de mettre en lumière leur rôle dans l'endothélium par la démonstration d'une amélioration de la fonction endothéliale (*i.e* de la production de NO) et de la PA chez des rats hypertendus suite à ce traitement [613]. Compte tenu de l'importante interrelation entre les voies de signalisation endothéliale et musculaire au niveau vasculaire, ce type d'étude comporte d'importantes limitations ne permettant pas de conclure que l'effet observé est la résultante des ROS mitochondriales endothéliales. Des études sur des cultures cellulaires ont tout de même permis de cibler certaines conditions où une production de ROS mitochondriales est observée. Parmi ces dernières, il a été démontré que l'hyperglycémie favorise la production de ROS endothéliales de source mitochondriale, et que ces derniers sont associés aux dommages induits par cette condition telle qu'observée en diabète [614]. Ces

résultats suggèrent que la production de ROS mitochondriales est un élément intéressant à évaluer dans le cadre de dysfonction vasculaire associée à une dysfonction endothéliale.

1.5.4 La mitochondrie et les dynamiques calciques

L'interrelation mitochondrie/ Ca^{2+} ne se limite pas à son rôle dans le métabolisme énergétique et elle a été mise en évidence dans d'autres contextes au niveau de différents types de cellules musculaires [615-617], des neurones [618, 619], des hépatocytes [620, 621] ou des cellules pancréatiques [622]. Ces études suggèrent que la mitochondrie réagit aux variations cytosoliques en Ca^{2+} et que les élévations de Ca^{2+} mitochondriales sont synchronisées avec celles du cytosol. Il est fortement suggéré que cet organite fait partie intégrante de microdomaine avec le RE/RS. Sa proximité avec cette source de Ca^{2+} lui permet conséquemment de répondre plus rapidement aux demandes métaboliques [623]. Finalement, sa participation dans l'établissement de l'aspect des signaux calciques fait dorénavant consensus dans le domaine des dynamiques calciques intracellulaires.

1.5.4.1 Le transport du calcium mitochondrial

1.5.4.1.1 L'entrée de Ca^{2+} mitochondrial

La force d'entrée des ions calciques dans la mitochondrie est assurée par la $\Delta\psi_m$ générée par le mouvement des ions H^+ au travers de la MIM. Elle est donc dépendante de la phosphorylation oxydative qui dirige ce gradient d' H^+ [624]. Afin d'atteindre la matrice mitochondriale, le Ca^{2+} doit franchir les deux membranes mitochondriales.

Le canal anionique voltage-dépendant mitochondrial («VDAC»)

Longtemps, la membrane externe a été considérée comme étant librement perméable aux petites molécules, une caractéristique peu commune pour une membrane. Cependant, l'identification du VDAC (pour *Voltage-Dependent Anion Channel*) vers la fin des années 70 a permis de contredire cette propriété de la MEM [625, 626]. Chez les mammifères, VDAC est exprimé sous 3 différentes isoformes (numérotées de 1 à 3) [627]. Il présente une très grande conductance située dans la gamme des nS (simens (S) étant l'unité de mesure de la conductance) [628]. Il est peu sélectif et laisse passer des molécules de taille variable incluant

le Ca^{2+} et l'ATP [629, 630]. Cette propriété résulte en partie de la taille du pore d'un diamètre de près de 2 nm [631]. Ce canal constitue à ce jour la seule voie identifiée d'entrée du Ca^{2+} dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Il a été rapporté que le niveau de flux d'ions calciques ne corrèle pas avec l'état d'ouverture traditionnellement associé aux passages des ions. Le Ca^{2+} passe plus facilement le canal lorsqu'il se retrouve dans un état « fermé » (*i.e* dans un état où les autres molécules ne peuvent passer) comparativement à l'état ouvert [632].

Le potentiel membranaire joue un rôle dans l'état d'activité de ce canal. Cette sensibilité au potentiel membranaire a été définie sur des canaux isolés dans des fractions membranaires mitochondriales ou reconstituées dans des bicouches lipidiques dans des conditions de voltage imposé artificiellement [625, 626]. Notons toutefois que la $\Delta\psi_m$ est un phénomène associé à la MIM et non pas à la MEM où est ancré le VDAC. De plus, le haut niveau de perméabilité de la MEM ne semble pas favoriser l'établissement d'un potentiel transmembranaire. Il n'est donc pas encore établi si l'activité du VDAC est modulée par le voltage en condition physiologique ou *in situ*. L'activité du VDAC est modulée par diverses protéines, dont les protéines de la famille Bcl-2. Dans cette famille, on retrouve entre autres les protéines Bax et Bak qui favorise l'ouverture du VDAC, comparativement à Bcl-xl qui favorise sa fermeture [633]. Finalement, il est suggéré que l'activité de VDAC est influencée par la concentration cytosolique de Ca^{2+} telle qu'évaluée à l'aide de canaux reconstitués dans des liposomes chargés de sonde calcique fluorescente fura-2 [634].

En ce qui concerne le rôle précis de VDAC dans l'endothélium, très peu d'informations sont disponibles. On dénote une augmentation de son expression dans les CEs d'artères coronaires de souris diabétiques. Ceci causerait le surplus calcique mitochondrial menant à l'augmentation de l'apoptose de ce type cellulaire observée en condition diabétique [635].

Plusieurs facteurs semblent influencer l'état d'ouverture, l'activité ou la conductance de ce canal. Par contre, il est important de prendre en considération que plusieurs de ces études ont été effectuées dans des conditions expérimentales précises qui se distinguent parfois de l'environnement mitochondrial physiologique (*i.e* 2 membranes d'une composition lipidique particulière, gradient de concentration de protons, présence basale de ROS etc..).

L'uniporteur calcique mitochondrial («mCU»)

Comparativement à la MEM, la MIM est reconnue pour son imperméabilité au Ca^{2+} . La mitochondrie se doit donc d'exprimer une protéine permettant le passage du Ca^{2+} au niveau de sa membrane interne. L'identification du mécanisme responsable de l'entrée de Ca^{2+} dans la matrice s'est déroulée sur plus des 50 dernières années. De multiples études ont montré que l'entrée de Ca^{2+} dans la matrice est effectuée *via* un macrocomplexe protéique rapporté sous le nom d'uniporteur calcique mitochondrial (mCU pour *Mitochondria Calcium Uniporter*)

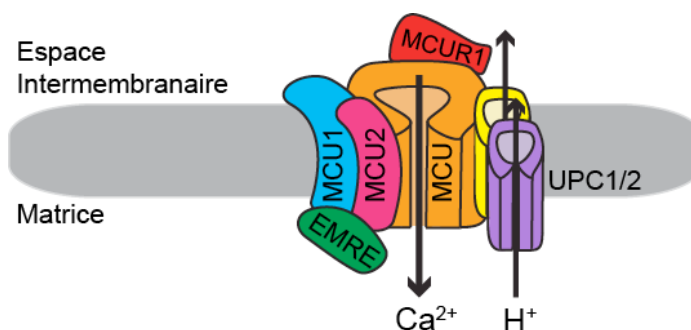


Figure 26. Schématisation simplifiée du complexe mCU.

Le pore de l'uniporteur calcique mitochondrial (mCU) est constitué de la protéine MCU. Des protéines régulatrices telles que MCU1, MCU2, EMRE et MCUR1 modulent l'entrée de calcium (Ca^{2+}) dans l'espace matriciel. Les protéines UPC1/2 font partie du complexe mCU et permettent un transport d'ions hydrogène (H^+) dans l'espace intermembranaire.

(Figure 26) [636]. La sous-unité principale qui constitue le pore et qui est composée de 2 hélices transmembranaires est nommée MCU [637]. Son activité est régulée par plusieurs sous-unités ou protéines comme la protéine MCU1 (pour *Mitochondrial Calcium Uptake 1*) qui présente un domaine transmembranaire et contient des domaines EF. Une suppression de l'expression de cette protéine par l'ajout de siRNA à une culture de cellules HeLa abolit complètement la capture du Ca^{2+} par la mitochondrie [638]. La protéine MCU2 (pour *Mitochondrial Calcium Uptake 2*) s'associe en complexe avec MCU et MCU1 et une suppression de son expression affecte également la capacité de la mitochondrie provenant d'hépatocytes de souris à recapter le Ca^{2+} [639]. Il a été démontré que l'interaction entre MCU1/2 et MCU est favorisée par une protéine accessoire du nom de EMRE (pour *Essential MCU Regulator*) [640]. MCUR1 (pour *Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1*) constitue également un élément du complexe mCU. Cette dernière interagit avec MCU, mais

ne coimmunoprécipite pas avec MCU1. L'ajout d'un ARN interférent (ARNi) contre l'ARNm codant pour MCUR1 inhibe considérablement la capture de Ca^{2+} par la mitochondrie [641]. La suppression spécifique de MCUR1 dans les cardiomyocytes génère des souris non viables, tandis qu'une suppression spécifique de MCUR1 dans l'endothélium engendre des souris viables, mais qui présentent une déficience en termes de recapture de Ca^{2+} mitochondriale [642]. Cette disparité pourrait refléter l'importance de la mitochondrie en termes de production d'énergie pour la cellule musculaire comparativement à la CE. Finalement, la littérature rapporte que les protéines transmembranaires UCP2 et UCP3 (pour *Uncoupling Protein 2/3*) présentent toutes deux la capacité de transporter les H^+ dans l'espace intermembranaire. Une surexpression de ces protéines dans une lignée de CE immortalisées (EA.hy926) qui exprime ces deux protéines de façon endogène démontre une augmentation de la capacité de la mitochondrie à capter le Ca^{2+} tandis que l'utilisation de siRNA contre ces protéines réduit ou élimine la recapture de Ca^{2+} [643]. Le passage du Ca^{2+} de part et d'autre des membranes est favorisé par une interaction entre le VDAC et le mCU. D'ailleurs, il est observé au sein des neurones que ces 2 protéines coimmunoprécipitent en complexe [644].

Comparativement au VDAC, le mCU présente une haute sélectivité pour le Ca^{2+} [645]. Son activité est fortement dépendante de la $\Delta\psi_m$ générée par la chaîne de transport d'électrons localisée dans cette même membrane, ce qui crée une force électrochimique favorable pour l'entrée du Ca^{2+} aux $\Delta\psi_m$ négatives. Ainsi, le mCU présente une P_0 de 0,93 à un potentiel de -160 mV comparativement à une P_0 de 0,11 à -80 mV [645]. La complexité du mCU peut engendrer certaines disparités dans les études qui concernent les propriétés biochimiques du complexe comme la nature de l'affinité de ce dernier pour le Ca^{2+} . D'une part, il a été rapporté que le mCU présente une très haute affinité pour le Ca^{2+} avec une constante de dissociation de < 2 nM lui permettant d'être actif à de faibles concentrations de Ca^{2+} cytoplasmique [645]. D'autre part, il a été rapporté que le mCU présente plutôt une faible affinité pour le Ca^{2+} requérant une proximité de la mitochondrie avec les microdomaines calciques où la concentration locale en Ca^{2+} atteint des niveaux supérieurs autour de 10 μM . Ceci permettrait à la mitochondrie de tamponner rapidement le Ca^{2+} tout en palliant à la faible affinité du mCU [646]. Une étude concernant la capacité de la mitochondrie à recapter le Ca^{2+} en fonction des

concentrations cytosoliques de Ca^{2+} dans des HeLa a pourtant suggéré que la mitochondrie peut malgré une faible concentration intracellulaire de Ca^{2+} accumuler du Ca^{2+} [647].

Pharmacologiquement, il est possible d'inhiber le mCU à l'aide du Ru360, une molécule dérivée du ruthinium red très spécifique qui lie le filtre de sélectivité du mCU [648]. Son activité peut également être stimulée par l'utilisation du Kaempferol [649].

1.5.4.1.2 La sortie de Ca^{2+} mitochondrial

Le pore de transition de perméabilité mitochondrial («mPTP»)

Le mPTP (pour *Mitochondrial Permeability Transition Pore*) est un pore non-sélectif et il est généralement associé à l'induction de l'apoptose. Dans certaines conditions, sa conductance pour le Ca^{2+} peut être très élevée ce qui engendre une libération de Ca^{2+} , s'ensuit l'élimination de la $\Delta\psi_m$, la rupture de la MEM et la libération de facteurs pro-apoptotiques [650]. Tout comme les autres protéines responsables du mouvement du Ca^{2+} au sein de la mitochondrie, la nature moléculaire du mPTP a été source de débat pendant un très grand nombre d'années. De nos jours, le mPTP est défini comme étant un macrocomplexe impliquant plusieurs protéines localisées au sein des deux membranes mitochondriales. Il est proposé que le pore du mPTP soit constitué de l'ANT localisée dans la MIM. L'ANT est retrouvé en complexe avec la Cyclophiline D (CyP-D) qui est localisée dans la matrice mitochondriale et dont la liaison à l'ANT favorise son ouverture. Le CyP-D est sensible à la cyclosporine A (CsA) et cette molécule constitue l'inhibiteur le plus fréquemment utilisé pour le mPTP [651], bien qu'elle inhibe également la calcineurine [652]. Le mPTP semble également associé au VDAC puisque ce dernier est retrouvé en complexe avec ANT/CyP-D [653]. Puisque le mPTP est fortement associé à des mécanismes apoptotiques, cette observation permet de relier le rôle des protéines Bcl-2 (protéines pro-apoptotiques) dans le contrôle de l'activité de VDAC tel qu'exprimé précédemment. Par contre, l'idée que le VDAC est une composante du mPTP semble remise en question puisque la suppression de VDAC ne semble pas affecter la mort cellulaire associée à l'activité du mPTP [654]. Il est également possible que d'autres partenaires modulent l'activité du mPTP tels que le transporteur de Pi qui interagit également avec la CyP-D [655].

Bien que la libération de Ca^{2+} par le mPTP soit généralement associée à un surplus de Ca^{2+} mitochondrial (« *Ca²⁺ overload* ») tel qu'observé en condition d'ischémie-reperfusion lors d'infarctus du myocarde [656, 657], il est également possible d'observer une libération de Ca^{2+} *via* le mPTP en condition physiologique. Il a été démontré que le mPTP peut s'ouvrir de façon transitoire avec un niveau de conductance inférieur à celui observé en conditions pathologiques ou de stress permettant un l'efflux de Ca^{2+} sans dommages cellulaires [658]. Ce mécanisme est dépendant de la concentration de H^+ dans la matrice plutôt que de la concentration de Ca^{2+} . Il est rapporté que cette libération transitoire de Ca^{2+} par le mPTP permet de ralentir l'efflux de H^+ dans l'espace intermembranaire favorisé par l'entrée de charges positives subséquente à l'ouverture du mCU [659].

L'échangeur sodium-calcium mitochondrial («NCLX»)

C'est l'observation en 1974 d'une libération de Ca^{2+} induite par le Na^+ qui a mené à la découverte du NCX mitochondrial [660]. Toutefois, c'est 30 ans plus tard que le gène codant pour la protéine responsable de ce transport a été identifié [661]. Il avait été rapporté que l'efflux calcique mitochondrial stimulé par le Na^+ est également être observé lors d'une substitution du Na^+ par le lithium (Li^+) et ce à un taux de transport similaire [662]. L'identification d'un gène codant pour un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ présentant cette spécificité a permis de relier le phénomène observé au niveau de la mitochondrie à ce gène. Cette identification a permis l'utilisation des techniques de biologie moléculaire classiques afin d'altérer son expression génique et d'en évaluer les effets cellulaires. À titre d'exemple, l'utilisation de siRNA contre ce gène réduit de 75% l'efflux calcique mitochondrial lorsqu'utilisé sur des cellules HEK-293 ou CHO [662]. Malgré la découverte tardive du gène codant pour le NCLX, un inhibiteur de ce transporteur a été conçu en 1988 permettant d'en moduler son activité [663]. Cet inhibiteur du nom de CGP37157 est un outil communément utilisé bien qu'il puisse affecter des cibles secondaires comme les VDCC [664]. Tout comme les autres isoformes de NCX, le NCLX n'est pas un transporteur électroneutre. Il présente un ratio de 1 Ca^{2+} pour 3 Na^+ résultant en un gain d'une charge positive à l'intérieur de la matrice mitochondriale et il peut voir son sens du transport inversé. La microscopie électronique a permis de localiser le NCLX dans la MIM [662].

Cet échangeur permet un efflux de Ca^{2+} mitochondrial en utilisant le gradient de Na^+ signifiant que le Na^+ un élément essentiel pour l'homéostasie mitochondriale. Cet aspect s'avère déterminant en cas de pathologies telles que la défaillance cardiaque qui est associée à une augmentation des niveaux intracellulaires de Na^+ [665] ce qui pourrait accélérer l'efflux calcique mitochondrial. Bien que les études soient généralement dirigées vers la conséquence de cette condition sur l'activité du NCX de la membrane plasmique, ceci pourrait également affecter la dynamique du NCLX mitochondrial. Le rôle du NCLX a tout de même été étudié au niveau cardiaque indépendamment de l'impact potentiel de l'augmentation intracellulaire en Na^+ observée en condition pathologique sur son activité. Une étude parue en 2017 démontre qu'une suppression inductible du NCLX au niveau des cardiomyocytes engendre la mort subite de la souris. Cette mort ferait suite à une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes favorisant un remodelage ayant pour conséquence une défaillance cardiaque. L'apoptose résulterait d'un surplus calcique mitochondrial généré par l'absence du NCLX. Ceci favorise l'ouverture du mPTP et les conséquences qui y sont associées [666].

1.5.4.2 Microdomaines : mécanismes d'ancrage de la mitochondrie au réticulum endoplasmique

L'identification d'une association des mitochondries avec la membrane du RE remonte à une publication de 1959 où les auteurs avaient noté que la mitochondrie se retrouve très fréquemment à moins de 3 nm de la membrane du RE [667]. Ainsi, il est maintenant largement décrit qu'une interaction physique entre les protéines membranaires de ces 2 organites permet cette association. Ces sites de contact sont rapportés sous le nom de MAMs (pour *Mitochondria-Associated ER membranes*) (Figure 27). Parmi les nombreuses interactions dénotées entre les deux membranes, on retrouve le IP_3R du RE relié au VDAC de la mitochondrie *via* la protéine accessoire GRP75. Cette interaction permet un couplage fonctionnel en favorisant le transfert de Ca^{2+} du RE à la mitochondrie. D'ailleurs, une suppression de GRP75 réduit considérablement la recapture par la mitochondrie du Ca^{2+} provenant des IP_3Rs [668]. Ce couplage a été étudié dans des cellules HeLa et il a été suggéré que la mitochondrie se localise préférentiellement aux régions avec une activité calcique élevée afin de moduler finement son activité en fonction des signaux calciques intracellulaires

[646]. L'importance de la proximité RE-mitochondrie a été soulevée dans le cadre d'études sur l'activité du mCU. Il est fréquemment rapporté que le mCU possède une très faible affinité pour le Ca^{2+} . Ainsi, il est suggéré que la concentration de Ca^{2+} à proximité du mCU doit être élevée pour expliquer la recapture rapide du Ca^{2+} par la mitochondrie. La libération du Ca^{2+} du RE dans un espace restreint entre la RE et la mitochondrie génère une concentration locale élevée de Ca^{2+} palliant ainsi à la problématique de la faible affinité pour le Ca^{2+} du mCU [669]. Outre l'ancrage *via* le complexe $\text{IP}_3\text{R}/\text{GRP75}/\text{VDAC}$, la mitochondrie est ancrée à la membrane du RE *via* Mf2 généralement associée à la fusion mitochondriale. Il a été observé que la Mf2 est enrichie aux zones de contacts RE-Mitochondrie, qu'elle est également localisée dans la membrane du RE et qu'elle est importante pour le transfert de Ca^{2+} entre les 2 organites [670]. Il a été décrit dans la section 1.5.1.3 que le Ca^{2+} permet de limiter la motilité mitochondriale *via* son action sur Miro. La liaison du Ca^{2+} à Miro favorise la dissociation de la mitochondrie du réseau de microtubules engendrant ainsi son immobilisation aux sites

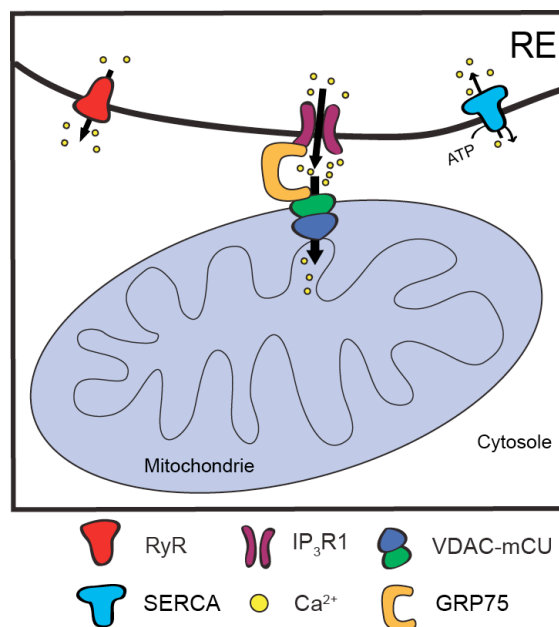


Figure 27. Schématisation simplifiée des MAMs.

L'ancrage de la mitochondrie au réticulum endoplasmique (RE) favorise le transfert de calcium (Ca^{2+}) entre les deux organites. Cet ancrage est possible grâce à la présence de la protéine accessoire GRP75 qui maintient le récepteur à inositol 1,4-5 triphosphate de type 1 ($\text{IP}_3\text{R1}$) face au VDAC (*Voltage-dependent anion channel*). Ce microdomaine est rapporté sous le nom de MAMs (*Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane*). SERCA : *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase*, RyR : Récepteur à la ryanodine, mCU : Uniporteur calcique mitochondrial, ATP : Adénosine triphosphate. Inspirée de : [7]

présentant une haute activité calcique [671]. Les auteurs de cette étude rapportent que Miro interagit avec Mf2 localisée à la membrane du RE soulevant ainsi l'hypothèse que l'ancrage de la mitochondrie au RE soit Ca^{2+} dépendante.

1.5.4.3 Mitochondries : façonner les dynamiques calciques intracellulaires

La capacité de la mitochondrie à tamponner le Ca^{2+} rapidement lui procure la capacité de moduler les composantes spatiotemporelles des signaux calciques. Elle peut ainsi compartimenter le Ca^{2+} intracellulaire en limitant sa propagation dans certaines régions de la cellule. Les cellules du pancréas sont des cellules présentant une importante polarisation et elles constituent un exemple parfait de représentation du rôle de la mitochondrie à titre de barrière calcique. La cellule pancréatique présente une haute activité vésiculaire (souvent définie en termes de granules) du côté apical tandis que le RE et le noyau est localisé du côté basolatéral. Une augmentation de Ca^{2+} du côté apical résulte en une libération du contenu vésiculaire de ce coté [672]. Un marquage à l'aide d'une sonde fluorescente dirigée contre la mitochondrie sur des cellules pancréatiques isolées permet d'apprécier la localisation des mitochondries en périphérie de la zone granulaire. De façon intéressante, une altération de la $\Delta\psi_m$ modifie drastiquement le patron de localisation des signaux calciques résultants en une transformation des oscillations calciques de la région granulaire en une augmentation globale de Ca^{2+} jusqu'au côté basolatéral [622, 673]. Dans ce type cellulaire, l'appellation de « *firewall* (pare-feu) » ou de « *belt* (ceinture) » est attribuée aux mitochondries faisant référence à leur localisation stratégique et à leur rôle de barrière (Figure 28). Les cellules épithéliales présente également un patron de distribution mitochondrial permettant de limiter les signaux calciques du côté basolatéral de la cellule. Cette limitation du signal permet de contrôler spécifiquement certaines fonctions cellulaires. Par exemple, l'utilisation de carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP; découpleur mitochondrial) engendre une activation des canaux chlorure activés par le Ca^{2+} localisés du côté apical suite à la stimulation des récepteurs purinergiques localisés du côté basolatéral, une activation qui n'est pas observée en absence de CCCP [674]. Le rôle tampon de la mitochondrie dans la régulation de fonctions cellulaires a également été mis en évidence au niveau de la fente synaptique où la

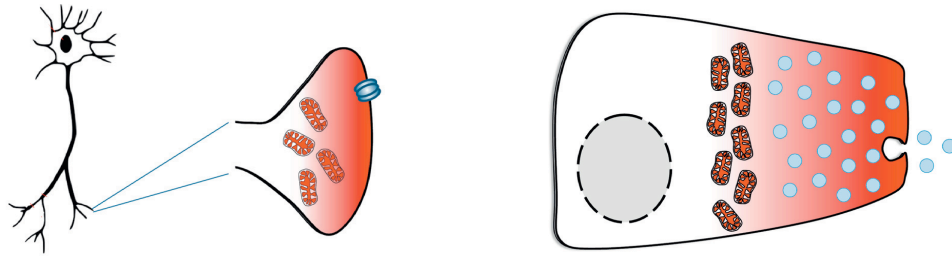


Figure 28. Schématisation simplifiée de la barrière calcique mitochondriale.

La mitochondrie permet de contenir les ions calcium dans une section de la cellule (gauche : neurone, droite : cellule pancréatique) de façon à compartimenter les niveaux de calcium intracellulaire. Modifiée de : [4]

mitochondrie semble contrôler les niveaux de Ca^{2+} modulant ainsi la plasticité synaptique. Par exemple, l'altération de la capacité de la mitochondrie à séquestrer le Ca^{2+} *via* l'utilisation de découpleurs mitochondriaux engendre, en absence de stimulation, la libération de vésicules pré-synaptiques, un processus qui est dépendant du Ca^{2+} [675].

Au niveau des cardiomyocytes, la mitochondrie influence les cinétiques des vagues calciques. L'utilisation de FCCP augmente la fréquence des vagues calciques, une condition qui peut être prévenue par la stimulation de la recapture de Ca^{2+} par la mitochondrie (*i.e* par l'utilisation du Kaempferol). Inversement, une inhibition de la recapture du Ca^{2+} (*i.e* par l'utilisation du Ru360) augmente la fréquence des vagues calciques [676]. La vitesse de ces vagues est également une composante modulée par les mitochondries. Lorsque des inhibiteurs de la chaîne de transport des électrons sont utilisés sur des astrocytes (résultant en une chute de la $\Delta\psi_m$), la vitesse des vagues calciques induites par une stimulation extracellulaire à l'ATP est augmentée signifiant que la recapture de Ca^{2+} par la mitochondrie tend à diminuer la progression de la vague au sein de la cellule [677].

La relation entre la localisation des mitochondries et les signaux calciques locaux a également été étudiée dans le modèle d'ovocyte de *Xenopus*. Les signaux calciques locaux rapportés comme étant des Ca^{2+} *puff* ont été stimulés par photolyse d' IP_3 -cagé. Suite à cette stimulation, les sites de Ca^{2+} *puff* avec une plus haute fréquence corrélaient avec les régions présentant la moins grande densité mitochondriale suggérant que la mitochondrie inhibe l'activité des Ca^{2+} *puffs* dans cette condition spécifique. Ces sites corrélaient également avec les sites d'initiation de vagues calciques suggérant que l'absence de mitochondrie permet la dispersion du signal calcique [678]. En comparaison, il a été démontré que l'utilisation de dinitrophénol comme découpleur mitochondrial réduit la fréquence des oscillations calciques observées au niveau des CMLs suggérant que la présence de mitochondries fonctionnelles

favoriserait les oscillations dans ce type cellulaire [679]. Une inhibition du NCLX réduit également la fréquence d'oscillations IP₃R-dépendantes induites par l'histamine dans des cellules HeLa. Par contre, un effet contraire a été dénoté au niveau des fibroblastes qui présentent pour leur part des oscillations calciques de façon basale. Dans ce type cellulaire, l'utilisation de CGP37157 augmente le nombre de cellules avec des oscillations calciques. De plus, les cellules qui présentaient déjà des oscillations calciques voyaient leur fréquence d'oscillations augmentée suite à l'inhibition du NCLX contrastant avec l'effet observé dans les cellules HeLa [680]. Ces différents résultats suggèrent que la régulation mitochondriale des oscillations n'est pas unidirectionnelle et qu'elle peut être influencée par une multitude de facteurs tels que l'architecture cellulaire, la localisation mitochondriale, la nature du signal calcique ou de la stimulation. Les IP₃Rs sont sensibles à l'environnement en Ca²⁺ puisqu'ils sont activés et inhibés par le Ca²⁺. Une faible variation au niveau d'un ou plusieurs facteurs énumérés précédemment pourrait donc fortement influencer les cinétiques calciques.

La régulation des signaux calciques par la mitochondrie découle également de sa capacité à recharger le RE/RS en Ca²⁺ contrôlant le niveau de Ca²⁺ disponible pour une libération subséquente. Des études ont démontré que le NCLX est un facteur important dans cette relation. Son inhibition diminue drastiquement le contenu du RE d'une lignée de EA.hy926, particulièrement suite à une stimulation *via* un agoniste tel que l'histamine [681]. La délétion du gène du NCLX dans des cardiomyocytes démontre également une altération du contenu en Ca²⁺ du SR ce qui affecte conséquemment la rythmicité de la contraction [682].

Ainsi, la mitochondrie influence différentes composantes des dynamiques calciques intracellulaires telles que la dispersion, la vitesse ou la fréquence du signal calcique ainsi que le contenu de la principale réserve intracellulaire en Ca²⁺. Elle semble donc être un élément fondamental pour l'établissement des caractéristiques spatiotemporelles des signaux calciques intracellulaires, et ce, dans une multitude de types cellulaires différents. Par contre, ceci n'a pas été évalué au sein de l'endothélium qui présente une grande diversité de signaux calciques et qui sont susceptibles d'être régulés par la mitochondrie.

2. Objectifs des études

2.1 Mise en contexte des études

L'endothélium est un élément essentiel pour le maintien de l'homéostasie vasculaire. Parmi les diverses fonctions endothéliales, son rôle dans le contrôle de l'état contractile du muscle lisse constitue un intérêt particulier et le Ca^{2+} est un élément central à de nombreux médiateurs vasoactifs d'origine endothéliale.

L'endothélium présente un grand nombre de signaux calciques ayant diverses caractéristiques spatiotemporelles. Les caractéristiques spécifiques à chacun des types de signalisations calciques sont présumées permettre une discrimination importante dans le couplage signal calcique-effet. Parmi ces signalisations calciques, les pulsars calciques sont d'un intérêt particulier puisqu'ils sont présents spontanément en conditions physiologiques et ils sont localisés dans la PME qui constitue le seul lieu de contact entre les CEs et les CMLs. D'ailleurs, l'étude des voies de signalisations présentes dans la PME, notamment celles en relation avec les pulsars calciques, nécessite de conserver la structure artérielle restreignant à l'utilisation d'un modèle expérimental d'artères *ex vivo* afin de conserver ces PME. De plus, les artères mésentériques de souris (3^e et 4^e ordre) sont des artères de résistance où l'impact de la signalisation calcique locale a été démontré. Cette préparation vasculaire sera donc utilisée pour valider l'hypothèse de cette étude. Les pulsars calciques présentent des cinétiques rapides ce qui requiert (1) l'utilisation un système de microscopie confocale avec une grande fréquence d'échantillonnage et (2) l'utilisation d'une sonde fluorescente rapide et réversible pour le Ca^{2+} , critères satisfaits par le microscope confocal à disques rotatifs (échantillonnage (≈ 15 images/seconde) utilisé avec le Fluo-4 ou GCaMP2 comme sonde calcique fluorescente.

D'importantes études ont précédemment identifié des cibles activées par oscillations calciques locales dans les PME (*Ex.* K_{Ca}). Toutefois, peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes qui modulent les cinétiques des pulsars calciques. De plus, l'aspect mécanistique de la restriction du signal calcique à la projection demeure inconnu. De ces faits, **l'objectif principal de cette thèse** était d'identifier de nouveaux mécanismes contrôlant les

pulsars calciques en condition physiologie (*i.e* sans stimulation) afin de mieux comprendre ces évènements spontanés.

2.2 Étude 1

Les pulsars calciques sont une libération oscillatoire de Ca^{2+} provenant du RE par les IP_3Rs . Les IP_3Rs sont exprimés sous 3 différentes isoformes qui présentent des caractéristiques distinctives d'activation et d'inhibition qui pourraient avoir des répercussions sur le type de signaux calciques dans lesquelles elles sont impliquées. Une distribution hétérogène des isoformes d' IP_3Rs pourrait résulter en des signaux calciques présentant une distribution subcellulaire spécifique. La caractérisation initiale des pulsars calciques ne permettait pas d'établir spécifiquement l'isoforme responsable de cette signalisation.

L'activité des IP_3Rs peut être régulée par de nombreuses protéines. CaMKII est une kinase dont les niveaux d'activités sont variables en fonction des caractéristiques des oscillations calciques et qui est couramment définie comme étant un « senseur calcique ». CaMKII contrôle la libération de Ca^{2+} par les IP_3Rs , plus spécifiquement l'isoforme de type 2, au sein des noyaux de cardiomyocytes. En diminuant la P_0 d' $\text{IP}_3\text{R}2$, CaMKII permet un contrôle négatif sur l'activité du canal. Des études du laboratoire suggèrent que CaMKII est sensible aux pulsars calciques et qu'elle est activée par cette voie de signalisation. Par contre, la relation CaMKII- IP_3R n'a pas été évaluée dans l'endothélium natif.

Conséquemment, nous suggérons que CaMKII peut à la fois agir à titre de senseur calcique et être un mécanisme régulateur des pulsars calciques suite à son activation par ceux-ci. **L'objectif principal de cette étude** est donc d'évaluer la relation entre CaMKII et les dynamiques des pulsars calciques.

2.2.1 Hypothèse

Considérant (1) l'aspect oscillatoire des pulsars calciques endothéliaux, (2) l'activation de CaMKII par les pulsars calciques ainsi que (3) le rôle modulateur de CaMKII sur les IP_3Rs dans les cardiomyocytes: **l'hypothèse principale** de cette étude est que CaMKII est un modulateur des pulsars calciques endothéliaux par sa localisation dans la PME *via* son action sur les IP_3Rs .

2.2.2 Objectifs spécifiques

Afin de valider l'hypothèse, différents **objectifs spécifiques** ont été identifiés :

- Caractériser la distribution spatiale des 3 isoformes d'IP₃Rs dans l'endothélium natif de souris et définir les isoformes présentes dans la PME.
- Établir l'impact d'une inhibition de CaMKII sur les caractéristiques des pulsars calciques.
- Déterminer les cibles/effecteurs de CaMKII au niveau du RE lui permettant de moduler la dynamique des pulsars calciques.

Pour ce faire, un modèle d'artères mésentériques de résistances de souris ouvertes et épinglées endothélium face vers le haut sur un support recouvert de silicone sera utilisé afin d'imager les CEs *in situ* :

- fixées suite à différents protocoles (immunofluorescence, hybridation *in situ* PLA) qui permettront d'évaluer dans la préparation artérielle la distribution spatiale des protéines d'intérêts par microscopie confocale classique.
- vivantes de façon à procéder à de l'imagerie calcique à haute vitesse sur un microscope confocal à disques rotatifs («*spinning disk*») lors de l'inhibition de l'activité de CaMKII par le KN-93.

2.3 Étude 2

Les pulsars calciques sont définis par une restriction d'un signal calcique dépendant des IP₃Rs à la PME d'artères de résistance. Bien que la structure de la PME permette de compartimenter des signaux comme les pulsars calciques par l'espace restreint qu'elle procure, des mécanismes sous-jacents sont nécessaires pour expliquer l'absence de la propagation du signal hors de la PME.

La mitochondrie est un élément fondamental dans la détermination de l'aspect des signaux calciques intracellulaires dans une multitude de types cellulaires. Elle peut agir à titre de barrière calcique au sein des cellules du pancréas en se positionnant côte à côte afin de limiter la propagation du Ca²⁺ dans certaines régions de la cellule. Cette capacité de

circonscire le signal calcique provient entre autres de sa capacité à tamponner rapidement le Ca^{2+} . Une altération du fonctionnement de la mitochondrie affecte les caractéristiques des cinétiques calciques intracellulaires de divers types cellulaires que ce soit en termes de fréquence, de propagation ou de vitesse de dispersion du signal calcique. De plus, le positionnement de la mitochondrie est influencé par le Ca^{2+} et son immobilisation dans la cellule est favorisée par les oscillations calciques hautement dynamique.

Conséquemment, nous suggérons que la mitochondrie pourrait être un joueur important dans la détermination des caractéristiques spécifiques des pulsars calciques dont la restriction du signal. **L'objectif principal de cette étude** est donc d'évaluer l'implication de la mitochondrie dans le contrôle spatiotemporel des pulsars calciques.

2.3.1 Hypothèse

Considérant (1) le rôle de la mitochondrie dans la modulation des dynamiques calciques intracellulaires et (2) sa capacité à compartimenter le Ca^{2+} cytosolique en fonction de sa localisation cellulaire: **l'hypothèse principale** de cette étude est que la mitochondrie est localisée à proximité de la PME de façon à contrôler les dynamiques présentes dans la PME et à circonscire le signal calcique dans cette structure.

2.3.2 Objectifs spécifiques

Afin de valider l'hypothèse, différents **objectifs spécifiques** ont été identifiés :

- Déterminer la distribution mitochondriale dans l'endothélium natif de souris et quantifier sa localisation par rapport à la PME.
- Établir l'impact d'une altération mitochondriale aigüe sur les caractéristiques des pulsars calciques.
- Évaluer le rôle des mécanismes d'entrées de Ca^{2+} et de sorties de Ca^{2+} de la mitochondrie sur les propriétés spatiotemporelles des pulsars calciques.

Pour ce faire, des coupes d'artères mésentériques de souris seront utilisées en microscopie électronique afin d'évaluer la distribution mitochondriale dans notre modèle artériel.

Le modèle d'artères mésentériques de résistances de souris ouvertes et épinglées endothélium face vers le haut mentionné pour l'étude 1 sera utilisé dans l'étude 2 de façon à procéder à de l'imagerie calcique lors de l'altération des dynamiques mitochondriales par :

- Un découpleur mitochondriale (FCCP) qui altère la $\Delta\psi_m$.
- Une molécule stimulatrice (Kaempferol) et un inhibiteur (Ru360) du mCU, unique mécanisme d'entrée de Ca^{2+} mitochondrial.
- Un inhibiteur du mPTP (CsA) et un inhibiteur du NCLX (CGP37157) de façon à inhiber indépendamment chacun des deux mécanismes de sorties de Ca^{2+} mitochondrial.

3. Articles

3.1 Article 1

Titre : CaMKII regulates intracellular Ca²⁺ dynamics in native endothelial cells.

Cet article a été accepté pour publication dans *Cell Calcium* le 6 juin 2015.

Cell Calcium, Volume 58, No. 3, septembre 2015

3.1.1 Apport original et contribution des coauteurs

Fanny Toussaint : Conception du projet, réalisation de l'ensemble des expériences, récolte des données, analyse des données, interprétation des résultats, conception des figures, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit et approbation de la version finale du manuscrit.

Chimène Charbel : Participation à la cueillette de donnée, participation à l'interprétation des résultats, révision du manuscrit et approbation de la version finale du manuscrit.

Alexandre Blanchette : Participation à la cueillette de donnée, participation à l'interprétation des résultats, révision du manuscrit et approbation de la version finale du manuscrit.

Jonathan Ledoux : Conception du projet, interprétation des résultats, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit et approbation de la version finale du manuscrit.

3.1.2 Manuscrit

Title: CaMKII regulates intracellular Ca²⁺ dynamics in native endothelial cells.

Authors: Fanny Toussaint^{1,2}, Chimène Charbel^{3,4}, Alexandre Blanchette¹ & Jonathan Ledoux^{*1,2,3,4}.

Author affiliations:¹ Research Center, Montreal Heart Institute, Montréal, Québec, Canada.

² Department of physiology, ³ pharmacology and ⁴ medicine, Université de Montréal, Québec, Canada.

*** Corresponding Author:** Email: jonathan.ledoux@umontreal.ca; Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger Street, Montréal, H1T 1C8, Québec, Canada; Phone: 1-514-376-3330 ext. 2476; Fax: 514-376-1355

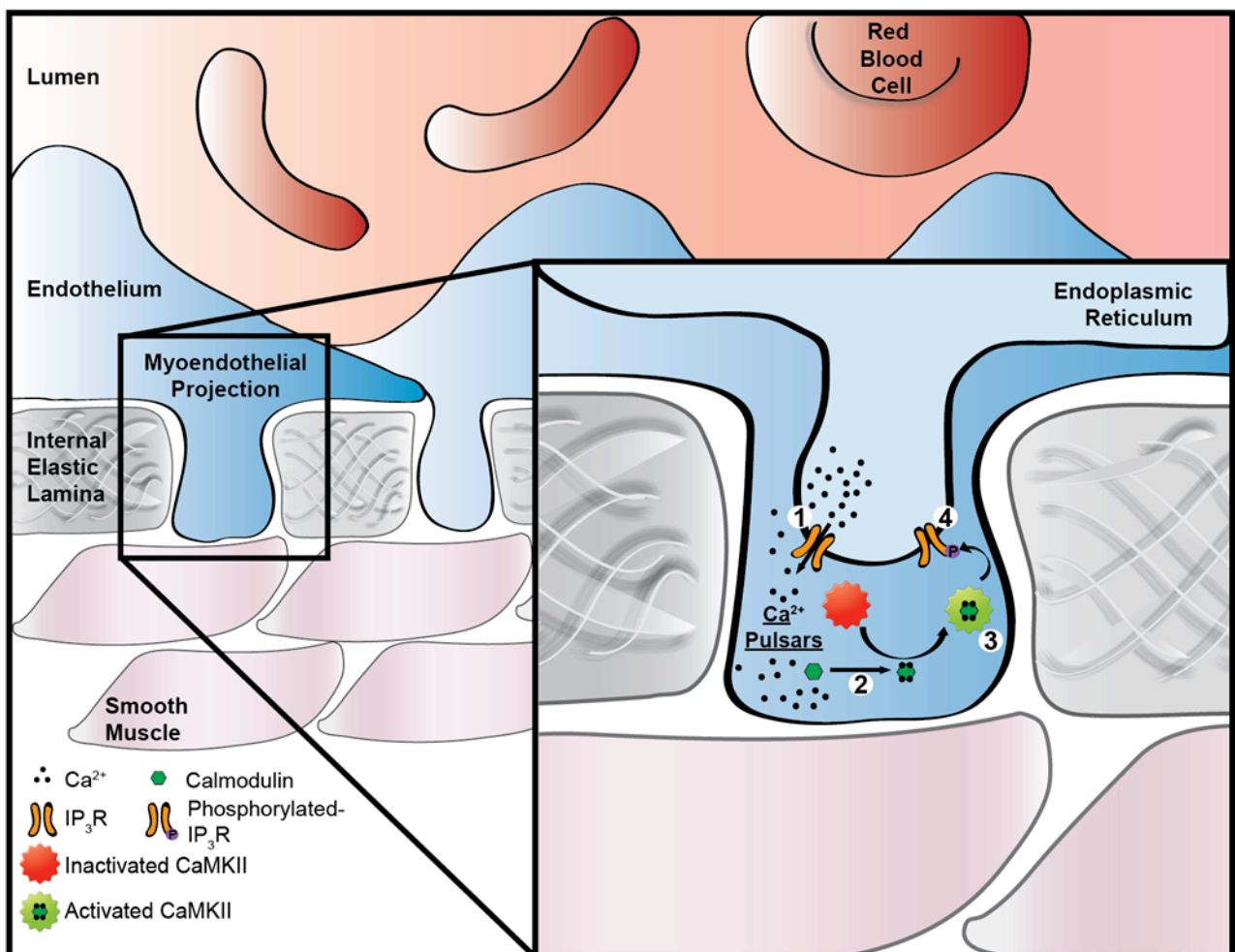
Abbreviations:

K _{ca}	Calcium-activated potassium channel
NO	Nitric oxide
NOS3	Endothelial nitric oxide synthase
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin Kinase II
ER	Endoplasmic Reticulum
KN-93	2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)] amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine)
IP ₃ R	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
MEP	Myoendothelial projection
SMC	Smooth muscle cell
EC	Endothelial cell
NFAT	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor of <u>A</u> ctivated <u>T</u> cells
Ca ²⁺ /CaM	Ca ²⁺ /calmodulin complex
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid channel
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin channel
PLB	Phospholamban
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
P ₀	Opening probability
MA	Mesenteric artery
IEL	Internal elastic lamina
ACh	Acetylcholine
ROIs	Regions of interest
PLA	Proximity ligation assay
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
SOCE	Store-Operated Ca ²⁺ Entry

HIGHLIGHTS

- CaMKII α/β heteromultimers are found in endothelial cells.
- CaMKII regulates local Ca²⁺ signalling and intracellular stores in endothelium.
- CaMKII modulates Ca²⁺ pulsars through IP₃R inhibition.
- Ca²⁺ pulsars are the result of Ca²⁺ release from IP₃R type 1 and 2.

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Localized endothelial Ca^{2+} signalling, such as Ca^{2+} pulsars, can modulate the contractile state of the underlying vascular smooth muscle cell through specific endothelial targets. In addition to $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ as a target, Ca^{2+} pulsars, an IP_3R -dependent pulsatile Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) could activate a frequency-sensitive Ca^{2+} -dependent kinase such as CaMKII. In the absence of extracellular Ca^{2+} , acetylcholine increased endothelial CaMKII phosphorylation and activation, thereby suggesting CaMKII activation independently of Ca^{2+} influx. Herein, a reciprocal relation where CaMKII controls endothelial Ca^{2+} dynamics has been investigated in mesenteric arteries. Both CaMKII α and β isoforms have been identified in endothelial cells and close proximity (<40 nm) suggests their association in heteromultimers. Intracellular Ca^{2+} monitoring with high speed confocal microscopy then showed that inhibition of CaMKII with KN-93 significantly increased the population of Ca^{2+} pulsars active sites (+89%), suggesting CaMKII as a major regulator of Ca^{2+} pulsars in native endothelium. Mechanistic insights were then sought through the elucidation of the impact of CaMKII on ER Ca^{2+} store. ER Ca^{2+} emptying was accelerated by CaMKII inhibition and ER Ca^{2+} content was assessed using ionomycin. Exposure to KN-93 strongly diminished ER Ca^{2+} content (-61%) by relieving CaMKII-dependent inhibition of IP_3 receptors (IP_3R). Moreover, *in situ* proximity ligation assay suggested CaMKII- IP_3R promiscuity, essential condition for a protein-protein interaction. Interestingly, segregation of IP_3R within myoendothelial projection (MEP) appears to be isoform-specific. Hence, only IP_3R type 1 and type 2 are detected within fenestrations of the internal elastic lamina, sites of MEP, whilst type 3 is absent from these structures. In summary, CaMKII seems to act as a Ca^{2+} -sensitive switch of a negative feedback loop regulating endothelial Ca^{2+} homeostasis, including Ca^{2+} pulsars.

Keywords: Vascular endothelium, CaMKII, Calcium, IP_3R , calcium pulsars

1. INTRODUCTION

Strategically positioned between the blood and vascular smooth muscle cells (SMCs), endothelial cells (ECs) are keepers of vascular homeostasis. Intracellular Ca^{2+} is a powerful and versatile signalling molecule, essential to numerous regulatory mechanisms of endothelial functions. For example, thrombin-induced rise in global Ca^{2+} activates Ca^{2+} -sensitive PKC, leading to increased endothelial permeability [1, 2]. Ca^{2+} is also involved in the regulation of endothelial gene transcription. ATP- or bradykinin-evoked increase in endothelial Ca^{2+} level stimulates nuclear translocation of NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), a transcription factor [3]. Fine-tuning of vascular tone is also a crucial Ca^{2+} -driven function of vascular endothelium. Indeed, generation of nitric oxide (NO), a potent vasodilator by endothelial nitric oxide synthase (NOS3) involves direct binding of Ca^{2+} /Calmodulin complex (Ca^{2+} /CaM) [4, 5]. Furthermore, intracellular Ca^{2+} has been shown to modulate endothelial membrane potential by activating Ca^{2+} -activated potassium channel ($\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ and $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$) [6, 7]. Although endothelial functions governed by Ca^{2+} have been extensively studied, endothelial Ca^{2+} homeostasis has mainly been investigated from a global cytoplasmic perspective [8-11]. Interestingly, an increasing body of evidence suggests that localized Ca^{2+} dynamics might actually be a critical player in the modulation of endothelial functions [12-14].

Tight modulation of intracellular Ca^{2+} levels from a spatiotemporal standpoint has major functional impact. Thus, localized Ca^{2+} events such as Ca^{2+} pulsars, Ca^{2+} wavelets, TRPV4- and TRPA1-sparklets have recently been characterized and are suggested to regulate vascular tone [12-16]. Early work on Ca^{2+} pulsars reported a spontaneous Ca^{2+} release from IP_3 -sensitive stores within myoendothelial projections (MEP) in mesenteric resistance arteries [15]. Similar to Ca^{2+} pulsars, Ca^{2+} wavelets have been reported in skeletal muscle arteries [16]. More recently, a spatially restricted Ca^{2+} influx through plasma membrane ion channels, TRPV4- and TRPA1-sparklets, has been reported with an elegant demonstration of the requirement of intracellular scaffolding for cellular function [12, 14, 16]. These investigations emphasize the need for a better understanding of the regulatory mechanisms of confined Ca^{2+} dynamics.

Ca²⁺ pulsar results from the spontaneous and oscillatory Ca²⁺ release through IP₃ receptors (IP₃R) in a definite subcellular region, the MEP. A critical aspect of this localized endothelial Ca²⁺ signal is its occurrence within MEPs. This anatomical structure forms a spatially restricted microenvironment allowing intimate communication between the endothelium and the underlying SMCs [17]. Ca²⁺ pulsars can indeed modulate SMCs contractile state by promoting endothelial MEP-K_{Ca}3.1 channels opening and therefore smooth muscle hyperpolarization. This signalling cascade can lead to SMCs relaxation. CaMKII, a Ca²⁺-dependent protein kinase, might represent a novel target of Ca²⁺ pulsars and extend the scope of Ca²⁺ pulsar outcomes. However, in depth characterization of Ca²⁺ events like Ca²⁺ pulsars is yet missing. For example, the mechanisms regulating the stochasticity or spatial dispersion of the events or the relative role of IP₃R subtypes remain to be determined.

CaMKII is characterized by its unique ability to decode and integrate oscillatory Ca²⁺ signals into specific outcomes [18, 19] as previously shown in neurons [20]. Interestingly, CaMKII is a key modulator of Ca²⁺ homeostasis in cardiomyocytes mainly through two pathways. First, CaMKII phosphorylates phospholamban (PLB), hence removing its inhibitory influence on SERCA2a, accelerating cytoplasmic Ca²⁺ clearance [21]. On the other hand, CaMKII phosphorylates nuclear IP₃R type 2 (IP₃R-2) resulting in a decreased channel P_o [22]. CaMKII-associated inhibition of IP₃R has also been reported in HeLa cell [23]. Although well characterized in cardiomyocytes, putative role for CaMKII in the control of Ca²⁺ dynamics in native endothelium has yet to be established. Moreover, while expression of all three IP₃R isoforms have been reported in native endothelium [15], it is unclear whether CaMKII regulation of IP₃R is restricted to IP₃R-2. Similarly, it is unknown if IP₃R modulation by CaMKII is restricted to the cardiac isoform. Although CaMKII heteromultimers have been reported in neurons, it is unknown if they are present in native ECs.

The present study was then undertaken to elucidate a CaMKII-Ca²⁺ pulsars relationship and the pathways involved. Interestingly, CaMKII modulates Ca²⁺ pulsars through management of the population of Ca²⁺ pulsar active sites. This regulation appears to occur through IP₃R inhibition interaction and accordingly, CaMKII regulates endothelial ER Ca²⁺ store. Therefore, the findings from this study strongly suggest that endothelial CaMKII is a Ca²⁺ sensor switch involved in a negative feedback loop modulating Ca²⁺ pulsars.

2. Material & Methods

2.1 Animals

Animal manipulations were approved by the Montreal Heart Institute Animal Care Committee. Mice (3-4 months old, both genders) were sacrificed by intraperitoneal injection of a lethal dose of pentobarbital (150mg/kg). Transgenic mice expressing GCaMP2 [24], a fluorescent Ca^{2+} -sensor under connexin 40 promoter, were used for Ca^{2+} pulsars experiments. C57/BL6 mice (Charles River) were used for endoplasmic reticulum Ca^{2+} content experiments, immunohistochemistry and *in situ* proximity ligation assay. Every experimental series were reproduced with tissues from a minimum of two individual mice ($N \geq 2$).

2.2 Tissue preparation.

Third- or fourth-order mesenteric arteries (MA) (diameters ≈ 60 -100 μm) were isolated from C57/BL6 mice or transgenic mice. For all type of experiments, MA were cleaned of adipose and connective tissue in cooled HEPES solution (134 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , pH 7.4), cut longitudinally, and pinned with the endothelium facing up (*en face* configuration) on Sylgard blocks. Sample size for each experiment (“n”) represents the number of individual arterial preparation.

2.3 Endothelial Ca^{2+} imaging.

Experiments were performed at $\approx 37^\circ\text{C}$ in a physiological salt solution (PSS) containing: 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 24 mM NaHCO_3 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgCl_2 , 11 mM Glucose and 1.5 mM CaCl_2 . Experiments with extracellular Ca^{2+} -free solutions were performed in PSS with 5 mM EGTA and where CaCl_2 was omitted. All solutions were oxygenated (12% O_2 , 5% CO_2) throughout the experiment.

Ca^{2+} dynamics were monitored in endothelium of MA from GCaMP2 mice (Ca^{2+} pulsars) or C57BL/6 mice loaded with Fluo-4 (endoplasmic reticulum Ca^{2+} content). For Fluo-4 experiments, MA were incubated with the dye (10 μM) and 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of pluronic acid for 45 min at 37°C . Extracellular Ca^{2+} contribution to recorded fluorescence was eliminated with the incubation of MA for 120 seconds in a Ca^{2+} -free PSS solution prior exposure to cyclopiazonic acid (30 μM ; Fig. 5) or before addition of ionomycin (10 μM ; Fig. 6).

Ca²⁺ imaging was performed with an Andor Revolution confocal system and images were acquired with Andor iQ 2.8 software (Andor Technology) using an electron-multiplying CCD camera (iXon) on an upright Nikon Eclipse FN-1 microscope. Full frame (512x512) images were acquired at ≈15 frames/sec. Ca²⁺ binding to GCaMP2 or Fluo-4 was recorded at ex/em 488/510 nm. Autofluorescence of the internal elastic lamina (IEL) was also assessed at ex/em 488/510 nm. Ca²⁺ pulsars and global Ca²⁺ were analyzed using SparkAn software (A. Bonev, UVM).

Analysis of Ca²⁺ pulsars imaging was carried out offline using regions of interest (ROIs) defined by a 5X5 pixels box manually positioned at the site corresponding to the pulsar's peak amplitude location ("Ca²⁺ pulsar sites"). "Total Ca²⁺ pulsars frequency" is defined as the number of Ca²⁺ pulsar events in a field of view per time. "Ca²⁺ pulsars frequency/active sites" is defined as the mean of individual Ca²⁺ pulsar frequencies for each active site. "Ca²⁺ pulsars active sites" is defined as the number of Ca²⁺ pulsar sites in a field of view which had a minimum of one Ca²⁺ event in the experimental condition. Substantial intervessel variability was circumvented by normalizing the values recorded in a preparation to the basal values (Control; absence of any drug) from the same preparation. Basal values were then set as 100%. Global Ca²⁺ increase was assessed by measuring the fluorescence intensity (F) relative to baseline (F_0) from ROIs defined by individual cells shape.

CPA-induced decline of Ca²⁺ pulsar dynamics were fit with a single exponential function ($Y = Y_0 \cdot \exp(-t/\tau)$) with Graphpad Prism software. Equation and values extracted from fit curves are shown in supplemental tables.

2.4 Immunohistochemistry.

Freshly harvested and cleaned MA were fixed with 4% paraformaldehyde (20 min), permeabilized with 0.2 % Triton x-100 and blocked with 4 % normal donkey serum (1h). MA were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (IP₃R-1 (Milipore Cat. 07-1213), IP₃R-2 (Milipore Cat. AB9074) and IP₃R-3 (Milipore Cat. AB9076): 1/250; CaMKII α (Abcam Cat. ab111890): 1/100; CaMKII β (Abcam Cat. ab22131): 1/300) in 0.1% Triton x-100. MA were incubated 1h with donkey anti-rabbit or anti-goat alexa 555 fluorescent antibody (1/600). Then, DAPI was applied for nuclear staining. Autofluorescence of the IEL was also recorded.

Prior fixation, arteries used to assess Ca^{2+} influx requirement to CaMKII activation were incubated in Ca^{2+} -free HEPES solution with 5 mM EGTA. Arteries were exposed to acetylcholine (ACh; 10 μM) in Ca^{2+} -free HEPES (5 min) in the absence or presence of KN-93 (10 μM). The concentration of KN-93 used was based on the literature [25-29]. Activated CaMKII was probed using an antibody raised against a phosphorylated form of CaMKII (threonin 286) (Badrilla, Cat. A010-50: 1/50).

Immunofluorescence was detected using a Zeiss LSM 510 system confocal microscope (63X oil objective/1.4, ex: 405nm, 488nm and 543nm). All images were deconvolved with Huygens professional software using experimentally determined point spread function (PSF) and reconstructed with Zen 2009 light edition.

2.5 In situ proximity ligation assay (PLA).

MA were fixed with 4% paraformaldehyde (20 min). Paraformaldehyde excess was removed with 0.1% NaBH_4 (20 min). MA were then permeabilized with 0.2 % Triton x-100 (1h) and blocked with 1% BSA/ 1% fish gelatin (10 min) at room temperature. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Reaction with probes (Anti-Rabbit MINUS Sigma Cat. DUO92005, Anti-Goat PLUS Sigma Cat. DUO92003), ligation, amplification, detection, mounting and wash buffers were done according to the manufacturer's instructions (Olink Bioscience, Sweden) using the Duolink *in Situ* PLA probes and the Duolink detection kit far red (Sigma Cat. DUO92013; Ex/Em: 644/669). Amplification was done during 60 minutes. *In situ* ligation assay was detected using a Zeiss LSM 510 system confocal microscope (63X oil objective/1.4, ex: 405 nm, 488nm and 633nm). All images were deconvolved with Huygens professional software and reconstructed with Zen 2009 light edition.

2.. Statistical analysis.

GraphPad Prism 5 software was used for statistical analysis and data are shown as mean \pm SEM. When appropriate, unpaired t-test or repeated measures ANOVA (with Bonferroni post-test) were used for statistical comparisons. A probability value < 0.05 was considered significant.

3. RESULTS

3.1 *CaMKII α and CaMKII β heteromultimer in native endothelial cells*

CaMKII is activated by Ca^{2+} increases but the endothelial Ca^{2+} sources for its activation remains to be established. Immunofluorescence experiments using an antibody raised against the phosphorylated (T286; activated form) [30] show that Ca^{2+} influx is not necessary for endothelial CaMKII activation. Indeed, removal of extracellular Ca^{2+} did not prevent CaMKII activation in the presence of acetylcholine (Fig. 1) while KN-93 (10 μM), a CaMKII inhibitor abolished the fluorescence associated to T286 phosphorylation. Distribution of both CaMKII α and β isoforms has then been assessed in freshly harvested MA from mice. CaMKII α and β are only expressed in ECs, as no staining for either isoforms was detected in the underlying vascular SMCs (Fig. 2). Although homogeneously distributed throughout ECs, CaMKII α and β clusters can also be found within IEL fenestrations (Fig. 2Ab and Bb), sites of MEP. While CaMKII might translocate to MEP upon Ca^{2+} pulsar stimulation, a fraction of the enzyme is readily positioned to modulate Ca^{2+} pulsars in resting conditions.

Mechanisms allowing translocation of CaMKII to MEP remain to be established. Neuronal CaMKII β , through F-actin binding is responsible for CaMKII α translocation to dendritic spines [31]. Such mechanism, yet to be shown in endothelium, would allow translocation of CaMKII to MEP but requires CaMKII α/β heteromultimerization. Albeit both isoforms can be found in MEP (Fig. 2), evidence for heteromultimers is still lacking. CaMKII α and β isoforms proximity was sought with *in situ* proximity ligation assay. Appropriate controls were performed to rule out non-specific fluorescence (Fig. 3B and C). Typical dot-like staining suggests CaMKII α and β promiscuity (Fig. 3A), and potential CaMKII α/β heteromultimers within ECs. Interestingly, CaMKII α/β heteromultimers are not restricted to MEP (Fig. 3Ab) but rather uniformly distributed.

3.2 *CaMKII-dependent regulation of Ca^{2+} pulsars*

CaMKII modulation of Ca^{2+} pulsars was assessed using high-speed confocal Ca^{2+} imaging of MA from GCaMP2 mice, allowing an endothelial-specific Ca^{2+} -associated fluorescence [24]. The impact of CaMKII on Ca^{2+} pulsars dynamics is evidenced in the

presence of KN-93, a CaMKII inhibitor (Fig. 4 & table 1). Every Ca²⁺ pulsar site identified throughout the experiments was manually identified (Fig. 4A). Normalized fluorescence was reported over time and in-depth analysis was performed (Fig. 4B). Acute exposure to KN-93 (10 μM) increased total Ca²⁺ pulsars frequency (127 ± 7% of control). Moreover, extended inhibition of CaMKII is associated with a further significant increase in Ca²⁺ pulsars total frequency (10 min; 172 ± 10% of control) (Fig. 4Ca). Interestingly, this KN-93-evoked increase in Ca²⁺ pulsars total frequency is independent on individual pulsar site activity (acute: 90 ± 12% of control and 10 min: 111 ± 7% of control) (Fig. 4Cb). Conversely, exposure to KN-93 resulted in a larger number of Ca²⁺ pulsars active sites both acutely (146 ± 12 % of control) and following chronic exposure to the inhibitor (189 ± 14% of control) (Fig. 4Cc). Thus, CaMKII inhibition uncovers pulsar sites that were inactive in control conditions and could explain the increase in total Ca²⁺ pulsars frequency observed in the presence of KN-93.

3.3 CaMKII regulation of reticulum Ca²⁺

Alteration of Ca²⁺ pulsars by CaMKII suggests that CaMKII can either regulate endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ release or Ca²⁺ uptake. CaMKII regulation of ER Ca²⁺ content was first examined through Ca²⁺ pulsars in GCaMP2 mice. Inhibition of SERCA pump with cyclopiazonic acid (CPA; 30μM) leads to Ca²⁺ pulsars disappearance [15]. Thus, arteries were incubated with an extracellular Ca²⁺-free solution in the absence or presence of KN-93. As expected, CPA exposure triggered a decrease in Ca²⁺ pulsar frequency (Fig. 5A). Interestingly, CPA-induced decrease in Ca²⁺ pulsar frequency was stronger in the presence of KN-93 (34.3 ± 6.2% and 9.7 ± 4.2% of control in the absence and presence of KN-93, respectively), suggesting a role for CaMKII in the control of ER Ca²⁺ stocks (Fig. 5Ab, Bb). Involvement of CaMKII in the regulation of Ca²⁺ pulsars is further evidenced by a faster CPA-induced loss of Ca²⁺ pulsar events ($t_{1/2}$ = 142.2 and 69.19 seconds in the absence and presence of KN-93, respectively) and active sites in the presence of KN-93 ($t_{1/2}$ = 160.8 and 87.6 seconds in the absence and presence of KN-93, respectively) (Fig. 5C and Suppl. Table 1 & 2).

CaMKII modulation of ER Ca²⁺ was then studied using ionomycin to release Ca²⁺ sequestered in ER in Fluo-4 loaded endothelium. In Ca²⁺-free superfusate (pre-incubation of 2

min), an increase in endothelial fluorescence would then result from the release of ER Ca^{2+} (Fig. 6A). Inhibition of CaMKII significantly decreased ionomycin-induced Ca^{2+} increase ($-39 \pm 6\%$ of control, Fig. 6Ba), suggesting that CaMKII stimulates Ca^{2+} accumulation in ER and can either stimulate ER Ca^{2+} uptake or inhibit its release as reported in cardiomyocytes [21, 22].

Identification of CaMKII target in the ER Ca^{2+} homeostasis was first probed with thapsigargin (1 μM) and cyclopiazonic acid (CPA; 30 μM), inhibitors of SERCA pump. Inhibition of the ER Ca^{2+} uptake pathways would then reveal the potential contribution of IP₃R in the CaMKII regulation of ER Ca^{2+} content. Inhibition of CaMKII decreased significantly ionomycin-induced fluorescence increase in the presence of either thapsigargin or CPA ($46 \pm 5\%$ and $24 \pm 5\%$ of control respectively; Fig. 6Bb, c). Conversely, 2-APB (100 μM), an IP₃R inhibitor and U73122 (10 μM), a phospholipase C inhibitor, were used to investigate the contribution of SERCA to the CaMKII modulation of ER Ca^{2+} . Interestingly, exposure to KN-93 did not significantly alter ionomycin-induced cytoplasmic Ca^{2+} increase in the presence of 2-APB or U73122 ($84 \pm 7\%$ and $91 \pm 7\%$ of control respectively; Fig. 6Bd, e). CaMKII therefore seems to modulate ER Ca^{2+} content through regulation of IP₃R with little if any contribution of the ER Ca^{2+} uptake pathway.

3.4 CaMKII and IP₃R interaction in native endothelial cells

Ca^{2+} imaging studies suggest that CaMKII controls ER Ca^{2+} levels and then endothelial Ca^{2+} dynamics through IP₃R. To evaluate CaMKII-IP₃R direct interaction, colocalization studies with *in situ* proximity ligation assays were performed. Taking advantage of CaMKII α and β heteromultimerization shown in Fig. 3, only CaMKII α was probed. Typical dot-like staining shows that CaMKII α is in close proximity with all three IP₃R isoforms. Indeed, CaMKII colocalizes with IP₃R type 1 (Fig. 7A), type 2 (Fig. 7B) and type 3 (Fig. 7C) in endothelium of MA.

IP₃R subtypes, having distinct intrinsic properties such as Ca^{2+} or IP₃ affinity [32, 33], they can be differentially involved in Ca^{2+} pulsars genesis and regulation, for example by CaMKII. Despite CaMKII vicinity to all three IP₃R isoforms, a heterogeneous distribution of IP₃R isoforms in the endothelium would suggest an IP₃R isoform specific regulation of Ca^{2+}

pulsars by CaMKII. Conventional immunofluorescence approach using confocal microscopy was then used on MA to assess endothelial intracellular distribution of the different IP₃R isoforms (Fig. 8). Although all IP₃R seem to be uniformly distributed within ECs (Fig. 8Aa, Ba & Ca), IP₃R-3 is the only isoform that was not detected within MEP (Fig. 8Ab,c, Bb,c & Cb,c). Therefore, CaMKII regulation of Ca²⁺ pulsars seems to occur through inhibition of IP₃R-1 and IP₃R-2 channels.

4. DISCUSSION

This study provides the first evidence of heteromultimerization of CaMKII α/β and a differential distribution of IP₃R isoforms in native endothelium, more precisely in MEPs. The findings support the hypothesis where CaMKII is the first kinase identified as a regulator of IP₃-dependent local Ca²⁺ signalling in ECs. It also depicts the enzyme as an important controller of intracellular Ca²⁺ stores of native endothelium. Intracellular Ca²⁺ dynamics in native endothelium, especially those occurring in MEPs appear to be crucial to endothelial control of vascular function. Therefore, CaMKII modulation of Ca²⁺ pulsars, an IP₃R-dependent Ca²⁺ signal spatially restricted to MEPs, might lead to significant functional outcomes.

CaMKII has been extensively studied in neurons and cardiomyocytes and to some extent in vascular SMCs where it plays major roles in several cellular functions, including regulation of ion channels activity, gene expression and Ca²⁺ homeostasis [22, 34-38]. Only recently CaMKII gained interest from the endothelial field. Indeed, Cai *et al.* (2004) showed that CaMKII is activated by shear stress in cultured ECs [38]. Initial reports of CaMKII in endothelial cells were using cultured cell lines. [39-41] However, ECs are particularly sensitive to culture conditions, which can result in a modified phenotype. Moreover, during cell culture process, endothelial cell polarity is lost as well as the intracellular architecture responsible for Ca²⁺ microdomains. Therefore, findings regarding CaMKII in cultured ECs must be confirmed in native ECs.

The experimental model used in this study was selected especially in the perspective of investigating endothelial CaMKII roles in native resistance arteries. The use of cut-open mesenteric resistance artery in endothelial *en face* configuration allows preservation of vascular cells organisation and phenotype. It also allows a correlation between spatial distribution of a protein or a signal to a cellular structure like MEPs. Unfortunately, this preparation is also limited as several molecular biology approaches requiring transfection are nearly impossible to carry out. A major limitation of this preparation is the lack absolute of determination of shear stress or flow values. Albeit all live cells experiments were carried out

in the presence of constant flow, it is impossible to correlate this flow to physiological blood flow. Moreover, intraluminal pressure is an important physiological stressor that would require a pressurized myograph and cannot be mimicked in our preparation. However, the findings from this study are not weakened by those technical limitations but are rather suggestive of a cellular mechanism and their relative significance might even be increased in more physiological conditions.

Known for its involvement in cardiac Ca^{2+} homeostasis [22, 42, 43], similar role for CaMKII in non-excitabile cells is yet to be determined. This is probably due to the activation mechanism of the kinase that is sensitive to Ca^{2+} oscillations frequency. Indeed, until recent findings of oscillatory and localized spontaneous Ca^{2+} signalling in ECs [12, 13, 15, 16, 44] endothelial Ca^{2+} dynamics were considered as bulk cytoplasmic variations strikingly distinct from the signals modulating CaMKII activity. However, it is now clear that Ca^{2+} microdomains are essential to endothelial function and may activate CaMKII. Moreover, the data from this study suggest that CaMKII might also be an important regulator of endothelial Ca^{2+} activity.

Interestingly, CaMKII α and β have been shown to form heteromultimers in neurons [45]. Hence, each isoform having distinct Ca^{2+} sensitivity and targets [1], heteromultimerization of CaMKII α and β increases the flexibility of the signalling pathway. In heteromultimers, F-actin binding domain of CaMKII β [31] provides to the α isoform the capacity to translocate and reach targets otherwise inaccessible. To our knowledge, apart from neurons [45], assembly of different CaMKII isoforms has not been reported in other cell types. However, results presented in this study suggest that CaMKII α/β can form multimers in native ECs. Furthermore, those multimers most likely allow the translocation of the enzyme to MEPs, where it can phosphorylate IP₃R amongst others, as suggested by our functional and proteins proximity ligation assays. The evidence provided in this study regarding potential formation of CaMKII α/β heteromultimers are limited to the proximity of the two isoforms shown by *in situ* PLA. This approach suggests that the CaMKII α and β are within 40 nm from each other. Although, this is not a direct evidence of physical association of the two isoforms, this approach still provides a better resolution than the classical co-localisation

analysis of dual labelling immunofluorescence by confocal microscopy, with an axial resolution of 180 nm [46]. Figure 3 shows the best evidence of potential α/β subunits association achievable since other options are unfortunately impossible to perform in native endothelium. Indeed, the limited quantity of cells available makes it impossible to use co-immunoprecipitation approaches. Moreover, CaMKII α and β are not expressed in cultured ECs [39, 47], eliminating potential molecular biology techniques involving cell culture. Therefore, proximity of α and β isoforms in addition to association of the two isozymes in neurons strongly suggest that CaMKII α/β heteromultimers can be present in native endothelium.

This finding allowed us to use only CaMKII α as subrogate for endothelial CaMKII α and β in the investigation of their colocalization with IP₃R with the *in situ* PLA. This is very important since the PLA approach requires the use of primary antibodies from different hosts. Only one suitable antibody from a non-rabbit host was found amongst our targets of interest, an antibody for CaMKII α raised in goat. Results obtained from *in situ* PLA experiments suggest that CaMKII may interact with all the three isoforms of IP₃R. Inhibition of IP₃R by CaMKII has been reported to be associated to serine 150 phosphorylation of the IP₃R-2. Maxwell *et al.*, (2012) demonstrate by sequence alignment that this CaMKII phosphorylation site in IP₃R-2 is preserved as a threonine in IP₃R-1 and IP₃R-3. [48]. Although only phosphorylation of IP₃R-2 by CaMKII has been shown, phosphorylation of IP₃R-1 and IP₃R-3 cannot be ruled out. On the other hand, IP₃R intracellular distribution appeared initially uniform for all three isoforms. Further analysis showed that IP₃R-3 was constantly absent from IEL fenestrations. Previous work in cremaster microcirculation ECs-SMCs co-culture approach elegantly showed the localisation of IP₃R-1 within MEP [49]. In accordance with B.E. Isakson (2008), we detected IP₃R-1 within IEL fenestration. However, we also detected IP₃R-2, in MEP, a difference potentially inferable to different vascular bed studied and cell culture conditions. The functional impact of this discrepancy is unknown. Noteworthy, although impossible to quantify, IP₃R-2 staining was generally perceived deeper in the IEL fenestration than IP₃R-1. This is consistent with the literature where IP₃R-1 and IP₃R-2 seems more important for Ca²⁺ oscillation, compared to IP₃R-3, presumably more important for monophasic Ca²⁺ transient [50].

CaMKII proximity with all three IP₃R isoforms suggests that the kinase might affect all isoforms and therefore have an important impact on intracellular Ca²⁺ stores through regulation of Ca²⁺ efflux from the ER. Indeed, CaMKII inhibition significantly accelerates and amplifies ER Ca²⁺ stores emptying in the absence of extracellular Ca²⁺ expressing the substantial role of CaMKII in the regulation of intracellular Ca²⁺ stores. Unfortunately, there is no currently available antibody directed against a CaMKII-phosphorylated form of IP₃R. Accordingly, there is no approach available to investigate the direct interaction between CaMKII and IP₃R in native endothelium. However, functional CaMKII-IP₃R interaction is shown by the abolishment of CaMKII-dependent alteration of ER Ca²⁺ content in the absence of functional IP₃R. CaMKII would then require IP₃R to regulate intracellular Ca²⁺ stores. Moreover, CaMKII decreases the population of Ca²⁺ pulsar active sites, an IP₃R –dependent Ca²⁺ signal. Modulation of IP₃R-3 cannot be ruled out, as its regulation by CaMKII might simply not be detectable where the localized intracellular Ca²⁺ is not tightly coupled. So CaMKII might also inhibit all IP₃R isoforms throughout the cell but the only detectable outcome, in our conditions, is a decrease in Ca²⁺ pulsars site. Interestingly, CaMKII does not alter Ca²⁺ pulsars kinetics or amplitude, suggesting that the kinase probably only modulates the open probability of the Ca²⁺-release channel. However, further detailed investigation will be required to test this hypothesis. The inhibition of Ca²⁺ pulsars by CaMKII suggests that the kinase, being also activated by Ca²⁺ pulsars, is part of a negative feedback mechanism, modulating localized Ca²⁺ signalling in ECs. Actually, this is the first report of a regulatory mechanism of IP₃R-dependent Ca²⁺ microdomains in ECs. However, influence of CaMKII on other Ca²⁺ microdomains, such as TRPA1- or TRPV4-sparklets [12, 14] or in other vascular beds [44] remains to be determined. Furthermore, this study was almost exclusively experimentally designed in the absence of any endothelial stimulation and suggests that CaMKII α/β multimers and their regulation of intracellular Ca²⁺ stores and IP₃R can be found in resting conditions.

CaMKII regulation of intracellular Ca²⁺ stores can also have a significant impact on other cellular mechanisms. It could be hypothesized that regulation of intracellular Ca²⁺ stores by CaMKII might indirectly regulate Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) pathways. Indeed, CaMKII activation will increase Ca²⁺ levels in the ER and therefore inhibit STIM1 clustering

and interaction with ORAI1. SOCE modulation by CaMKII has been reported in other preparations [51-53] and is of interest in the endothelial field, especially in pathological conditions where the culprit includes endothelial cells proliferation. Noteworthy, reciprocal interaction where SOCE can activate CaMKII is not necessary to the enzyme activation (Fig. 1, 5 & 6), but cannot be ruled out. SOCE-dependent activation of CaMKII can also be involved in SOCE associated endothelial functions. However, functional impact of a potential reciprocal regulation between SOCE and CaMKII will require further investigation. On the other hand, inhibition of IP₃R by CaMKII can also be involved in the spatial confinement of Ca²⁺ pulsars. Ca²⁺ pulsar is characterized by a definite location of oscillatory Ca²⁺ signals with a limited propagation. The mechanisms involved in the restriction of Ca²⁺ spreading are unknown but CaMKII is an interesting candidate since inhibition of IP₃R surrounding a Ca²⁺ pulsar site could result in a blunted propagation. This additional putative role for CaMKII is exciting and will require further investigation.

5. SUMMARY AND CONCLUSIONS

In summary, this study provides the first evidence for heteromultimerization of CaMKII α and β in non-neuronal cell type. This α/β isoforms co-assembly could allow CaMKII α to translocate to MEP once activated by Ca²⁺ pulsars. Vascular tone reflects a fine equilibrium between relaxing and contractile influence on VSM. Endothelial Ca²⁺ increase, even locally, may lead to VSM relaxation. Accordingly, CaMKII may act as a Ca²⁺ switch in a negative feedback mechanism involved in the regulation of the tight balance in the VSM contractile state. Indeed, our results suggest that CaMKII modulates Ca²⁺ pulsars dynamics through IP₃R (probably type 1 and type 2) pathway, and to a bigger extent, intracellular Ca²⁺ stores. Therefore, CaMKII appears as a major regulator of endothelial Ca²⁺ and thus of endothelial homeostasis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Université de Montreal (F.T. & C.C.), MHI (F.T. & C.C.), SQHA (F.T.), FRQS, CIHR, CFI and HSFC (J.L.). We are grateful to Dr Philippe Comtois for insightful discussions. We thank Louis R. Villeneuve for precious assistance with confocal microscopy and Dr Delphine Beziau and Nour Dayeh for their helpful review of this manuscript.

REFERENCES

1. Sandoval, R., et al., . *Ca(2+) signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions*, J Physiol, 2001. **533**(Pt 2): p. 433-45.
2. Sandoval, R., et al., *Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(2): p. L239-47.
3. Rinne, A., K. Banach, and L.A. Blatter, *Regulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in vascular endothelial cells*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(3): p. 400-10.
4. Hellermann, G.R. and L.P. Solomonson, *Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 12030-4.
5. Venema, R.C., et al., *Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6435-40.
6. Ledoux, J., A.D. Bonev, and M.T. Nelson, *Ca²⁺-activated K⁺ channels in murine endothelial cells: block by intracellular calcium and magnesium*. J Gen Physiol, 2008. **131**(2): p. 125-35.
7. Damkjaer, M., et al., *Pharmacological activation of KCa3.1/KCa2.3 channels produces endothelial hyperpolarization and lowers blood pressure in conscious dogs*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(1): p. 223-34.
8. Sakai, T., *Acetylcholine induces Ca-dependent K currents in rabbit endothelial cells*. Jpn J Pharmacol, 1990. **53**(2): p. 235-46.
9. Yamamoto, K., et al., *Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca²⁺ influx into pulmonary artery endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H793-803.
10. Beliveau, E., F. Lapointe, and G. Guillemette, *The activation state of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates the velocity of intracellular Ca²⁺ waves in bovine aortic endothelial cells*. J Cell Biochem, 2011. **112**(12): p. 3722-31.

11. Florea, S.M. and L.A. Blatter, *The effect of oxidative stress on Ca²⁺ release and capacitative Ca²⁺ entry in vascular endothelial cells*. Cell Calcium, 2008. **43**(4): p. 405-15.
12. Sonkusare, S.K., et al., *Elementary Ca²⁺ signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function*. Science, 2012. **336**(6081): p. 597-601.
13. Sonkusare, S.K., et al., *AKAP150-dependent cooperative TRPV4 channel gating is central to endothelium-dependent vasodilation and is disrupted in hypertension*. Sci Signal, 2014. **7**(333): p. ra66.
14. Sullivan, M.N., et al., *Localized TRPA1 channel Ca²⁺ signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation*. Sci Signal, 2015. **8**(358): p. ra2.
15. Ledoux, J., et al., *Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(28): p. 9627-32.
16. Tran, C.H., et al., *Endothelial Ca²⁺ wavelets and the induction of myoendothelial feedback*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(8): p. C1226-42.
17. Emerson, G.G. and S.S. Segal, *Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control*. Circ Res, 2000. **87**(6): p. 474-9.
18. Dupont, G. and A. Goldbeter, *CaM kinase II as frequency decoder of Ca²⁺ oscillations*. Bioessays, 1998. **20**(8): p. 607-10.
19. Soderling, T.R., B. Chang, and D. Brickey, *Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 3719-22.
20. Eshete, F. and R.D. Fields, *Spike frequency decoding and autonomous activation of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglion neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(17): p. 6694-705.
21. Vittone, L., C. Mundina-Weilenmann, and A. Mattiazzi, *Phospholamban phosphorylation by CaMKII under pathophysiological conditions*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 5988-6005.
22. Bare, D.J., et al., *Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15912-20.

23. Zhu, D.M., et al., *Reversible phosphorylation as a controlling factor for sustaining calcium oscillations in HeLa cells: Involvement of calmodulin-dependent kinase II and a calyculin A-inhibitable phosphatase*. *Biochemistry*, 1996. **35**(22): p. 7214-23.
24. Tallini, Y.N., et al., *Propagated endothelial Ca²⁺ waves and arteriolar dilation in vivo: measurements in Cx40BAC GCaMP2 transgenic mice*. *Circ Res*, 2007. **101**(12): p. 1300-9.
25. Erickson, J.R., et al., *Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation*. *Nature*, 2013. **502**(7471): p. 372-6.
26. Park, J.H., et al., *Far-infrared radiation acutely increases nitric oxide production by increasing Ca(2+) mobilization and Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1179*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **436**(4): p. 601-6.
27. Borbiev, T., et al., *Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **285**(1): p. L43-54.
28. Cai, H., et al., *Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(10): p. 1571-6.
29. Pandey, D., et al., *Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5*. *Mol Pharmacol*, 2011. **80**(3): p. 407-15.
30. Schworer, C.M., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of a regulatory autophosphorylation site adjacent to the inhibitory and calmodulin-binding domains*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(27): p. 13486-9.
31. Shen, K., et al., *CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines*. *Neuron*, 1998. **21**(3): p. 593-606.
32. Tu, H., Z. Wang, and I. Bezprozvanny, *Modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms by calcium: a role of calcium sensor region*. *Biophys J*, 2005. **88**(2): p. 1056-69.

33. Tu, H., et al., *Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms*. *Biophys J*, 2005. **88**(2): p. 1046-55.
34. Tan, S.E., R.J. Wenthold, and T.R. Soderling, *Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons*. *J Neurosci*, 1994. **14**(3 Pt 1): p. 1123-9.
35. Giese, K.P., et al., *Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning*. *Science*, 1998. **279**(5352): p. 870-3.
36. Greenwood, I.A., J. Ledoux, and N. Leblanc, *Differential regulation of Ca(2+)-activated Cl(-) currents in rabbit arterial and portal vein smooth muscle cells by Ca(2+)-calmodulin-dependent kinase*. *J Physiol*, 2001. **534**(Pt. 2): p. 395-408.
37. Backs, J., et al., *CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1853-64.
38. Li, W., et al., *The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II delta (CaMKIIdelta) controls neointima formation after carotid ligation and vascular smooth muscle cell proliferation through cell cycle regulation by p21*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(10): p. 7990-9.
39. Wang, Z., et al., *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II delta 6 (CaMKIIdelta6) and RhoA involvement in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(28): p. 21303-12.
40. Meoli, D.F. and R.J. White, *Thrombin induces fibronectin-specific migration of pulmonary microvascular endothelial cells: requirement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **297**(4): p. L706-14.
41. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. *Circ Res*, 2001. **88**(11): p. E68-75.
42. Takasago, T., et al., *Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation*. *J Biochem*, 1991. **109**(1): p. 163-70.
43. Wehrens, X.H., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor*. *Circ Res*, 2004. **94**(6): p. e61-70.

44. Qian, X., et al., *Recruitment of dynamic endothelial Ca²⁺ signals by the TRPA1 channel activator AITC in rat cerebral arteries*. *Microcirculation*, 2013. **20**(2): p. 138-48.
45. Brocke, L., et al., *Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(32): p. 22713-22.
46. Schermelleh, L., R. Heintzmann, and H. Leonhardt, *A guide to super-resolution fluorescence microscopy*. *J Cell Biol*, 2010. **190**(2): p. 165-75.
47. Balla, Z., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta 2 and gamma isoforms regulate potassium currents of rat brain capillary endothelial cells under hypoxic conditions*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(24): p. 21306-14.
48. Maxwell, J.T., S. Natesan, and G.A. Mignery, *Modulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 2 Channel Activity by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII)-mediated Phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(47): p. 39419-28.
49. Isakson, B.E., *Localized expression of an Ins(1,4,5)P₃ receptor at the myoendothelial junction selectively regulates heterocellular Ca²⁺ communication*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 21): p. 3664-73.
50. Miyakawa, T., et al., *Encoding of Ca²⁺ signals by differential expression of IP₃ receptor subtypes*. *EMBO J*, 1999. **18**(5): p. 1303-8.
51. Machaca, K., *Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II potentiates store-operated Ca²⁺ current*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(36): p. 33730-7.
52. Rodriguez-Moyano, M., et al., *Urotensin-II promotes vascular smooth muscle cell proliferation through store-operated calcium entry and EGFR transactivation*. *Cardiovasc Res*, 2013. **100**(2): p. 297-306.
53. Umemura, M., et al., *Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e89292.

FIGURES LEGENDS

Fig. 1 Ca^{2+} influx-independent activation of CaMKII in native endothelial cells.

(A, B, C) Immunostaining for the phosphorylated (activated) form of CaMKII in position Threonin 286 (CaMKII-T286) in native endothelial cells (ECs). CaMKII-T286 labelling (Red) in Ca^{2+} free solution with nuclear staining (blue) in the absence (A) or presence (B,C) of acetylcholine (ACh; 10 μM ; 5 min). (C) Similar to B with the exception that the artery was preincubated with KN-93 (10 μM), for 20 min. n= 4. Scale = 5 μm .

Fig. 2 Localization of CaMKII α and CaMKII β in native endothelial cells.

(A, B) Immunostaining for CaMKII α (A) and β (B). Labelling of CaMKII (Red) in (a) endothelial cells (ECs) with (b) the internal elastic lamina (IEL; Green), where fenestrations in IEL correspond to potential myoendothelial projections. (c) Cropped images of immunostaining for CaMKII α (Ac; Red) and CaMKII β (Bc; Red) of cross sectional views along the z-axis from z-stacks of images with the IEL (Green) located at the white dotted line. Arrows show CaMKII densities in IEL fenestrations. SMC: smooth muscle cell. n = 4. Scale = 5 μm .

Fig. 3 CaMKII α and CaMKII β heteromultimer in native endothelial cells.

With *in situ* proximity ligation assay, each detected protein complex is represented by a red dot. Labelling for (A) CaMKII α and CaMKII β show positive staining (a; Red) overlay the internal elastic lamina (b; IEL; Green) with endothelial cells (ECs) nucleus (Blue). (B) Staining for 2 hypothetically distant proteins, CaMKII α and calnexin. (C) Negative control where primary antibodies were omitted. n = 4. Scale = 5 μm .

Fig. 4 Impact of CaMKII inhibition on Ca^{2+} pulsars dynamics.

(A) Typical field of view of GCaMP2-expressing endothelium from a mesenteric artery. Regions of interest (ROIs), illustrated as colour squares, were used to analyze the impact of KN-93 (10 μM), a specific inhibitor of CaMKII on Ca^{2+} pulsars. (B) Time course of a typical experiment where the tissue was exposed to KN-93 (10 μM). Each color represents an individual Ca^{2+} pulsar site associated with the corresponding ROI illustrated in A.

Fluorescence was recorded for 90 seconds prior exposure to KN-93 in a continuous 4 minutes recording and 10 minutes following the addition of KN-93 for 2 minutes. (C) Bar graphs summarizing data from experiments as in (A) and (B) where Ca^{2+} pulsars were monitored in the absence (Control; White), following acute (KN-93 (10 μM); Gray) and chronic exposure to KN-93 (KN-93 (10 μM)10 min; Black). “Total Ca^{2+} pulsars frequency” is defined as the number of Ca^{2+} pulsar events in a field of view per time. “ Ca^{2+} pulsars frequency/active sites” is defined as the mean of individual Ca^{2+} pulsar frequencies for each active site. “ Ca^{2+} pulsars active sites is defined as the number of Ca^{2+} pulsar sites in a field of view which had a minimum of one Ca^{2+} event in the experimental condition.

Control values were set at 100% and values from each condition were normalized to their own control (% of control of the same field). Total Ca^{2+} pulsar frequency (Ca) represents all Ca^{2+} pulsar events in the field of view per time. Ca^{2+} pulsars frequency/actives sites (Cb) represents the mean of individual Ca^{2+} pulsar frequencies for each active site. Ca^{2+} pulsar active sites (Cc) represent the number of Ca^{2+} pulsar sites in a field of view which had a minimum of one Ca^{2+} event in the experimental condition. n = 6. Anova: * $P < 0.0002$. n.s : none-significant Scale = 10 μm .

Fig. 5 Role of extracellular calcium and CaMKII on Ca^{2+} pulsars dynamics in native endothelial cells

(Aa,Ba) Representative time course of Ca^{2+} pulsars dynamics recorded in endothelium of mesenteric artery from GCaMP2 mice. Arteries were incubated in extracellular Ca^{2+} free solution (2 min). GCaMP2 fluorescence was recorded 60 seconds in Ca^{2+} free solution in the absence (Aa) or presence of KN-93 (10 μM ; Ba). Continuous acquisition of Ca^{2+} -associated fluorescence was then performed following exposure to cylopiazonic acid (CPA; 30 μM) in the absence (A) or presence of KN-93 (B). Each color represents an individual Ca^{2+} pulsar site identified by a ROI. (Ab, Bb) Bar graph summarizing the total Ca^{2+} pulsars frequency following CPA exposure in the absence of KN-93 (Ab) or in presence of KN-93 (Bb). Total Ca^{2+} pulsars frequency is expressed in % of control, where control is total Ca^{2+} pulsars frequency value in the presence of 1.6 mM Ca^{2+} superfusate. (C) Non-linear exponential fit curves for the number of Ca^{2+} pulsar events (Without KN-93: $R^2 = 0.6719$, with KN-93: $R^2 =$

0.6178;Ca) and the number of Ca^{2+} pulsar active sites (Without KN-93: $R^2 = 0.7157$, with KN-93: $R^2 = 0.6071$; Cb) for the entire 720 seconds recording (15 seconds intervals). Ab and Bb: ANOVA * $P < 0.0005$. C: F-test $P < 0.0001$. $n = 3$.

Fig. 6 CaMKII's endoplasmic reticulum targets in native endothelial cells.

(A) Typical example of fluorescence associated to the ionomycin-induced ($10 \mu\text{M}$) Ca^{2+} release (Ab) from the internal Ca^{2+} store on Fluo-4 loaded endothelial cells (EC), in the absence of extracellular Ca^{2+} . F/F_0 : fluorescence intensity (F) relative to baseline (F_0) (B) Bar graph of Fluo-4 fluorescence increase associated to endothelial ER Ca^{2+} content. (a) Effect of CaMKII inhibition by KN-93 ($10 \mu\text{M}$; Black) on ER Ca^{2+} content was compared to control condition (White). CaMKII interaction with IP_3 receptor was assessed by inhibition of SERCA with thapsigargin (thaps; $1 \mu\text{M}$; b) or cyclopiazonic acid (CPA; $30 \mu\text{M}$; c), with (Black) or without KN-93 ($10 \mu\text{M}$; White). CaMKII interaction with SERCA was assessed by inhibition of IP_3R with 2-APB ($100 \mu\text{M}$; d) or inhibition of phospholipase C with U73122 ($10 \mu\text{M}$; e), with KN-93 (Black) or without KN-93 ($10 \mu\text{M}$; White). Value of Fluo-4 fluorescence (% of control) were the maximal value of fluorescence (F/F_0) induced by ionomycin obtain in presence of KN-93 of each cell reported on mean maximal value of Fluo-4 fluorescence (F/F_0) obtain without KN-93 as control for each experiment type. $n = 3$. t-test: * $P < 0.05$. Scale = $15 \mu\text{m}$.

Fig. 7 CaMKII interaction with IP_3 receptor isoforms in native endothelial cells.

With *in situ* proximity ligation assay, each detected protein complex is represented by a red dot. Labelling for CaMKII α with different IP_3 receptor isoform (IP_3R ; A: type 1, B: type 2. C: type 3) show all positive staining (Red) in endothelial cells (ECs; a) with nucleus (Blue) and overlay with internal elastic lamina (IEL; Green; b). $n = 3$. Scale = $5 \mu\text{m}$.

Fig. 8 Localization of IP_3 receptor in native endothelial cells.

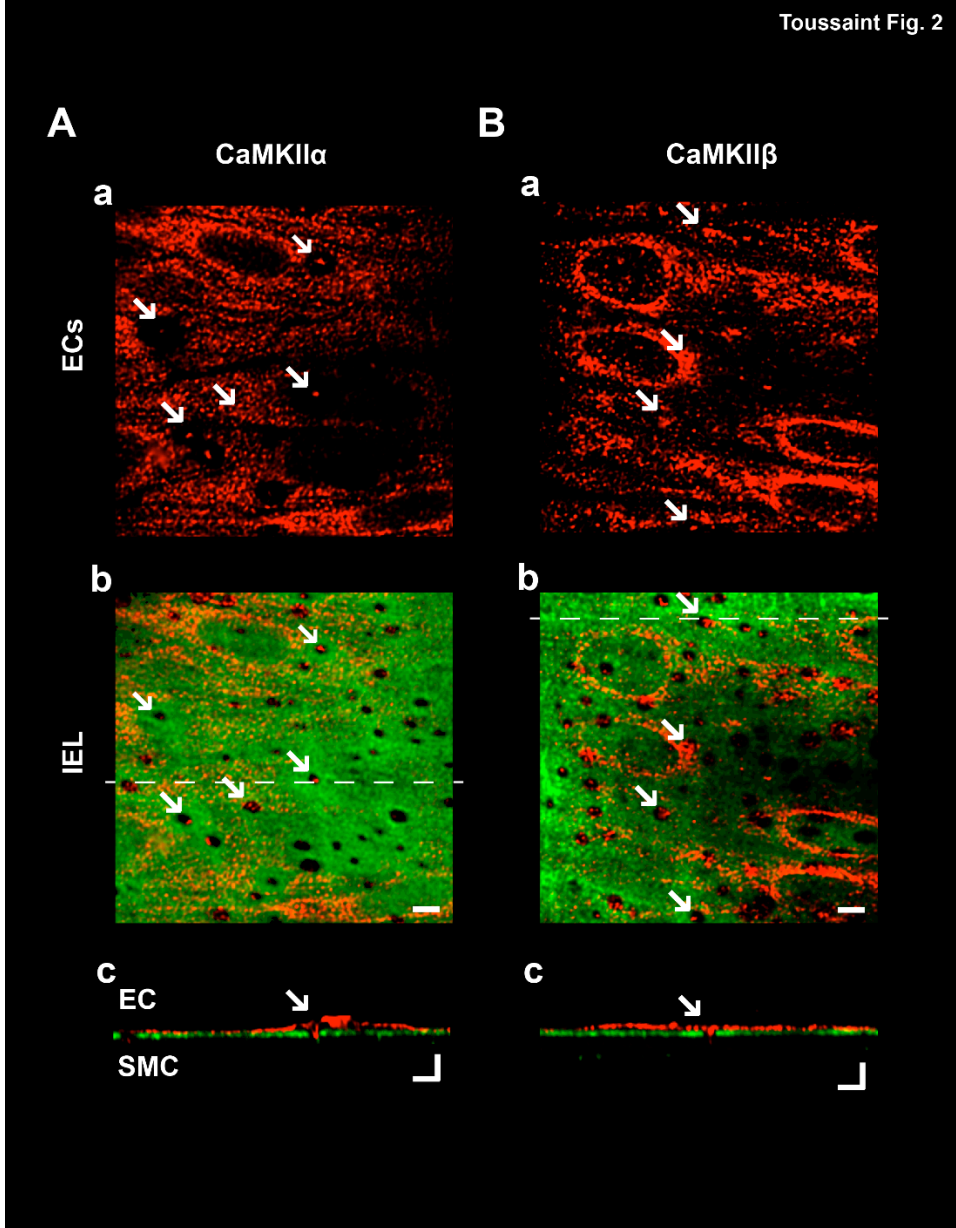
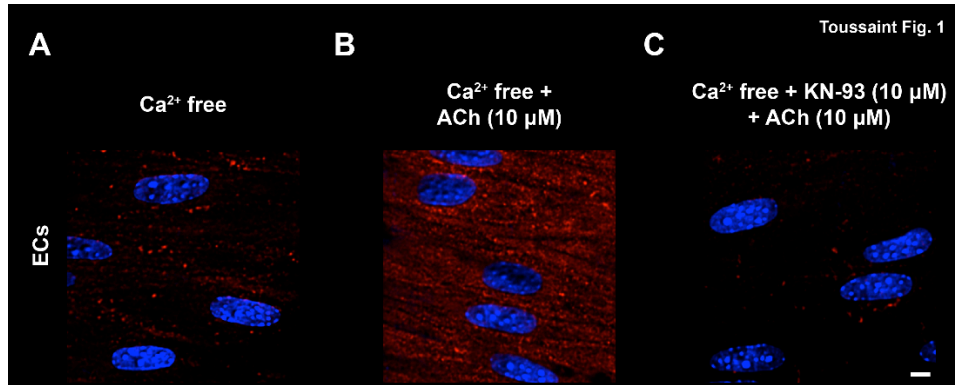
(A, B, C) Immunostaining for different IP_3 receptor isoform (IP_3R ; A: type 1, B: type 2, C: type 3). (a) Staining of IP_3R (Red) in endothelial cells (ECs). (b) Staining of IP_3R (Red) overlay internal elastic lamina (IEL; Green) where fenestrations correspond to potential

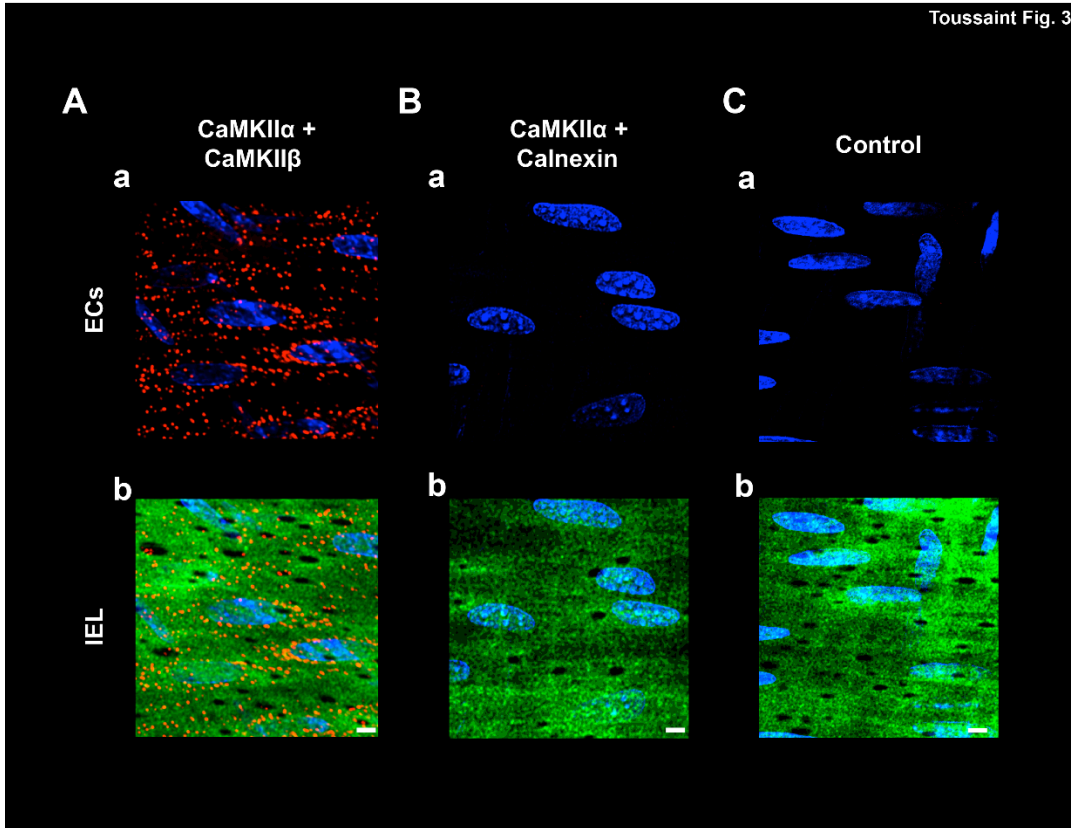
myoendothelial projections. (c) Cropped images of IP₃R staining (Red) in cross sectional views along the z-axis from z-stacks of images with the IEL (Green) located at the white dotted line. Arrows show IP₃R densities in IEL fenestrations. SMC: smooth muscle cells. n = 4. Scale = 5 μm.

Table 1 Ca²⁺ pulsars kinetics with or without inhibition of CaMKII

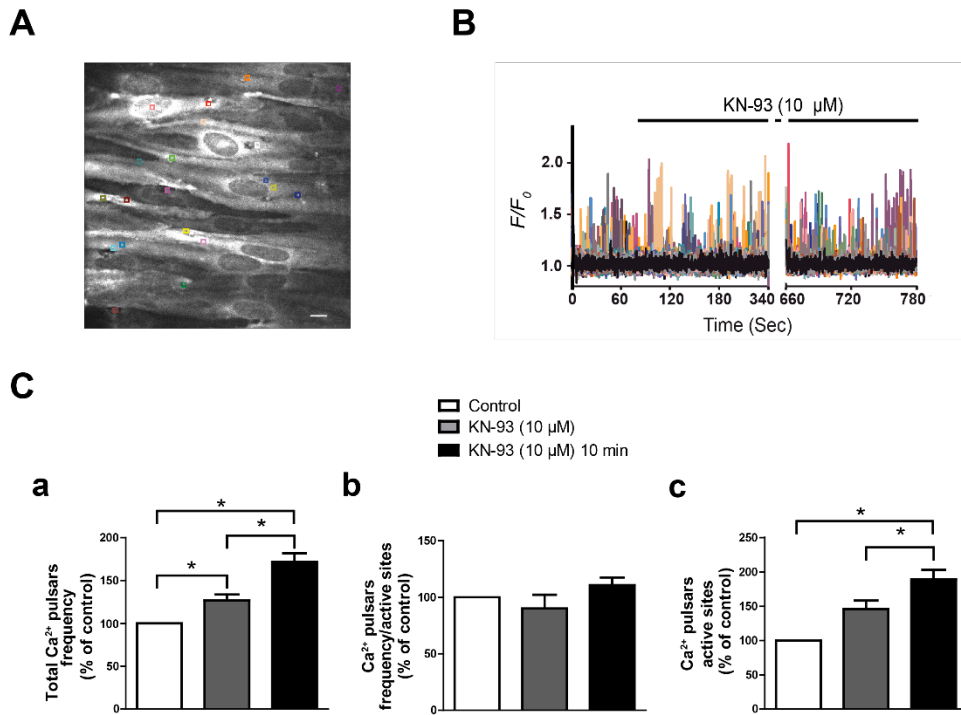
Parameters	Control	KN-93 (10 μ M)	
		Acute	10 min
Amplitude, (F/F_0)	1,52 \pm 0,01	1,52 \pm 0,01	1,53 \pm 0,01
Rise time, Sec	0,31 \pm 0,01	0,31 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01
Duration, Sec	0,44 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01
$t_{1/2}$, Sec	0,24 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01

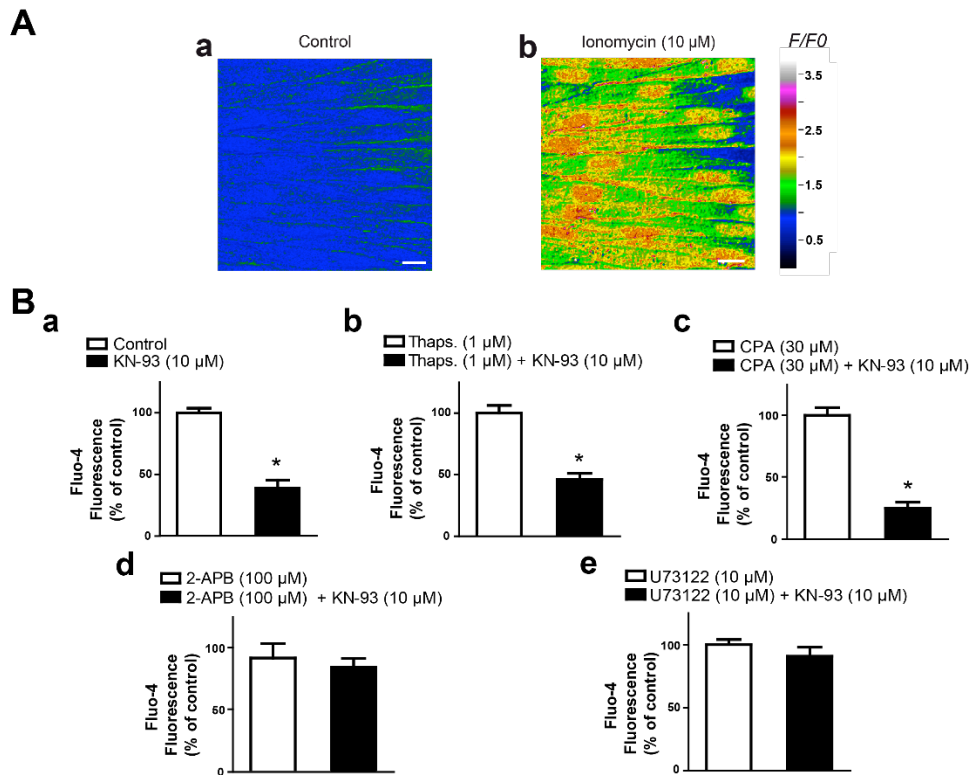
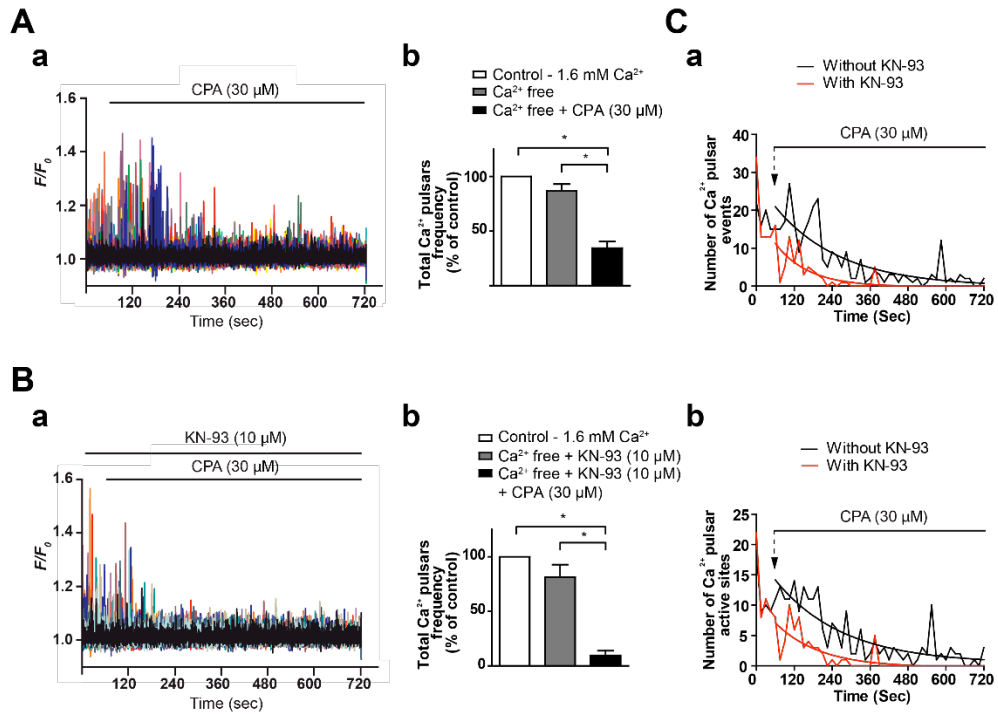
Peak amplitude was measured as F/F_0 ; Rise time was measured as the upstroke time required for 10–90% of the signal; Duration was measured as the time between 50% of the signal before and after the peak; and half-time decay ($t^{1/2}$) was measured as time between the peak and 50% of the amplitude of the signal. Groups are not statistically different. n = 6. Events: Control n= 244, KN-93 (10 μ M) n= 483, KN-93 (10 μ M) 10 minutes n= 437.

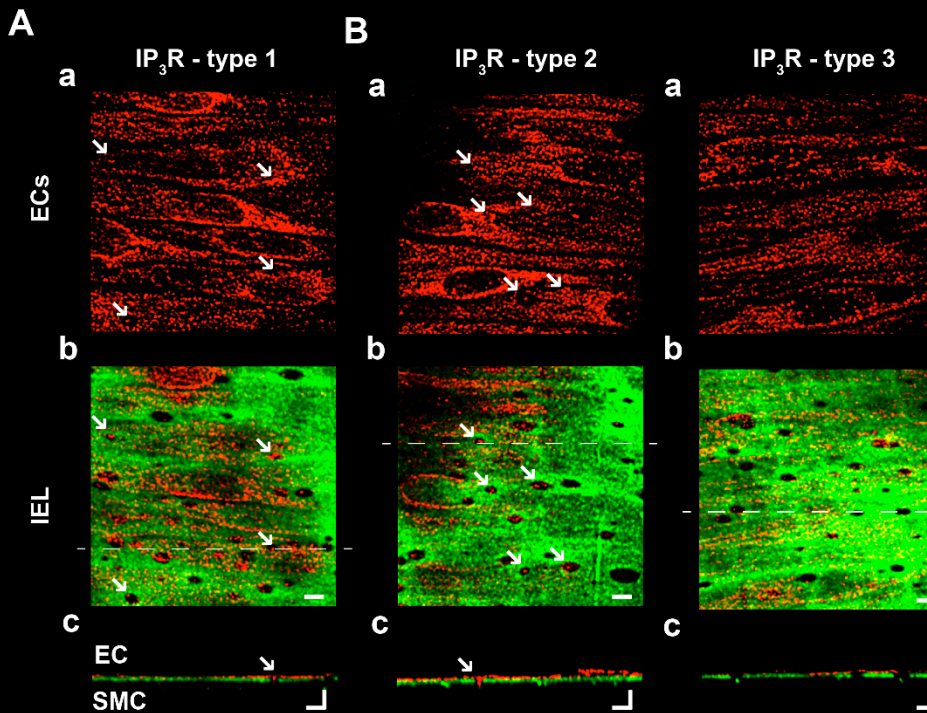
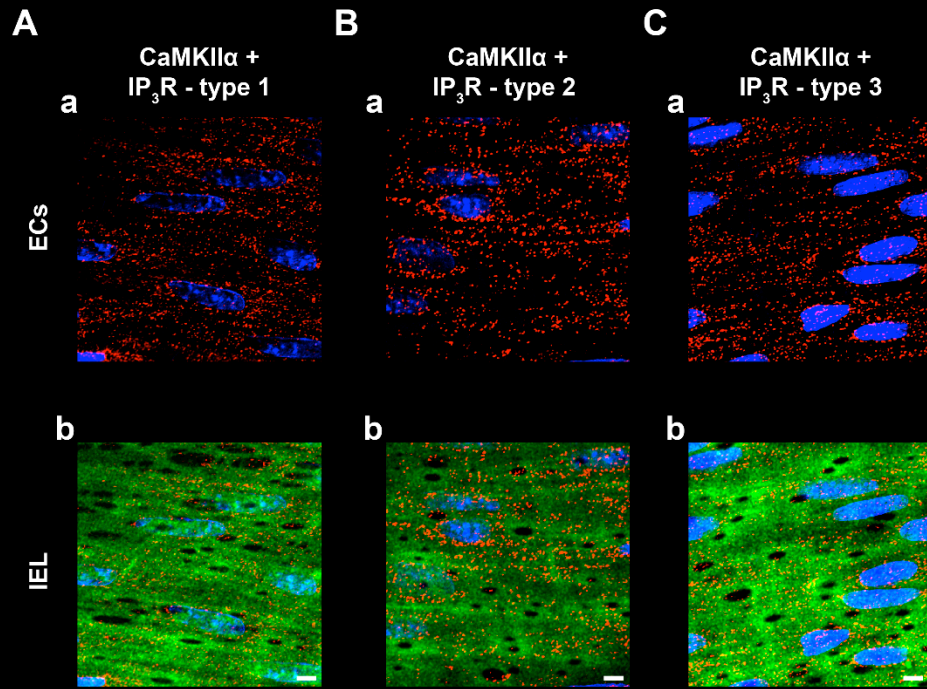




Toussaint Fig. 4







Supplemental tables

Table 1 CPA-induced decay in number of Ca²⁺ pulsar events

Fit curve value	Without KN-93	95% confidence intervals	With KN-93	95% confidence intervals
Y0, number of events	28,12	20,73 to 35,52	20,73	10,90 to 30,57
t ^{1/2}	142,2	109,9 to 201,4	69,19	48,90 to 118,2
τ	205,2	158,6 to 290,6	99,81	70,55 to 170,6

Y0 is the number of events at time = 0 seconds. t^{1/2} is time to reach half of Y0 in seconds. τ is the time constant in seconds.

Without KN-93: $Y = 28.12 \cdot \exp(-t/205.2)$

With KN-93: $Y = 20.73 \cdot \exp(-t/99.81)$

Table 2 CPA-induced decay in number of Ca²⁺ pulsar active sites

Fit curve value	Without KN-93	95% confidence intervals	With KN-93	95% confidence intervals
Y0, number of events	18,14	14,23 to 22,06	11,63	6,67 to 16,60
t ^{1/2}	160,8	128,6 to 214,6	87,58	62,16 to 148,1
τ	232	185,5 to 309,6	126,3	89,68 to 213,7

Y0 is the number of events at time = 0 seconds. t^{1/2} is time to reach half of Y0 in seconds. τ is the time constant in seconds.

Without KN-93: $Y = 18.14 \cdot \exp(-t/232.0)$

With KN-93: $Y = 11.63 \cdot \exp(-t/126.3)$

3.2 Article 2

Titre : Endothelial mitochondria shape Ca^{2+} pulsars dynamics.

Cet article est prêt pour soumission dans le journal : Scientific Reports.

3.2.1 Apport original et contribution des coauteurs

Fanny Toussaint : Conception du projet, réalisation de la majorité des expériences, conception d'outils d'analyses, récolte des données, analyses des données, interprétation des résultats, représentation/illustration des données, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit et approbation de la version finale du manuscrit.

Delphine Béziau : Conception du projet, réalisation de certaines expériences, conception d'outils d'analyses, récolte de données, analyses de données, interprétation des résultats

Chimène Charbel : Réalisation d'expériences

Marianne Berlatie : Analyses de données

Alexandre Blanchette : Participation à la réalisation d'expériences, participation à l'interprétation des résultats, révision du manuscrit

Gaetan Mayer : Conception d'expériences, interprétation des résultats

Philippe Comtois : Conception d'outils d'analyses, analyses de données, interprétation de résultats

John McCarron : Conception du projet et d'expériences.

Jonathan Ledoux : Conception du projet, interprétation des résultats, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit et approbation de la version finale du manuscrit.

3.2.2 Manuscrit

Title: Endothelial mitochondria shape Ca^{2+} pulsars dynamics.

Authors: Toussaint Fanny^{1,2,ϕ}, Béziau Delphine M^{1,ϕ}, Charbel Chimène¹, Berlatie Marianne¹, Blanchette Alexandre¹, Mayer Gaetan^{1,3}, Philippe Comtois^{1,5}, John McCarron⁶, Ledoux Jonathan^{1,4*}

Authors affiliations: ¹Research Center, Montreal Heart Institute, Montréal, Québec, Canada.

Departments of ²Pharmacology and Physiology, ³Pharmacy, ⁴Medicine, and ⁵Institute of Biomedical Engineering, Université de Montréal, Québec, Canada.

⁶Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Starhclyde, Glasgow, United Kingdom.

^ϕ Equally contributed to this study

* **Corresponding Author:** Email: jonathan.ledoux@umontreal.ca; Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger Street, Montréal, H1T 1C8, Québec, Canada; Phone: 1-514-376-3330 ext. 2476; Fax: 514-376-1355

Abbreviations

EC: Endothelial cell

SMC: Smooth muscle cell

Ca^{2+} : Calcium

MEP: Myoendothelial projection

IEL: Internal elastic lamina

K^{+} : Potassium

$\text{K}_{\text{ca}2.3}$: Small conductance Ca^{2+} - activated K^{+} channel 3

$\text{K}_{\text{ca}3.1}$: Intermediate conducatanace Ca^{2+} - activated K^{+} channel 1

TRPA1: Transient receptor potential ankyrin 1 channel

TRPV4: Transient receptor potential vanilloid 4 channel
TRP: Transient receptor potential
ROS: Reactive oxygen species
IP₃: Inositol 1,4,5-triphosphate
IP₃R: Inositol 1,4,5-triphosphate receptor
CaMKII: Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II
ER: Endoplasmic reticulum
VDAC: voltage dependent anion channel
mCU: mitochondrial calcium uniporter protein
NCLX : mitochondrial sodium calcium exchanger
mPTP: mitochondrial permeability transition pore
MA: mesenteric artery
FCCP: Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
ROI: Regions of interest
TMRE: Tetramethylrhodamine-ethyl ester
 $\Delta\Psi_m$: membrane potential
ATP: Adenosine triphosphate
H⁺: Hydrogen
ROS: Reactive oxygen species
NOX: NADPH oxydase
NOS-3: Endothelial nitric oxide synthase
O₂⁻: superoxide anion
SERCA : Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
H₂O₂: Hydrogen peroxide
NO: Nitric oxide
ONOO⁻: peroxinitrite

Abstract

Calcium homeostasis is crucial to endothelial functions and spatiotemporal control of Ca^{2+} can be an efficient mean to ensure outcome specificity. Cellular structures such as myoendothelial projections allow for intercellular communication and regulation of vascular tone and are also hosting local Ca^{2+} signals such as Ca^{2+} pulsar. This ER-derived Ca^{2+} signal activates players involved in the control smooth muscle contraction. However, aside the involvement of $\text{IP}_3\text{R1}/\text{IP}_3\text{R2}$, determinants for elementary characteristics of Ca^{2+} pulsar remains undetermined. Major regulator of Ca^{2+} homeostasis in several cell types, the role of mitochondria in modulating local endothelial Ca^{2+} signalling in resting conditions was assessed. Electron microscopy shows clusters of mitochondria in the vicinity of myoendothelial projections, supporting the concept of mitochondria ruling spatially-restricted Ca^{2+} signalling in endothelium. Accordingly, disruption of transmembrane potential with FCCP had a major impact on Ca^{2+} dynamics of native endothelial cells. The mitochondrial uncoupler increased the number of spontaneously active Ca^{2+} pulsar sites although *de novo* sites were characterized by a lower oscillation frequency. Area covered by a Ca^{2+} pulsar was also increased by FCCP, suggesting that mitochondria act as a Ca^{2+} barrier for Ca^{2+} pulsar. Spatial control of Ca^{2+} pulsars occurs through mitochondrial Ca^{2+} entry pathways since mitochondrial calcium uniporter (mCU) inhibition similarly amplified Ca^{2+} pulsar spreading whilst inhibition of mitochondrial Ca^{2+} exit pathways had no effect on Ca^{2+} pulsar surface. However, blocking mitochondrial Ca^{2+} efflux significantly increased Ca^{2+} pulsar sites population. Inhibition of NCLX or mPTP evoked low-frequency *de novo* pulsar sites similarly to FCCP exposure. In summary, uniquely positioned mitochondria shape Ca^{2+} pulsars through Ca^{2+} handling mechanisms, and therein the organelle oversees local Ca^{2+} dynamics in native endothelium.

Keywords: Vascular endothelium, mitochondria, calcium, myoendothelial projection, Ca^{2+} pulsar

Introduction

At the blood-vascular wall interface, endothelial cells (ECs) are active actors in regards to vascular homeostasis. Their capacity to integrate signals from either compartments basically depends on intracellular calcium (Ca^{2+}) levels (Himmel et al., 1993). For example, cytoplasmic Ca^{2+} is central for endothelial modulation of vascular permeability (De Bock et al., 2013; Sandoval et al., 2001) or vascular tone (Venema et al., 1996) as several signalling pathways involved are Ca^{2+} -dependent. Growing body of evidence support the prominent role of Ca^{2+} microdomains on global cytoplasmic Ca^{2+} levels for endothelial functions (Billaud et al., 2014; Pires & Earley, 2016). Conceptually appealing, the clustering of proteins and mechanisms within a confined region of the cell allows for a better spatiotemporal control and signal-to-outcome specificity (Parekh, 2008).

Structural determinants within the arterial wall uphold for such preferential spatially restricted Ca^{2+} signal-target interaction. Indeed, myoendothelial projection (MEP), endothelial cell protrusion through internal elastic lamina (IEL) fenestration, is a privileged structured allowing for bidirectionnal communication with the underlying vascular smooth muscle cells (VSMCs) (Heberlein et al., 2009). This cellular compartment provides the framework for improved signalling efficiency dedicated to ECs-VSMCs interactions. As such, local Ca^{2+} signals have been shown to evoke membrane hyperpolarization leading to VSMCs relaxation through activation of $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ channels enriched in MEPs (Kansui et al., 2008; Ledoux et al., 2008; Sandow et al., 2006; Sonkusare et al., 2012; Tran et al., 2012). Extracellular Ca^{2+} influx can generate these local Ca^{2+} oscillations (“sparklets”) and occurs through TRPA1 or TRPV4 channels in cerebral or mesenteric arteries, respectively (Earley et al., 2009; Sonkusare et al., 2012). Compartmentalization of regulatory components (ROS, AKAP150) appears essential to the regulation of these Ca^{2+} signals (Sonkusare et al., 2014; Sullivan et al., 2015). Additionally, Ca^{2+} pulsars and wavelets, spontaneous Ca^{2+} oscillations from IP_3 -sensitive stores within MEP have been characterized in native endothelium (Ledoux et al., 2008; Tran et al., 2012).

Recent work linked Ca^{2+} pulsars to CaMKII, the kinase being involved in a negative feedback loop. CaMKII α/β isoforms translocate to MEP upon Ca^{2+} pulsars stimulation (Charbel et al., 2015) and inhibits Ca^{2+} release through IP_3 receptors and ER Ca^{2+} store,

therein reducing IP₃R1/2-evoked Ca²⁺ pulsars (Toussaint et al., 2015). Aside CaMKII, the mechanisms controlling Ca²⁺ pulsars remain undetermined. Spatial restriction and stochasticity of Ca²⁺ pulsars are amongst the complex dynamic parameters lacking of identified regulators. Limited dispersion of Ca²⁺ ions out of MEP is a hallmark of Ca²⁺ pulsars and is essential to its function. Further diffusion of Ca²⁺ could then lead to cell-wide Ca²⁺ waves, activating various Ca²⁺-dependent pathways although unrelated to Ca²⁺ pulsars. Therefore, unidentified cellular machinery must generally restrain Ca²⁺ within MEP vicinity to ensure Ca²⁺ pulsars efficiency, but also intermittently allow for conversion in Ca²⁺ waves.

Mitochondria, often considered as cell powerplants, have also been shown to play key role in cellular Ca²⁺ homeostasis. The organelle is reported as the second largest intracellular Ca²⁺ store but also actively participate in local Ca²⁺ modulation. Mitochondrial control of local Ca²⁺ levels is complex and involves both Ca²⁺ influx and efflux mechanisms. These mechanisms allow fine spatiotemporal regulation of intracellular Ca²⁺ dynamics, assuming appropriate location of mitochondria. Interestingly, mitochondria subcellular distribution coincides with highly active Ca²⁺ regions. Moreover, mitochondria have been proposed to organize into an active barrier to restrict Ca²⁺ propagation in pancreatic acinar cell (Straub et al., 2000). However, similar role for mitochondria in endothelial cells has yet to be determined.

The impact of mitochondria on spontaneous Ca²⁺ pulsars has then been sought in native endothelial cells from resistance arteries. Clustering of mitochondria within MEP proximity would allow the organelle to modulate Ca²⁺ pulsar. Loss of mitochondrial function induced by FCCP exposure is associated with an increase in the number of active Ca²⁺ pulsars sites. Ca²⁺ pulsar spread is also increased in the presence of FCCP. These effects appear to be due to distinct mechanisms. Although inhibition of mitochondrial Ca²⁺ influx increased Ca²⁺ spread, only inhibition of mitochondrial efflux increased the number of Ca²⁺ pulsar active sites. Therefore, mitochondria might be a major player in endothelial local Ca²⁺ homeostasis.

Material & Methods

Animal studies were approved by the Montreal Heart Institute Research Center Animal Care Committee. C57/BL6 mice (Charles River; 12-16 weeks old) were sacrificed by intraperitoneal injection of pentobarbital (lethal dose, 150 mg/kg).

Ca²⁺ imaging

Third- or fourth- order mesenteric arteries (MA) were carefully isolated *i.e* clean of fat and connective tissue in HEPES solution (134 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, pH: 7.4), cut longitudinally, and pinned with the endothelium facing up on Sylgard (Dow Corning Crop., USA) sections mounted on square plastic supports.

Experiments were performed at 37°C in a physiological salt solution (PSS) containing: 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 24 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgCl₂, 11 mM Glucose and 1.5 mM CaCl₂. FCCP (2 μM), Oligomycin A (1 μg/mL, used together with FCCP), CGP37157 (10 μM), Cyclosporine A (1 μM), Ru360 (2 μM), Kaempferol (10 μM) were used in PSS. All solutions were oxygenated (12%O₂, 5%CO₂) throughout the experiment.

Ca²⁺ imaging was performed with a Revolution Andor confocal system and images were acquired with Andor iQ 2.8 software (Andor Technology) using an electron-multiplying charge coupled device camera (iXon) on an upright Nikon microscope (Eclipse FN-1). Images were acquired at ≈15 frames/sec (frame of 512 x 512). MAs were loaded with Fluo-4 as Ca²⁺ indicator (10 μM in static HEPES solution, with 2.5 μg/ml of pluronic acid, 45 min at 37°C). Ca²⁺ binding to Fluo-4 was recorded at ex/em 488/510 nm. Autofluorescence of the IEL was also assessed at ex/em 488/510 nm. Each acquisition were of a 4 minutes total recording including 45 secondes of control condition.

Ca²⁺ pulsars were analyzed using SparkAn software (A. Bonev, UVM). Ca²⁺ pulsar analysis was done offline using regions of interest (ROIs) defined by a 5X5 pixel box manually positioned at the point corresponding to the pulsar's peak amplitude ("Ca²⁺ pulsar sites"). "Ca²⁺ pulsar active site" was defined as a site where there is at least one Ca²⁺ pulsar event in the experimental condition. "Ca²⁺ pulsar frequency by active site" is defined as the number of Ca²⁺ pulsar event at an active site divide by the time of the experimental condition.

"Ca²⁺ pulsar spreading" refers to the surface covered by pixels with a fluorescence intensity \geq 50% of peak amplitude value. A spreading mask was created by converting the image from the Ca²⁺ pulsars spread estimation to a binary image. Spatial analysis was done in Matlab 2008 (Mathworks inc.) to calculate eccentricity and anisotropy (as the ratio of the major to the minor axis length of an ellipse) of the largest clusters from individual pulsar spreading mask.

To counter the variability between each arterial preparation, each value was normalized to the value obtain in the control condition (absence of any drug) of the same preparation. The value of the control condition was set to 100%.

Every set of experiments were reproduced with a minimum of 2 different mices ($N \geq 2$). Each experiment sample size is express as "n" and represent the number of artery acquired.

Mitochondria membrane potential assay

Samples preparation and confocal acquisition system correspond to the same specification already describe in the previous "Ca²⁺ imaging" section. Tetramethylrhodamine-ethyl ester (TMRE; mitochondrial membrane potential dependant dye; 120 nM in circulating oxygenated PSS, 10 min at 37°C) was recorded at ex/em 549/574 nm. Images were acquired at \approx 8 frames/sec. Laser power was reduced to the minimum to avoid TMRE bleaching. A control condition where only the laser was applied to the MA sample was done to confirm the absence of bleaching with our specific acquisition setting. Fluo-4 staining was done according to "Ca²⁺ imaging" section prior TMRE staining to assess endothelial cell viability of the specific field that will by acquire with the TMRE staining. The same condition as Ca²⁺ imaging was done for the FCCP condition (*i.e* concentration and incubation time) to verify the FCCP efficacy to decrease mitochondrial membrane potential. TMRE (120 nM) was keep in all solutions during the acquisition. TMRE analysis was assessed with SparkAn software by measuring the mean value of fluorescence intensity (F) relative to baseline (F_0) per 30 seconds increment from ROIs defines by a 5 x 5 pixels box manually and randomly positioned on the TMRE staining.

Every set of experiments were reproduced with a minimum of 2 different mices ($N \geq 2$). Each experiment sample size is express as "n" and represent the number of artery acquired.

Electron microscopy

Arteries were cleaned of adipose and connective tissue and then immediately fixed in buffer containing cacodylate 0.1 M, 1% gluteraldehyde, 2% paraformaldehyde. The samples

were then post-fixed in osmium tetroxide, stained with 4% uranyl acetate, dehydrated by graded ethanol, and finally coated with epon. The blocks were then cut into ultrathin slices (65 nm) before being observed with an electron microscope Philips CM120. Image acquisition was done using the Gatan Digital Micrograph software programs and then analysed with the freeware Image J.

Statistical analysis

Statistical analysis was done with the GraphPad Prism 5 software and data are present as mean \pm SEM. Unpaired t-test or ANOVA was use when appropriate; A threshold of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Functional mitochondria are characterized by an important membrane potential ($\Delta\Psi_m$) across the inner membrane (-180 mV) which can be abolished by exposure to FCCP (2 μ M), a mitochondrial uncoupler (Suppl. Fig. 1). Application of FCCP to Fluo-4-loaded endothelium had a substantial impact on spontaneous intracellular Ca^{2+} dynamics. Indeed, FCCP significantly increased the number of active Ca^{2+} pulsars sites ($\approx +60\%$) with little if any changes on global oscillations frequency (Fig. 1A & B) in the absence of any agonist. However, individual frequency was diminished by FCCP (-25%; Fig. 1C). Further analysis showed that *de novo* pulsar sites had a $\approx 45\%$ lower frequency than sites active in control condition (Fig 1E). These results suggest that active mitochondria control Ca^{2+} pulsars sites.

Mitochondria have been reported to control propagation of intracellular Ca^{2+} in acinar cells. Similar oversight by mitochondria have been investigated in our preparation. Accordingly, presence of FCCP evoked Ca^{2+} pulsars with significantly larger spreading area (Fig. 2). Newly recruited sites had larger Ca^{2+} dispersion (57% vs. 25%) suggesting that mitochondria can also limit Ca^{2+} diffusion out of MEP.

Mitochondria can regulate cytoplasmic Ca^{2+} through both influx and efflux mechanisms. The contribution of each pathways was then studied. Mitochondria Ca^{2+} intake was first inhibited with Ru360 (2 μ M), targeting mCU. The number of active sites was slightly diminished by Ru360 (Fig. 3A). However, Ru360 did not affect spontaneous pulsar frequency (Fig. 3B), similarly to FCCP. The area covered by a Ca^{2+} pulsar was also increased (+30%) upon mCU inhibition, an effect mainly on sites that were already active in control (Fig. 3C & D). Stimulation of mCU by kaempferol (10 μ M) increases Ca^{2+} entry in mitochondria. Accordingly, dispersion of Ca^{2+} from a Ca^{2+} pulsars was decreased in the presence of kaempferol (Fig. 4). Ca^{2+} pulsar site population was also enlarged by the mCU agonist (+85%) although oscillation frequency was decreased.

On the other hand, Ca^{2+} leak from mitochondria could substantially modify subcellular Ca^{2+} levels. Thus, roles of Ca^{2+} efflux mechanisms on Ca^{2+} pulsar dynamics were investigated. Cyclosporine A (1 μ m), a mPTP inhibitor, activated new Ca^{2+} pulsar sites ($\approx +75\%$; Fig.5A) characterized by a lower firing rate. The other major mitochondrial efflux pathway, a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCLX), can be inhibited by CGP37157 (10 μ M). Application of

CGP37157 had similar effect on Ca^{2+} pulsars dynamics (Fig. 6), including Ca^{2+} pulsar sites population and frequency. Interestingly, mPTP or NLCX blockers had no effect on Ca^{2+} pulsar spreading (Fig. 5D & Fig 6D), suggesting that mitochondrial Ca^{2+} efflux inhibition does not acutely alter mitochondria capacity to uptake Ca^{2+} .

The data from these Ca^{2+} imaging studies the involvement of mitochondria in the regulation of Ca^{2+} pulsars dynamics through control of local Ca^{2+} levels. However, such role requires proximity between the organelles and MEP, origin of Ca^{2+} pulsars. Subcellular distribution of mitochondria was then investigated by electron microscopy. Almost 50% of all mitochondria identified in a sample containing a MEP were found to be within 600 nm of the MEP cleft (Fig. 7). This suggests that mitochondria are heterogeneously distributed, with a preferential clustering in vicinity of MEP, where it could modulate the local Ca^{2+} signal.

Discussion

Mitochondria is well-recognized as a major ATP source, but the impact of the organelle on intracellular Ca^{2+} signalling has been underestimated. Recently, the impact of mitochondria on Ca^{2+} dynamics have been reported in cardiomyocytes (Bowser et al., 1998; Boyman et al., 2014; Hohendanner et al., 2014) or pancreatic cells (Camello-Almaraz et al., 2006; Gustavsson et al., 2006; Petersen, 2012). Regulation of local Ca^{2+} signalling in endothelial cells by mitochondria has not been reported despite the substantial impact of spatially-restricted Ca^{2+} signals in ECs. Findings from this study are thus the first evidence of Ca^{2+} pulsars handling by mitochondria. On a mechanistic standpoint, mitochondria control of Ca^{2+} pulsars appear to be complex, involving different mechanisms with distinct impact on the Ca^{2+} oscillatory events.

Ca^{2+} pulsars have been initially identified as IP_3R -dependent Ca^{2+} oscillations within MEP (Ledoux et al., 2008) and subsequent studies also described identical Ca^{2+} events without explicitly naming them (Garland et al., 2017). These spontaneous Ca^{2+} releases could be modulated through regulation of IP_3R . Indeed, CaMKII has been recently shown to inhibit Ca^{2+} pulsars through IP_3R and Ca^{2+} content of the endoplasmic reticulum. However, this mechanism requires the activation of the kinase, which can occur upon Ca^{2+} pulsars stimulation. In such case, CaMKII would be involved in a negative feedback loop. Ca^{2+} pulsars being spontaneous, the stochasticity of the Ca^{2+} events must be under the control of other mechanisms.

IP_3R channels are activated by IP_3 and Ca^{2+} , the latest having both stimulatory and inhibitory influence on channel opening (Tu et al., 2005). Therefore, ER Ca^{2+} release can be modulated by modifying Ca^{2+} levels in vicinity of IP_3R . Mitochondria have been proposed to play such role and tightly regulate local Ca^{2+} concentration, therein controlling IP_3R release of Ca^{2+} (Qi et al., 2015). Mitochondria modulation of Ca^{2+} pulsars through the fine tuning of Ca^{2+} proximal to IP_3R would necessitate a specific distribution of the organelle near MEP. Electron microscopy images reveals prominent clustering of MEP in the very short distance of MEP cleft. As such, mitochondria could limit Ca^{2+} pulsars propagation by physically interfering with Ca^{2+} diffusion, acting as a barrier (Johnson et al., 2003; Park et al., 2001). Accordingly, disruption of $\Delta\Psi_m$ or inhibition of mitochondrial Ca^{2+} uptake resulted in larger Ca^{2+} pulsars

spreading. However, further analysis suggests that mitochondrial restriction of the Ca^{2+} diffusion is rather active. Indeed, anisotropy of the Ca^{2+} pulsars spread was not different in the presence or absence of FCCP (Suppl. Fig. 2), despite a greater area of the signal in the absence of functional mitochondria. This result supports the hypothesis that mitochondria is not physically impeding Ca^{2+} diffusion. Alternatively, mitochondria perfectly aligned with the shape of the Ca^{2+} pulsar dispersion could also lead to similar results of anisotropy. However, this hypothesis appears highly unlikely.

Ca^{2+} monitoring experiments also support an active role of mitochondria on the modulation of Ca^{2+} pulsars stochasticity. Modulation of mitochondrial Ca^{2+} influx and efflux had significant impact on Ca^{2+} pulsars. Stimulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake or inhibiting its exit are expected to lead to a decrease in local Ca^{2+} levels. The lower Ca^{2+} pulsar frequency observed in such conditions suggests that mitochondria settle Ca^{2+} levels in IP_3R neighbouring to manage its P_0 . Mitochondria would then dictate Ca^{2+} pulsars incidence and determine when and where a Ca^{2+} pulsar would be generated. The conditions promoting mitochondria-dependent Ca^{2+} pulsars remain to be determined but might be linked to the subcellular structure. Indeed, MEP could also lead to association of unidentified partners modulating mitochondria function and/or Ca^{2+} transport.

On the other hand, Ca^{2+} recapture by mitochondria seems to restrict propagation of the Ca^{2+} signal outside of MEP. This is essential to confinement of Ca^{2+} pulsars to MEP. Otherwise, Ca^{2+} pulsars might lead to transcellular Ca^{2+} waves and activate several Ca^{2+} -dependent pathways outside MEP. Spatial restriction of Ca^{2+} diffusion might very well be bidirectional. Although not evaluated in this study, mitochondria buffering capacity might also protect MEP (and Ca^{2+} pulsars) from Ca^{2+} increases originating from other cellular compartments.

Summary and Conclusions

In summary, mitochondria control local Ca^{2+} signals in native endothelium. Local signalling restricted to the MEP like Ca^{2+} pulsars were previously identified as the crux of endothelial control of smooth muscle contraction. Precisely located near the MEP mouth, mitochondria govern Ca^{2+} microenvironment allowing a fine tuning of the Ca^{2+} pulsar dynamics. The control enforced by mitochondria appears complex but Ca^{2+} uptake mechanisms restricts local oscillations to MEP whilst Ca^{2+} exit pathways modulate IP_3R Po. Therefore, endothelial mitochondria are a Ca^{2+} hub, ruling Ca^{2+} pulsars and can thus regulate vascular tone. Alteration of mitochondrial function or subcellular localization would lead to pathological endothelial dysfunction.

Acknowledgment

This work was supported by Université de Montréal (F.T & C.C), MHI (F.T & C.C), SQHA (F.T & DM. B), FRQS (F.T & J.L), IRSC, CFI & HSFC (J.L). The authors are grateful to Johanne Ouellette (Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University) for her expert advices on electronic microscopy.

References

- Billaud, M., Lohman, A. W., Johnstone, S. R., Biwer, L. A., Mutchler, S., & Isakson, B. E. (2014). Regulation of Cellular Communication by Signaling Microdomains in the Blood Vessel Wall. *Pharmacological Reviews*, 66(2), 513–569. <http://doi.org/10.1124/pr.112.007351>
- Bowser, D. N., Minamikawa, T., Nagley, P., & Williams, D. A. (1998). Role of Mitochondria in Calcium Regulation of Spontaneously Contracting Cardiac Muscle Cells. *Biophysj*, 75(4), 2004–2014. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77642-8](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77642-8)
- Boyman, L., Chikando, A. C., Williams, G. S. B., Khairallah, R. J., Kettlewell, S., Ward, C. W., et al. (2014). Calcium movement in cardiac mitochondria. *Biophysical Journal*, 107(6), 1289–1301. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.045>
- Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., & Camello, P. J. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *AJP: Cell Physiology*, 291(5), C1082–C1088. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00217.2006>
- Charbel C, Toussaint F, Béziau D, Gillis MA, Blanchette A, Mamarbachi M, Bousette N, Comtois P, and Ledoux J. Functional activation of endothelial CaMKII by Ca²⁺ microdomains. *Sci Adv* Accepted: 2015.
- De Bock, M., Wang, N., Decrock, E., Bol, M., Gadicherla, A. K., Culot, M., et al. (2013). Endothelial calcium dynamics, connexin channels and blood-brain barrier function. *Progress in Neurobiology*, 108, 1–20. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.06.001>
- Earley, S., Gonzales, A. L., & Crnich, R. (2009). Endothelium-Dependent Cerebral Artery Dilation Mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *Circulation Research*, 104(8), 987–994. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.189530>
- Garland, C. J., Bagher, P., Powell, C., Ye, X., Lemmey, H. A. L., Borysova, L., & Dora, K. A. (2017). Voltage-dependent Ca²⁺ entry into smooth muscle during contraction promotes endothelium-mediated feedback vasodilation in arterioles. *Science Signaling*, 10(486), eaal3806. <http://doi.org/10.1126/scisignal.aal3806>
- Gustavsson, N., Abedi, G., Larsson-Nyrén, G., & Lindström, P. (2006). Timing of Ca²⁺ response in pancreatic beta-cells is related to mitochondrial mass. *Error*, 340(4), 1119–1124. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.119>

- Heberlein, K. R., Straub, A. C., & Isakson, B. E. (2009). The Myoendothelial Junction: Breaking through the Matrix? *Microcirculation*, *16*(4), 307–322. <http://doi.org/10.1080/10739680902744404>
- Himmel, H. M., Whorton, A. R., & Strauss, H. C. (1993). Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension*, *21*(1), 112–127. <http://doi.org/10.1161/01.HYP.21.1.112>
- Hohendanner, F., McCulloch, A. D., Blatter, L. A., & Michailova, A. P. (2014). Calcium and IP3 dynamics in cardiac myocytes: experimental and computational perspectives and approaches. *Frontiers in Pharmacology*, *5*. <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00035>
- Johnson, P. R., Dolman, N. J., Pope, M., Vaillant, C., Petersen, O. H., Tepikin, A. V., & Erdemli, G. (2003). Non-uniform distribution of mitochondria in pancreatic acinar cells. *Cell and Tissue Research*, *313*(1), 37–45. <http://doi.org/10.1007/s00441-003-0741-1>
- Kansui, Y., Garland, C. J., & Dora, K. A. (2008). Enhanced spontaneous Ca²⁺ events in endothelial cells reflect signalling through myoendothelial gap junctions in pressurized mesenteric arteries. *Cell Calcium*, *44*(2), 135–146. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.012>
- Ledoux, J., Taylor, M. S., Bonev, A. D., Hannah, R. M., Solodushko, V., Shui, B., et al. (2008). Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(28), 9627–9632. <http://doi.org/10.1073/pnas.0801963105>
- Parekh, A. B. (2008). Ca²⁺ microdomains near plasma membrane Ca²⁺ channels: impact on cell function. *The Journal of Physiology*, *586*(13), 3043–3054. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.153460>
- Park, M. K., Ashby, M. C., Erdemli, G., Petersen, O. H., & Tepikin, A. V. (2001). Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *The EMBO Journal*, *20*(8), 1863–1874. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.8.1863>
- Petersen, O. H. (2012). Specific mitochondrial functions in separate sub-cellular domains of pancreatic acinar cells. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *464*(1), 77–87. <http://doi.org/10.1007/s00424-012-1099-6>
- Pires, P. W., & Earley, S. (2016). No Static at All Tuning Into the Complexities of Ca²⁺

- Signaling in the Endothelium. *Circulation Research*, 118(7), 1042–1044.
<http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308519>
- Qi, H., Li, L., & Shuai, J. (2015). Optimal microdomain crosstalk between endoplasmic reticulum and mitochondria for Ca²⁺ oscillations. *Scientific Reports*, 5(1), 517.
<http://doi.org/10.1038/srep07984>
- Sandoval, R., Malik, A. B., Naqvi, T., Mehta, D., & Tirupathi, C. (2001). Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(2), L239–47.
- Sandow, S. L., Neylon, C. B., Chen, M. X., & Garland, C. J. (2006). Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (KCa) and connexins: possible relationship to vasodilator function? *Journal of Anatomy*, 209(5), 689–698. <http://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00647.x>
- Sonkusare, S. K., Bonev, A. D., Ledoux, J., Liedtke, W., Kotlikoff, M. I., Heppner, T. J., et al. (2012). Elementary Ca²⁺ Signals Through Endothelial TRPV4 Channels Regulate Vascular Function. *Science*, 336(6081), 597–601. <http://doi.org/10.1126/science.1216283>
- Sonkusare, S. K., Dalsgaard, T., Bonev, A. D., Hill-Eubanks, D. C., Kotlikoff, M. I., Scott, J. D., et al. (2014). AKAP150-dependent cooperative TRPV4 channel gating is central to endothelium-dependent vasodilation and is disrupted in hypertension. *Science Signaling*, 7(333), ra66–ra66. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2005052>
- Straub, S. V., Giovannucci, D. R., & Yule, D. I. (2000). Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *The Journal of General Physiology*, 116(4), 547–560.
- Sullivan, M. N., Gonzales, A. L., Pires, P. W., Bruhl, A., Leo, M. D., Li, W., et al. (2015). Localized TRPA1 channel Ca²⁺ signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. *Science Signaling*, 8(358), ra2–ra2. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2005659>
- Toussaint, F., Charbel, C., Blanchette, A., & Ledoux, J. (2015). CaMKII regulates intracellular Ca²⁺ dynamics in native endothelial cells. *Cell Calcium*, 58(3), 275–285. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.06.005>

- Tran, C. H. T., Taylor, M. S., Plane, F., NAGARAJA, S., Tsoukias, N. M., Solodushko, V., et al. (2012). Endothelial Ca²⁺ wavelets and the induction of myoendothelial feedback. *AJP: Cell Physiology*, 302(8), C1226–42. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00418.2011>
- Tu, H., Wang, Z., & Bezprozvanny, I. (2005). Modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms by calcium: a role of calcium sensor region. *Biophysj*, 88(2), 1056–1069. <http://doi.org/10.1529/biophysj.104.049601>
- Venema, R. C., Sayegh, H. S., Kent, J. D., & Harrison, D. G. (1996). Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(11), 6435–6440.

Figures legends

Fig.1 Ca²⁺ pulsar modulation by FCCP mitochondrial uncoupler

(A) Typical field of view of Fluo-4 loaded endothelium from a mouse mesenteric artery. Red crosses are Regions of interest (ROIs) identifying Ca²⁺ pulsars active sites in all conditions. Blue crosses are ROIs identifying new Ca²⁺ pulsar sites induced by FCCP application. Scale = 10 μ m. (B) Time course of a typical experiment where the tissue was exposed to FCCP (2 μ M) with presence of oligomycin A (1 μ g/ml). Each color represents an individual Ca²⁺ pulsar site as illustrated in A. Fluorescence was recorded for 45 seconds (control) prior exposure to FCCP for a total of a continuous 4 minutes recording. Bar graph of Ca²⁺ pulsar active sites (C), Ca²⁺ pulsar frequency per active site (D) or Ca²⁺ pulsar frequency per active site according to their activity status in control condition (Grey: control; FCCP (A), red: sites active prior exposure to FCCP, FCCP (N), blue: sites where activity was only detected following exposure to FCCP) (E) (N = 6). T-test (C, D), ANOVA (E): *p < 0.05, **p < 0.01, † p < 0.001, ‡ p < 0.0001.

Fig.2 Ca²⁺ pulsar spreading modulation by FCCP mitochondrial uncoupler

(A) Typical spreading of a Ca²⁺ pulsar in the absence (control; a) or presence of FCCP (b) Scale = 3 μ m. (B) Bar graph of Ca²⁺ pulsar spreading in the absence (black) or presence (white) of FCCP. (C) Bar graph where groups were defined according to their activity status in control condition (Grey: control; FCCP (A), red: sites active prior exposure to FCCP, FCCP (N), blue: sites where activity was only detected following exposure to FCCP) (N = 2; Control: n = 106, FCCP: n = 187). T-test (B), ANOVA (C): *p < 0.05, **p < 0.01, † p < 0.001, ‡ p < 0.0001.

Fig.3 Impact of mitochondrial calcium uniporter (mCU) inhibition on Ca²⁺ pulsar dynamics

(A) Bar graph of Ca²⁺ pulsar active sites population in the absence (black) or presence (white) of the mCU inhibitor, Ru360 (2 μ M; N = 4). (B) Bar graph of Ca²⁺ pulsar frequency per active sites in the absence (black) or presence (white) of Ru360 (N = 4). (C) Bar graph of Ca²⁺ pulsar spreading in the absence (black) or presence (white) of Ru360. (N = 3). (D) Bar graph of Ca²⁺ pulsar spreading in the absence (grey) or presence of Ru360 according to their activity status

in control condition (Ru360 (A), red: sites active prior exposure to Ru360, Ru360 (N), blue: sites where activity was only detected following exposure to Ru360) (N = 3; Control: n = 96, Ru360: n = 88). T-test (A, B, C), ANOVA (D): *p< 0.05, ‡ p< 0.0001.

Fig.4 Impact of mitochondrial calcium uniporter (mCU) stimulation on Ca²⁺ pulsar dynamics

(A) Bar graph of Ca²⁺ pulsar active sites population in the absence (black) or presence (white) of the mCU activator, kaempferol (kaempf; 10 μM; N = 6). (B) Bar graph of Ca²⁺ pulsar frequency per active sites in the absence (black) or presence (white) of kaempferol (N = 6). (C) Bar graph of Ca²⁺ pulsar frequency per active site according to their activity status in control condition (Grey: control; Kaempf. (A), red: sites active prior exposure to kaempferol, Kaempf. (N), blue: sites where activity was only detected following exposure to kaempferol) (N = 6). (D) Bar graph of Ca²⁺ pulsar spreading in the absence (black) or presence (white) of kaempferol. (N = 2). (E) Bar graph of Ca²⁺ pulsar spreading in the absence (grey) or presence of Ru360 according to their activity status in control condition (Kaempf. (A), red: sites active prior exposure to kaempferol, Kaempf. (N), blue: sites where activity was only detected following exposure to kaempferol) (N = 2; Control: n = 58, Kaempf: n = 443). T-test (A, B, D), ANOVA (C, E): *p< 0.05, *** p< 0.005, ‡ p< 0.0001.

Fig.5 Impact of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) on Ca²⁺ pulsar dynamics

(A) Bar graph of Ca²⁺ pulsar active sites population in the absence (black) or presence (white) of the mPTP inhibitor, cyclosporine A (CsA 1 μM; N = 4). (B) Bar graph of Ca²⁺ pulsar frequency per active sites in the absence (black) or presence (white) of CsA (N = 3). (C) Bar graph of Ca²⁺ pulsar frequency per active site according to their activity status in control condition (Grey: control; CsA (A), red: sites active prior exposure to CsA, CsA (N), blue: sites where activity was only detected following exposure to CsA) (N = 3). (D) Bar graph of Ca²⁺ pulsar spreading in the absence (black) or presence (white) of CsA. (N = 2; Control: n = 42, CsA: n = 82). T-test (A, B, D), ANOVA (C): * p< 0.05, ** p< 0.01, *** p< 0.005.

Fig.6 Impact of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) on Ca²⁺ pulsar dynamics.

(A) Bar graph of Ca²⁺ pulsar active sites population in the absence (black) or presence (white) of the NCX inhibitor, CGP37157 (CGP; 10 μM; N = 5). (B) Bar graph of Ca²⁺ pulsar frequency per active sites in the absence (black) or presence (white) of CGP37157 (N = 5). (C) Bar graph of Ca²⁺ pulsar frequency per active site according to their activity status in control condition (Grey: control; CGP (A), red: sites active prior exposure to CGP37157, CGP (N), blue: sites where activity was only detected following exposure to CGP37157) (N = 5). (D) Bar graph of Ca²⁺ pulsar spreading in the absence (black) or presence (white) of CGP. (N = 2; Control: n = 67, CGP: n = 339). T-test (A, B, D), ANOVA (C): *p < 0.05, ** p < 0.01.

Fig.7 Electronic microscopy of mouse mesenteric arteries

(A, Left panel) Typical view of an endothelial cell (scale: 2 μm) with a myoendothelial projection (MEP, within red square). (A, Right panel) Magnification of the MEP from the left (scale: 200 nm). (B) Peri MEP areas delimited in order to quantify subcellular mitochondrial distribution (area I: < 100 nm from the beginning of MEP; area II: between 100 and 300 nm and area III between 300 to 600 nm). EC, endothelial cell; SMC, smooth muscle cell; IEL, internal elastic lamina; MEP, myoendothelial projection; N, nucleus; M, mitochondrion. (C) Pie charts showing mitochondrial distribution in the cell according to the peri MEP areas defined in B (n = 7).

Fig. Suppl. 1 Mitochondrial membrane potential alteration by FCCP uncoupler.

(A) Typical field of view of tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE) loaded endothelium from mouse mesenteric artery before (a) and after (b) FCCP (2 μM + oligomycin A 1 μg/ml) application. Scale = 10 μm. (B) Time course of TMRE fluorescence variation in presence of FCCP (2 μM + oligomycin A 1 μg/ml; red) or only with the laser (control; black). Each time point represents the mean value of fluorescence (F/F_0) for all Regions of interest (ROIs) of the specific condition. (FCCP: N=5, n=52; Control: N=3, n=39). Two-way ANOVA, *p < 0.05; **p < 0.01; † p < 0.001 compare to the same time point in control condition.

Fig. Suppl. 2. Analysis of eccentricity and anisotropy of Ca^{2+} pulsar spreading in the absence and presence of FCCP.

(A) Typical field of view with a spontaneous Ca^{2+} pulsar illustrated as F/F_0 . (B) Binary mask of the calcium dispersion from the Ca^{2+} pulsar illustrated in A. (C) Bar graph illustrating mean eccentricity of Ca^{2+} pulsar spread calculated from binary masks in the absence (black, $n = 99$) and presence of FCCP (grey, $n = 169$). (D) Bar graph reporting mean anisotropy of Ca^{2+} dispersion from Ca^{2+} pulsars estimated from binary masks as in B in the absence (black, $n = 99$) and presence of FCCP (grey, $n = 169$). T-test (C, D)

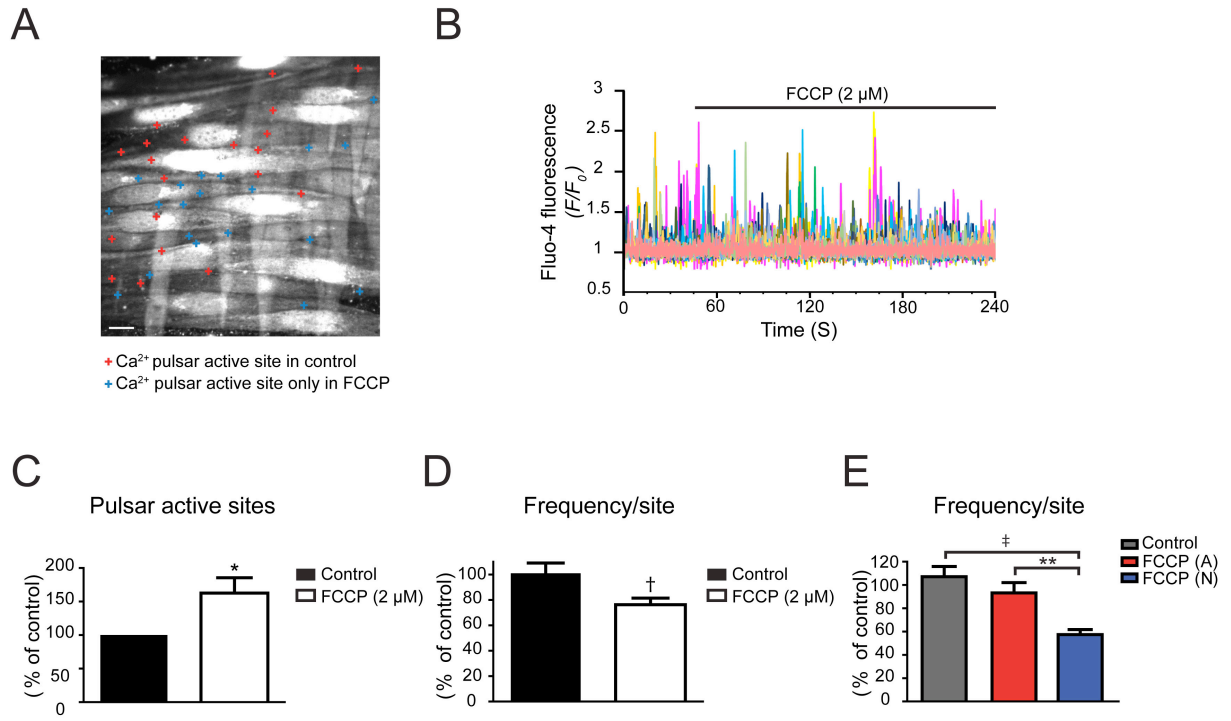


Figure 1

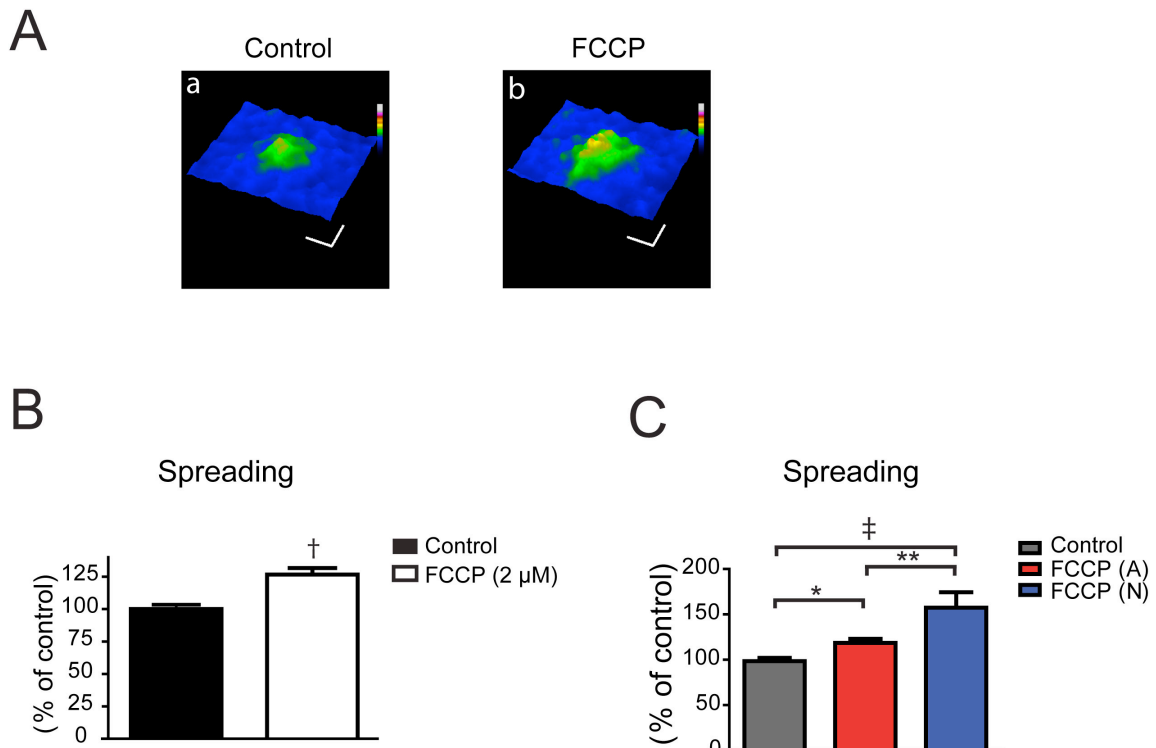


Figure 2

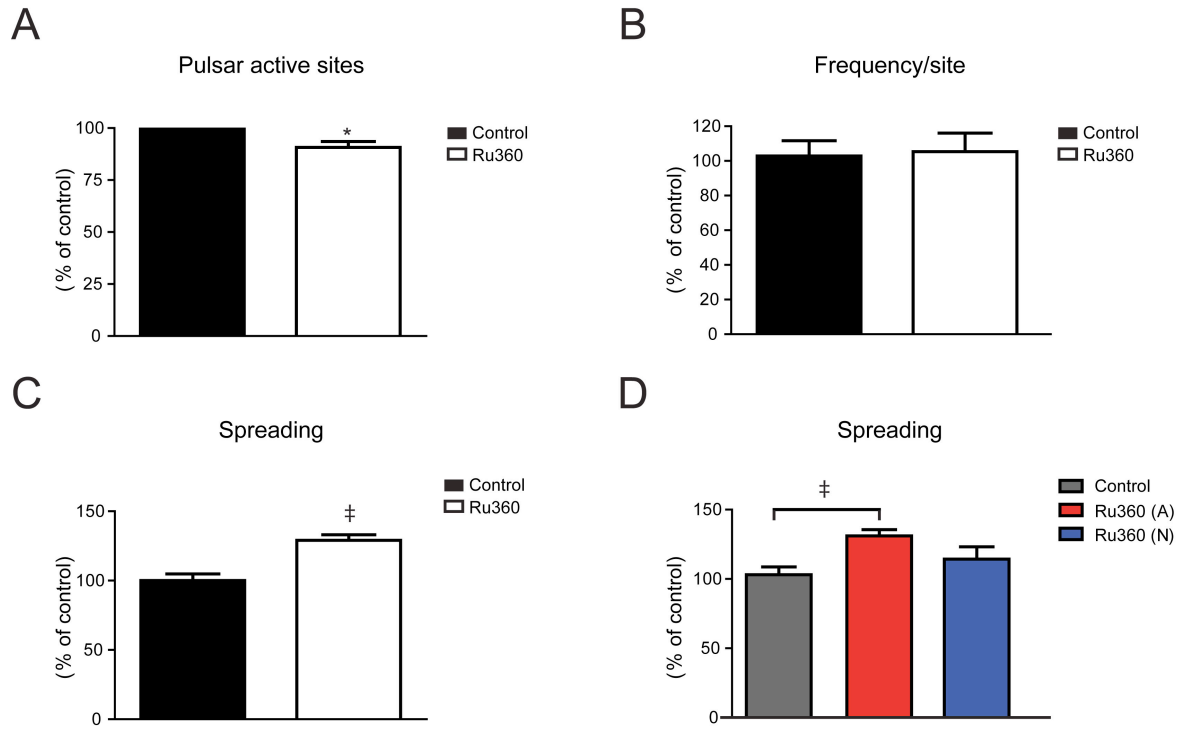
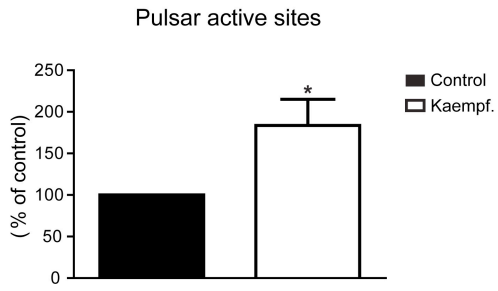
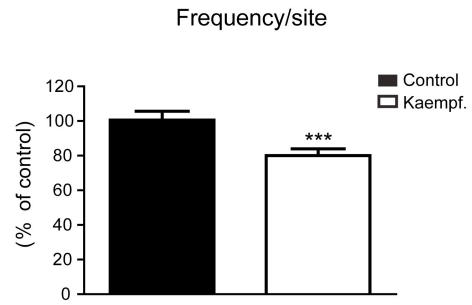


Figure 3

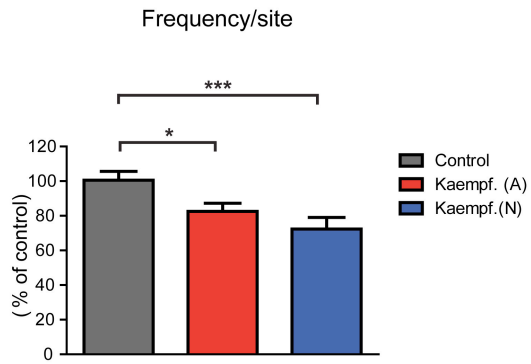
A



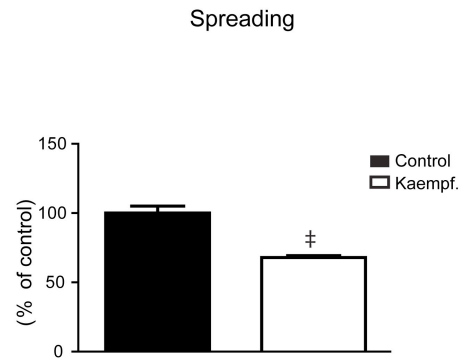
B



C



D



E

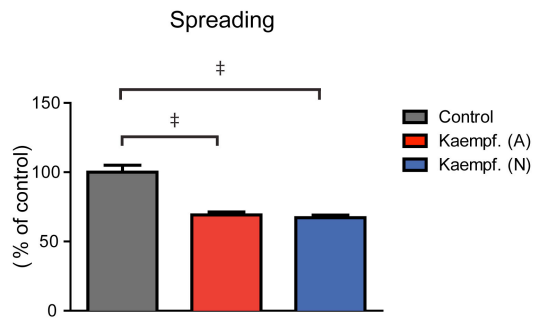


Figure 4

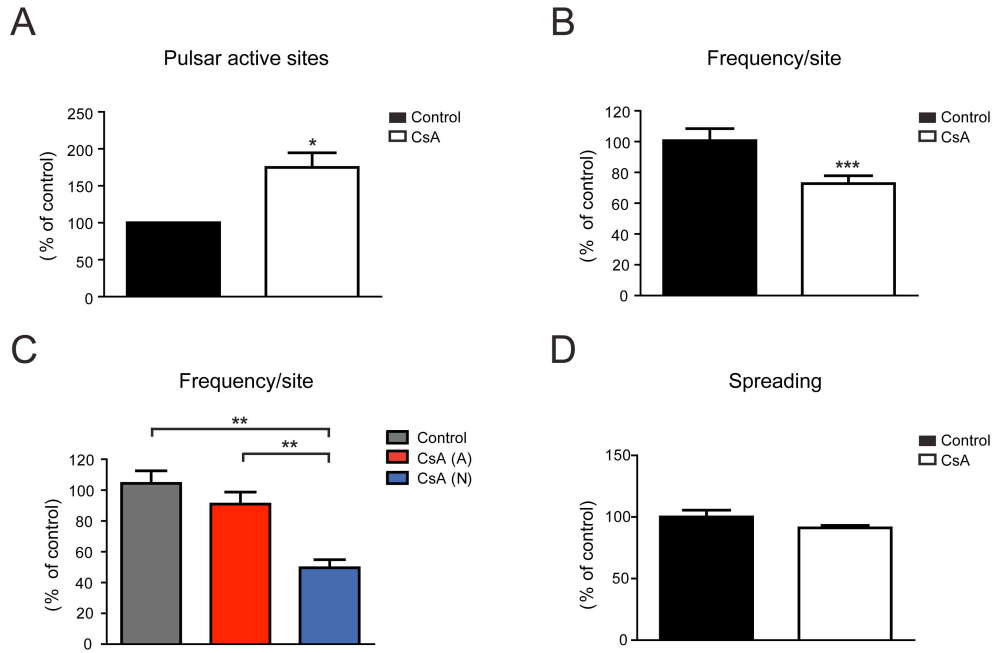


Figure 5

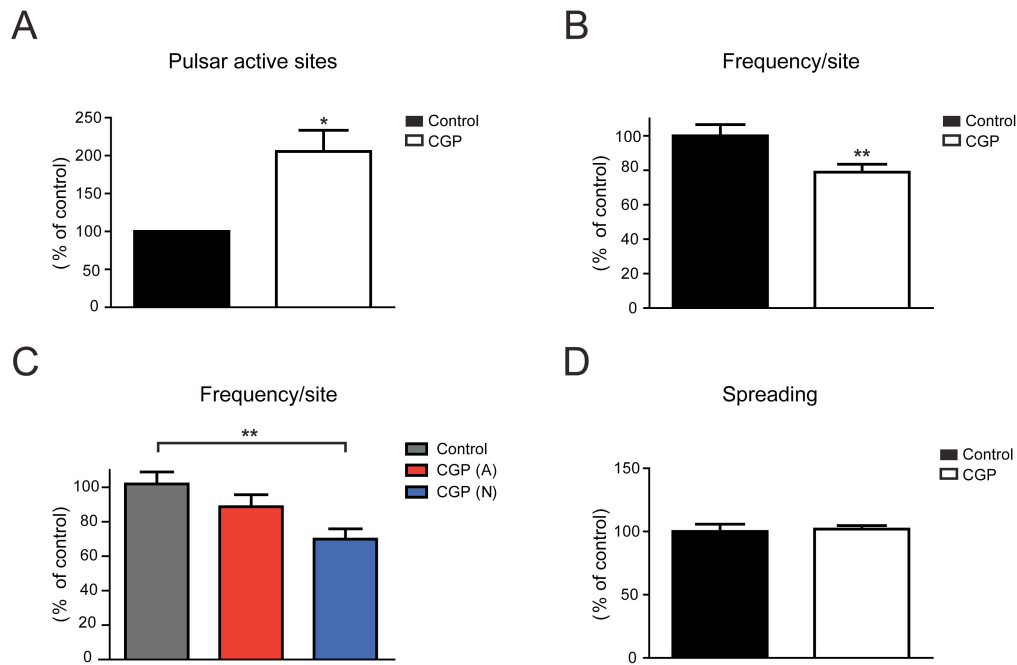
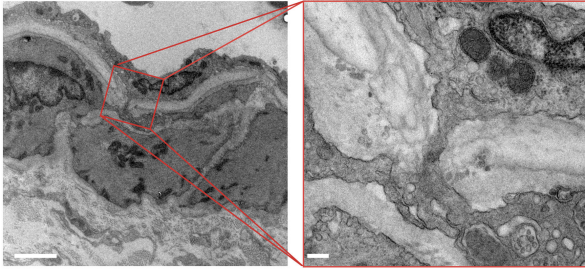
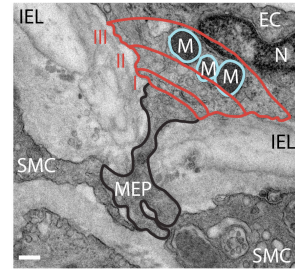


Figure 6

A



B



C

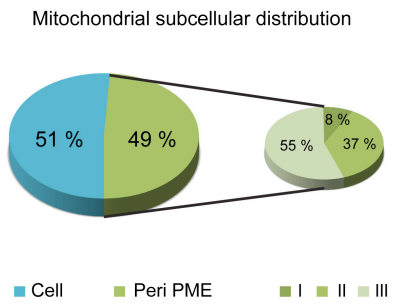
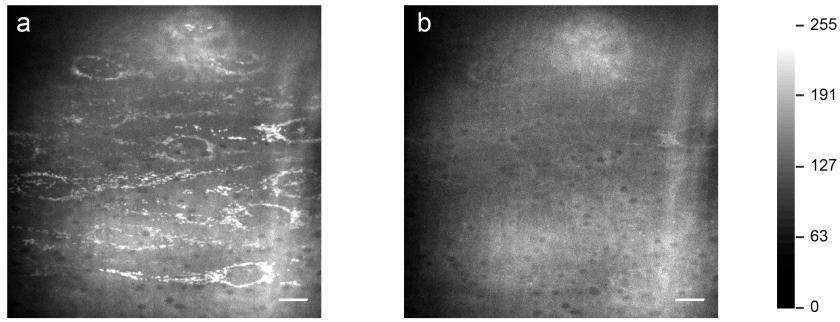
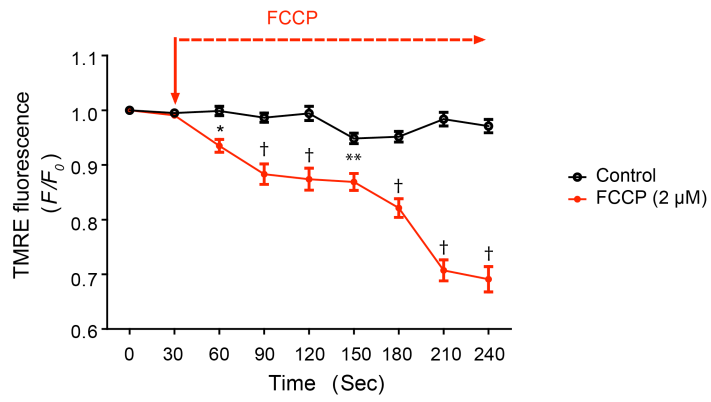


Figure 7

A

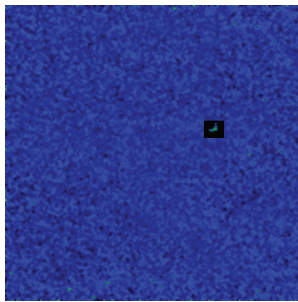


B

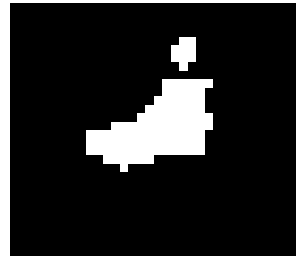


Suppl. 1

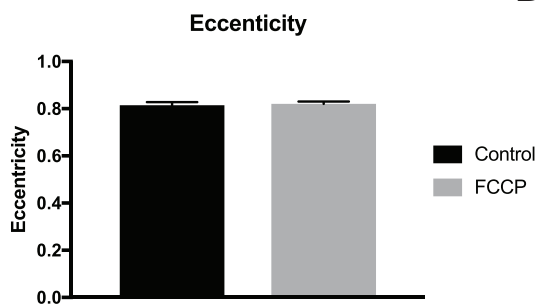
A



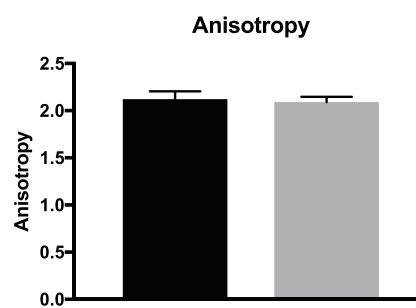
B



C



D



Suppl. 2

4. Discussion

4.1 Sommaire du fondement de la thèse

La PME constitue le seul site de contact entre les CEs et les CMLs de la paroi artérielle et elle est considérée comme étant un lieu de communication intime permettant un transfert de signaux efficace dans cette région précise. D'ailleurs, plusieurs composantes de l'EDHF sont concentrées dans la PME ce qui permet d'établir une corrélation entre l'importance de l'EDHF et l'incidence des PME dans les artères de résistances. L'EDHF inclut les canaux K_{Ca} qui sont présents à la membrane plasmique de la PME [196-198]. Ainsi, les signaux calciques présents dans la PME ont la capacité de moduler l'activité des canaux K_{Ca} influençant ainsi le potentiel membranaire endothéliale et par conséquent l'état contractile des CMLs.

Les pulsars calciques ont initialement été décrits en 2008 par Ledoux *et al.*, [197] comme étant une libération « spontanée » et oscillatoire de Ca^{2+} restreinte à la PME provenant des IP_3Rs et possédant la capacité de moduler le potentiel membranaire endothéliale *via* l'activation des canaux K_{Ca} . Il est maintenant largement accepté qu'il existe un couplage fonctionnel entre (1) l'augmentation de Ca^{2+} dans les PME, (2) l'activation des canaux K_{Ca} et (3) la relaxation subséquente des CMLs sous-jacentes [197, 198, 276, 391]. Bien que l'effet fonctionnel de l'activation des K_{Ca} par les pulsars calciques soit largement décrit dans la littérature, peu d'informations sont disponibles concernant les mécanismes qui modulent les caractéristiques des pulsars calciques.

Ainsi, le but premier de cette thèse était d'identifier physiologiquement des mécanismes pouvant être impliqués dans la régulation des pulsars calciques et pouvant avoir un impact significatif sur la fonction vasculaire.

4.2 Sommaire des nouvelles découvertes

Dans la première étude, nous avons ciblé une kinase, CaMKII, comme mécanisme régulateur potentiel des pulsars calciques. Nous avons tout d'abord rapporté que les 2 isoformes de CaMKII localisées dans la PME (CaMKII α et CaMKII β) présentent le potentiel

de s'hétéromériser par la technique d'hybridation *in situ* PLA. Nous avons également démontré que CaMKII contrôle le niveau d'activité des pulsars calciques, et ce, de façon basale. L'utilisation d'un inhibiteur de CaMKII (KN-93) engendre une augmentation de l'activité des pulsars calciques telle que rapportée par une augmentation importante du nombre de sites actifs de pulsars (sites actifs : correspond à une fenestration dans la LEI qui présente au moins une oscillation calcique au cours de la période d'enregistrement). Cette augmentation de nombre de sites actifs, sans présence d'une modification de la fréquence de chaque site individuel, s'exprime par une augmentation du taux d'activité globale au sein d'un champ optique d'acquisition. Ce résultat suggère donc que CaMKII peut agir comme un interrupteur en maintenant certains sites dans un état d'inactivité. Les cibles potentielles de CaMKII au niveau du RE ont été étudiées à l'aide d'un protocole expérimental permettant d'évaluer le contenu en Ca^{2+} du RE dans diverses conditions. Ceci nous a permis de mettre en évidence (1) que CaMKII peut avoir un effet important sur le contenu en Ca^{2+} du RE et (2) que cet effet est médié par la relation CaMKII-IP₃R. Finalement, nous avons démontré que les pulsars calciques résultent d'une libération de Ca^{2+} des IP₃R1s et IP₃R2s puisque le marquage d'IP₃R3s est complètement absent des fenestrations de la LEI. Nous suggérons ainsi que CaMKII, suite à son activation par les pulsars calciques, se retrouve dans une boucle de rétroaction négative en régulant sa propre voie d'activation *via* les IP₃Rs.

Dans la deuxième étude, nous avons concentré notre intérêt sur un organite qui présentait un fort potentiel de régulation des pulsars calciques, soit la mitochondrie. Nous avons rapporté dans cette étude la présence d'une forte concentration de mitochondries endothéliales à l'embouchure des PME (*i.e* jusqu'à 600 nm de l'ouverture de la PME considérée à partir de la bordure de la fenestration de la LEI). Ceci positionne les mitochondries à un endroit de prédilection pour contrôler le Ca^{2+} dans ce microenvironnement que génère la PME. Plusieurs caractéristiques des pulsars calciques sont modifiées lors d'une altération de la $\Delta\psi_m$ suggérant que la mitochondrie est primordiale pour la détermination des caractéristiques des pulsars calciques en condition physiologique. La régulation par la mitochondrie est multifactorielle. Nous avons démontré que l'entrée de Ca^{2+} mitochondriale limite la propagation du pulsar calcique, alors que les mécanismes de sorties de Ca^{2+} de la mitochondrie modulent le niveau d'activité des pulsars (nombre de sites actifs de pulsars et la

fréquence de l'activité à chaque site). Considérant leurs rôles multifactoriels dans le contrôle des pulsars calciques, nous suggérons que les mitochondries sont importantes dans la fonction endothéliale.

Ces deux études ont été effectuées sans stimulation pharmacologique des pulsars calciques. La régulation par CaMKII et la mitochondrie des pulsars calciques serait donc présente de façon basale signifiant que ces mécanismes contrôlent physiologiquement les pulsars calciques.

4.3 CaMKII en hétéromultimère : favoriser une localisation optimale de l'enzyme

La localisation de l'enzyme par rapport à l'effecteur permet de favoriser une transmission de signal efficace. Le positionnement de CaMKII par rapport aux pulsars calciques est donc une information déterminante pour établir la relation entre ces deux partenaires potentiels. Par ailleurs, la littérature démontre que la localisation de CaMKII est influencée par la composition de chaque unité fonctionnelle [413, 418]. La présence de CaMKII α et CaMKII β a été notée dans les fenestrations de la LEI suggérant la présence de ces deux isoformes dans la PME. Les isoformes α et β sont toutes deux recrutées au niveau de la PME suite à une stimulation des pulsars calciques par la PE [527] malgré que seul l'isoforme β possède un domaine de liaison au cytosquelette (F-actine) [417, 418]. Ce mécanisme suggère que CaMKII α pourrait être transloquée à la PME suite à la stimulation des pulsars calciques grâce à son hétéromérisation avec CaMKII β .

Considérant la colocalisation de ces deux isoformes dans notre modèle d'étude, nous avons évalué la présence d'hétéromultimère de CaMKII α et CaMKII β dans l'endothélium natif d'artères mésentériques de souris (Figure 2, étude 1). Pour ce faire, nous avons tiré profit d'une technique de laboratoire novatrice disponible commercialement (hybridation *in situ* PLA; *proximity ligation assay*, Duolink[®]) qui offre l'avantage de détecter un signal fluorescent uniquement lors d'une proximité de <40 nm entre deux protéines cibles. Cette technique est utilisée afin d'établir une colocalisation, la présence de complexe protéique ou l'hétéromérisation. Nous avons ainsi été en mesure d'obtenir un signal positif au sein de

l'endothélium natif entre CaMKII α et CaMKII β suggérant la présence d'hétéromultimères dans notre préparation (Figure 3, étude 1). Notons que selon nos connaissances, ceci constitue la première évidence suggérant une hétéromérisation entre ces deux isoformes hors du système neuronal [412].

Il est donc possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle la translocation de CaMKII α à la PME suite à la stimulation des pulsars calciques [527] résulte d'une hétéromérisation entre l'isoformes α et β . Ce recrutement de CaMKII α/β dans la PME offre donc une localisation de choix à l'enzyme par rapport à sa source d'activation (*i.e* les pulsars calciques), mais également par rapport aux cibles qu'elle peut réguler dans cette structure telles que NOS-3. Afin d'évaluer plus spécifiquement cette hypothèse, des manipulations de biologie moléculaire permettant la suppression de CaMKII α , CaMKII β ou supprimant le domaine de liaison à la F-actine de CaMKII β seraient nécessaires pour mettre en évidence l'importance de l'hétéromérisation pour la fonction de CaMKII dans la PME. Certaines études effectuées par le groupe de Brant E. Isakson ont suggéré qu'il est possible de maintenir « en culture » les artères *ex vivo* pour transfecter/infecter des constructions moléculaires [683, 684]. Cependant, le processus de culture d'artères *ex vivo* peut altérer significativement les mécanismes étudiés puisqu'il ne permet pas de combler les besoins individuels de chaque type cellulaire inclus dans la paroi vasculaire. Nous préférons donc exclure cette possibilité. Il n'y a pas présentement de modèles transgéniques animaux présentant une délétion pour un de ces gènes dans notre tissu d'intérêt (ou de façon globale dans l'animale).

La technique du Duolink offre l'avantage considérable d'obtenir un signal fluorescent uniquement en condition de proximité entre les 2 cibles d'intérêts. Par contre, elle possède certaines limites telles que la difficulté à relier le signal fluorescent à une localisation cellulaire très précise. Brièvement, la sonde fluorescente de la trousse Duolink reconnaît le produit d'amplification (s'apparentant à un produit de PCR) de la boucle de nucléotides créée par l'hybridation des queues d'oligonucléotides reliées aux anticorps secondaires qui sont complémentaires. Ainsi, la localisation ou la forme du signal fluorescent peut être légèrement déviée de la localisation initiale puisqu'elle correspond au produit d'amplification de la réaction moléculaire. L'impossibilité de relier la localisation des hétéromultimères avec les fenestrations de la LEI qui est autofluorescente constitue une limite de l'étude, bien que cette

limite n'affecte pas les conclusions obtenues en termes d'hétéromultimérisation suggérées par la technique de Duolink. Notons que les contrôles appropriés, notamment l'utilisation d'anticorps primaires dirigés contre des protéines n'ayant aucune interaction, ont été réalisés (contrôle négatif; Figure 3, étude 1). Lors de leur acquisition, les paramètres du microscope utilisé étaient identiques aux autres combinaisons testées avec cette technique dans le cadre de l'étude 1.

4.4 CaMKII constitue un régulateur des pulsars calciques *via* les IP₃Rs

Considérant que les pulsars résultent de la libération du Ca²⁺ dans le RE, leurs dynamiques peuvent être gouvernées par 2 composantes majeures : le niveau d'activité du canal responsable de la libération du Ca²⁺, soit les IP₃Rs, et la dynamique de recapture du Ca²⁺ par les pompes SERCA qui peuvent ainsi fournir le Ca²⁺ disponible pour les pulsars calciques. CaMKII a la capacité de moduler ces 2 composantes. En effet, la phosphorylation de l'IP₃R2 par CaMKII réduit d'environ 11 fois sa probabilité d'ouverture [495, 500]. CaMKII a donc un effet inhibiteur sur les IP₃Rs en limitant la libération de Ca²⁺ par ce canal. Par ailleurs, la phosphorylation du PLB, la protéine régulatrice de cette pompe [491], ou de SERCA directement [493] favorise la recapture de Ca²⁺ vers le RE. Une accélération de la recapture du Ca²⁺ cytosolique pourrait avoir un effet stimulateur sur les pulsars soit (1) en déplaçant la concentration de Ca²⁺ libre cytosolique dans les gammes stimulant les IP₃Rs ou soit (2) en augmentant le Ca²⁺ dans le RE ce qui peut avoir 2 effets : favoriser les pulsars par une augmentation de la fuite de Ca²⁺ résultant en du CICR ou par une modification de la sensibilité de l'IP₃R tel qu'exposé dans la section 1.3.1.1.1. L'altération de la relation CaMKII-IP₃R ou CaMKII-SERCA aurait donc des effets distincts sur les pulsars calciques.

L'étude 1 avait pour but d'évaluer le rôle de CaMKII dans l'établissement des paramètres de base des pulsars calciques. Nous avons ainsi opté pour une évaluation du rôle de CaMKII *via* une inhibition de celle-ci en condition basale (*i.e* en absence de stimulation pharmacologique des pulsars calciques). Lors de cette étude, des artères mésentériques de souris transgéniques qui exprimaient constitutivement la sonde calcique GCaMP2 sous le promoteur de la Cx40 (Cx40(BAC)-GCaMP2) ont été utilisées [685]. Ceci permet d'obtenir

un signal fluorescent relatif au Ca^{2+} uniquement dans l'endothélium sans contamination de signal fluorescent provenant des CMLs sous-jacentes. Par microscopie confocale à haute vitesse, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de CaMKII par le KN-93 sur les dynamiques des pulsars calciques. Nous avons opté pour le KN-93 comme outil pharmacologique puisqu'il est l'inhibiteur le plus communément utilisé pour inhiber CaMKII. La concentration de $10\ \mu\text{M}$ permet dans notre préparation d'éliminer le marquage de CaMKII phosphorylée en T286 (indicateur de l'état d'activation de CaMKII) tel qu'observé par immunofluorescence (Figure 1, étude 1). Notons que les cibles secondaires du KN-93 identifiées jusqu'à présent dans la littérature (section 1.4.2.3) et qui constitue une limite importante à son utilisation dans certains types cellulaires ne sont pas présentes dans les CEs, bien qu'il soit impossible d'éliminer toutes possibilités d'effets non-spécifiques. Lors de l'étude des dynamiques des pulsars calciques, l'inhibition de CaMKII ne modifie pas le niveau d'activité à chaque site de pulsar individuel (en termes de fréquence), mais influence plutôt le nombre de sites présentant des pulsars de façon similaire à un interrupteur. En effet, il a été observé que l'inhibition de CaMKII engendre un recrutement de sites actifs de pulsars, une condition exacerbée lors d'une exposition prolongée au KN-93 (Figure 4, étude 1). Cette augmentation du nombre de sites qui présentent une fréquence fixe entre les conditions expérimentales se répercute par une augmentation de la fréquence totale de l'activité calcique au travers du champ optique d'acquisition. Ceci suggère qu'un plus grand nombre de PME peuvent présenter une activation des mécanismes dépendants du Ca^{2+} dans une condition où CaMKII est complètement inactivée. Ainsi, CaMKII pourrait être un élément primordial pour coordonner la vasomotion nécessitant une balance d'activation/inhibition des mécanismes modulant l'état contractile du muscle lisse présents dans la PME tels que les K_{Ca} . La vasomotion est la variation cyclique du diamètre des artérioles [686]. Une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire endothéliale telle que celle produite par les pulsars calciques pourrait activer les voies de signalisation favorisant la relaxation des CMLs menant à une légère vasodilatation. Simultanément, les pulsars calciques augmentent au fil des oscillations l'activité de CaMKII qui inhibe subséquemment les IP_3Rs permettant un retour à l'état partiellement contracté initiale et donc au début du cycle.

Bien que l'étude des dynamiques des pulsars calciques nous ait permis de démontrer que CaMKII module l'état actif/inactif des sites de pulsar, il était nécessaire de raffiner notre

compréhension du mécanisme sous-jacent en déterminant la cible d'action de CaMKII au sein de l'endothélium natif. Pour ce faire, nous avons conçu un protocole expérimental qui permet de comparer le contenu en Ca^{2+} du RE dans diverses conditions à l'aide de la sonde calcique Fluo-4. Avec ce protocole, nous avons initialement démontré que l'inhibition de CaMKII engendre une chute drastique du contenu en Ca^{2+} du RE lorsque ce dernier est libéré par l'ajout d'un ionophore calcique (*i.e* ionomycine) en absence de Ca^{2+} extracellulaire (*i.e* pour éliminer une augmentation de la fluorescence due à une entrée de Ca^{2+} induite par l'ionophore). L'obtention de ce résultat met tout d'abord en évidence le fait que CaMKII est un élément primordial pour le maintien en Ca^{2+} du RE. En modifiant légèrement ce protocole, il est possible de déterminer sur quelle cible CaMKII agit au niveau du RE. La prémisse derrière ce protocole modifié est la suivante : CaMKII peut directement influencer le contenu en Ca^{2+} du RE *via* 2 voies : (1) les IP_3Rs ou (2) le complexe SERCA/PLB. Ces deux possibilités ont été évaluées en isolant individuellement l'effet de CaMKII sur chacune d'entre elles. Pour ce faire, on s'assure que CaMKII ne puisse moduler qu'une seule voie à la fois en inhibant pharmacologiquement la deuxième voie potentielle. Ainsi, si une différence est observée au niveau du contenu en Ca^{2+} du RE entre la condition où CaMKII est fonctionnelle et où CaMKII est inhibée, ceci signifie que CaMKII peut réguler le contenu en Ca^{2+} du RE *via* le mécanisme n'ayant pas été volontairement inhibé par un agent pharmacologique lors de ce protocole expérimental. Plus précisément, dans la possibilité où CaMKII régulerait négativement les IP_3Rs , en condition d'inhibition de SERCA, on pourrait s'attendre à percevoir une réduction du contenu en Ca^{2+} du RE lorsque CaMKII est inhibée par rapport à la condition contrôle. L'inhibition de CaMKII engendrerait un recrutement de sites actifs de pulsars ce qui engendrerait une déplétion plus rapide du RE en Ca^{2+} dans cette condition comparativement à la condition contrôle où CaMKII est fonctionnelle. Inversement, dans le cas où CaMKII stimulerait plutôt la recapture de Ca^{2+} par la pompe SERCA, en condition d'inhibition des IP_3Rs , on pourrait s'attendre à un contenu en Ca^{2+} du RE diminué en présence d'une inhibition de CaMKII. L'inhibition de CaMKII réduirait la vitesse de recapture de la pompe se traduisant par un contenu en Ca^{2+} du RE plus faible comparativement à la condition contrôle où CaMKII est fonctionnelle.

D'après les résultats obtenus, CaMKII agit au niveau du RE uniquement *via* la voie des IP₃R puisque qu'aucune différence au niveau du contenu en Ca²⁺ du RE n'est perceptible lors des expériences évaluant le rôle de CaMKII sur les SERCA. Comparativement, une réduction importante du contenu du RE est observée lors du protocole évaluant le rôle de CaMKII sur les IP₃Rs, une différence qui s'apparente fortement à la condition de base où uniquement CaMKII est inhibée sans agir sur aucune cible potentielle (Figure 6, étude 1). Ces résultats suggèrent que CaMKII régule le nombre de sites actifs de pulsars tel un interrupteur *via* son action sur les IP₃Rs. CaMKII est un élément déterminant dans le maintien du contenu du RE en Ca²⁺ puisque l'inhibition de CaMKII engendre une chute drastique de la quantité de Ca²⁺ du RE.

Peu d'études concernant le rôle de CaMKII dans les dynamiques calciques endothéliales ont été publiées. Toutefois, des études effectuées par *Aromolaran et al.*, [377, 536] suggèrent que CaMKII contrôle les dynamiques calciques intracellulaires *via* la voie des IP₃R. *Aromolaran et al.*, [377, 536] ont démontré que l'application de KN-93 sur des BAECs en culture et ce, sans aucune stimulation supplémentaire, génère à lui seul un signal calcique intracellulaire transitoire. Ce signal est considérablement affecté lors de l'ajout d'un inhibiteur des IP₃Rs (2-APB). En concordance avec les résultats de la présente étude, des résultats suggèrent que CaMKII peut réguler les IP₃Rs endothéliaux. Il est tout de même important de noter qu'au niveau technique, les variations intracellulaires de Ca²⁺ induites par l'ajout de KN-93 lors des études d'*Aromolaran et al.*, [377, 536] ont été évaluées sous un aspect global au sein de la cellule en culture. Il était ainsi impossible de relier CaMKII à une dynamique intracellulaire précise et locale qui survient de façon basale telle que nous l'avons fait lors de notre première étude.

Nos études précédentes ont permis d'évaluer le niveau d'activation de CaMKII dans la PME dans la pathologie d'HA [527]. Cette condition pathologique a été privilégiée puisque les voies de signalisation étudiées ont un impact sur la régulation du tonus vasculaire. Une augmentation de la forme active de CaMKII au niveau des fenestrations de la LEI de souris hypertendues a été notée. De prime abord, si l'on intègre à cette information nos résultats récents, il est attendu qu'une activation de CaMKII mène à une réduction des pulsars calciques puisque CaMKII présente un effet inhibiteur sur les pulsars calciques. Toutefois, une

augmentation des pulsars calciques a été mesurée dans le modèle pathologique. Bien que cela n'a pas été évalué dans le cadre de cette thèse, ces résultats suggèrent fortement que la boucle de rétroaction CaMKII-pulsars est altérée en HA. Cette altération serait favorable pour l'organisme en HA puisque la perte de cette rétroaction permet une augmentation de l'activation des mécanismes dans la PME dépendants du Ca^{2+} qui induisent la relaxation des CML.

Ainsi, la capacité de CaMKII à réguler une signalisation calcique oscillatoire au sein de l'endothélium natif constitue un des aspects novateurs de cette thèse. De plus, considérant que les travaux précédents du laboratoire ont démontré que CaMKII est activée par cette signalisation calcique, les nouveaux résultats suggèrent fortement que CaMKII fait partie d'une boucle de rétroaction négative afin de contrôler sa propre voie d'activation. Il est tout de même important de souligner que puisque CaMKII est activée par le Ca^{2+} , elle pourrait également être activée dans la PME par les autres voies de signalisation calciques ayant également été identifiées dans cette structure comme l'entrée de Ca^{2+} *via* les TRPV4 [391]. Cette voie pourrait être intéressante à étudier en pathologie puisqu'une altération des *TRPV4 sparklets* a été notée en HA pulmonaire [393], bien qu'il soit possible de se questionner sur l'aptitude de signaux calciques avec une aussi faible amplitude à activer CaMKII.

4.5 Les pulsars calciques découlent des isoformes d'IP₃R associés aux signaux calciques oscillatoires

Les pulsars calciques ont été décrits comme étant une signalisation calcique résultant des IP₃Rs [197]. Les IP₃Rs sont exprimés sous 3 différentes isoformes qui ont été associées à différents types de patron de signal calcique dû à leurs différentes propriétés pharmacologiques [298]. Par exemple, des cellules lymphoblastiques exprimant uniquement IP₃R2 présentent des oscillations calciques maintenues suite à une stimulation des voies de signalisation activant la production d'IP₃ [283]. Il a d'ailleurs été suggéré qu'au niveau des myocytes vasculaires, la présence de l'IP₃R2 est essentielle pour la présence d'oscillations calciques induites par l'ACh [687]. Ainsi, il est tentant d'imaginer que les pulsars calciques peuvent résulter d'une libération de Ca^{2+} provenant des IP₃R2s, d'autant plus que cette isoforme constitue l'isoforme dont la régulation par CaMKII a été démontrée [495]. Cet aspect

a donc été évalué lors de notre étude par immunofluorescence afin de raffiner la caractérisation des pulsars calciques endothéliaux d'artères mésentériques de souris. Nous avons détecté la présence de l'IP₃R1 et l'IP₃R2 au sein des fenestrations de la LEI. Pour sa part, l'IP₃R3 semble complètement exclu de cette structure étant plutôt détectée en périphérie des fenestrations. Il est important de noter que les 3 types d'IP₃R présentent une distribution homogène dans le reste du cytoplasme (Figure 8, étude 1). Il pourrait être suggéré que la présence de l'IP₃R3 à la sortie de la PME favorise l'arrêt de la propagation du signal oscillatoire. Cette hypothèse repose sur les différences de sensibilité à l'IP₃ et au Ca²⁺ des diverses isoformes [2, 282]. La propagation du signal calcique par les IP₃Rs repose sur la capacité du Ca²⁺ libéré par un IP₃R à stimuler la libération de Ca²⁺ du IP₃R adjacent. Pour une même condition donnée qui favoriserait l'ouverture d'IP₃R1 et l'IP₃R2 et donc la libération de Ca²⁺ dans la PME, l'IP₃R3 serait dans une condition moins favorable au maintien de son ouverture puisqu'il est rapidement inhibé par le Ca²⁺. Ainsi, lorsque le mécanisme de CICR qui origine de la PME atteint l'embouchure de la PME, la présence de l'IP₃R3 localisé en périphérie pourrait limiter la capacité du Ca²⁺ à induire la libération de Ca²⁺ ce qui favoriserait l'arrêt de la réaction en chaîne de libération de Ca²⁺ et la limitation de la dispersion du signal calcique. En d'autres mots, la distribution des IP₃Rs est un facteur à considérer dans l'établissement des caractéristiques oscillatoires et restrictives des pulsars calciques dans cette structure anatomique puisque ceux-ci peuvent façonner le patron des dynamiques calciques. Toutefois, pour les raisons énoncées en section 4.3 concernant la manipulation de l'expression protéique dans notre modèle d'étude, il a été impossible d'évaluer l'effet de chaque isoforme distincte sur la dynamique des pulsars calciques. Une étude de colocalisation utilisant la technique Duolink a permis d'évaluer la relation entre CaMKII et les différentes isoformes des IP₃Rs dans notre préparation expérimentale. Un signal positif a été observé pour l'ensemble des combinaisons entre CaMKII α et les 3 isoformes d'IP₃R (Figure 7, étude 1). Selon les données de la littérature, une relation préférentielle entre CaMKII et l'IP₃R2 était attendue [500]. Sa proximité avec les IP₃R1 ou IP₃R3 pourrait suggérer qu'elle est sensible aux Ca²⁺ libéré par l'ensemble des isoformes ou qu'elle est associée à une régulation de ces autres isoformes dans d'autres contextes cellulaires, bien qu'uniquement les pulsars calciques semblent modifiés lorsque CaMKII est inhibée (donnée non-présentée dans l'étude 1).

Une caractérisation partielle des IP₃Rs exprimés dans l'endothélium natif avait été effectuée au niveau des artères du muscle crémaster de hamster [276]. C'est également dans ce modèle qu'ont été caractérisés les Ca^{2+} *wavelets*, une signalisation calcique fortement similaire aux pulsars calciques. Les auteurs ont évalué la localisation d'IP₃R1 et IP₃R2 dans leur préparation. Ils ont démontré que l'isoforme 1 des IP₃Rs est observée entre les deux types cellulaires de la paroi vasculaire (*i.e* à l'intérieur de la portion correspondant à la LEI). Ce patron est beaucoup plus fréquemment observé pour l'isoforme 1 que l'isoforme 2 de l'IP₃R suggérant ainsi que les Ca^{2+} *wavelets* seraient la résultante d'une libération de Ca^{2+} *via* les IP₃R1s. La localisation d'IP₃R3 n'avait pas été évaluée lors de cette étude [276]. Il est possible de recréer un modèle alternatif de PMEs en culture cellulaire. Ce modèle repose sur la mise en culture de CEs et de CMLs de part et d'autre d'une membrane de polyester munie de perforations (une homologie aux fenestrations de la LEI; disponible commercialement). Ce montage permet d'isoler chaque composante cellulaire avec son propre milieu de culture. Les deux types cellulaires vont générer des extensions cellulaires présentant plusieurs similarités avec les PMEs natives au niveau des perforations de la membrane de polyester. Il a été démontré que la portion endothéliale de ces PMEs artificiellement recrées au niveau des perforations de la membrane présente uniquement l'expression d'IP₃R1 [382]. Les cellules utilisées dans le cadre de cette étude ont été isolées à partir d'artères du muscle crémaster de hamster, tout comme l'étude précédente utilisant les artères entières [276]. Par contre, aucune information n'est disponible concernant les dynamiques calciques au sein des PMEs recrées dans ce modèle de co-culture puisque les études de dynamiques calciques étaient plutôt de nature globale [71, 382].

4.6 Microdomaine calcique : positionnement stratégique de la mitochondrie dans l'endothélium

La notion de microdomaine est fortement reliée au concept de localisation et de proximité des différents effecteurs [381]. Dans le cadre des microdomaines calciques, les cinétiques de ces derniers sont fondamentalement dépendantes de 2 composantes bien quelles ne soient pas exhaustives : (1) les cinétiques de libération/entrée de Ca^{2+} menant à l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et (2) les cinétiques de cessation/recapture/extrusion du

Ca^{2+} afin de rétablir le niveau intracellulaire de Ca^{2+} au niveau basal. Dans cette perspective, le niveau de proximité entre ces différentes composantes contrôle l'aspect (durée, amplitude, fréquence, propagation) des signaux calciques intracellulaires résultants. La PME constitue un microdomaine calcique où cohabitent signal calcique et mécanisme dépendant du Ca^{2+} [42, 43]. Cependant, peu d'informations permettaient d'expliquer jusqu'à ce jour la restriction du signal à la PME. Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle que les mécanismes régulant la fin du signal, *i.e* l'arrêt de la libération de Ca^{2+} ou la recapture du Ca^{2+} , doivent être fortement impliqués dans cette restriction du Ca^{2+} à la PME. Afin d'expliquer ce qui limite la dispersion du signal des pulsars calciques à l'ensemble de la cellule, nous avons cherché dans la littérature des mécanismes pouvant remplir ce rôle dans d'autres types cellulaires. Nous avons ainsi ciblé la mitochondrie qui agit telle une barrière en permettant de circonscrire le signal calcique dans une région précise de la cellule [622, 674]. La perspective d'observer un rôle similaire dans l'endothélium était très attrayante dans le contexte de la caractérisation des pulsars calciques.

La localisation de la mitochondrie peut jouer un rôle dans la régulation des fonctions cellulaires *via* sa capacité à produire de l'ATP ou en contrôlant les niveaux de Ca^{2+} intracellulaire [561, 594, 624]. Il a été rapporté que la proximité des mitochondries des sources de Ca^{2+} lui permet d'intégrer rapidement et finement ce second messager intracellulaire afin de répondre aux besoins énergétiques [646]. Des recherches ont permis de démontrer que les oscillations calciques intracellulaires corrélaient avec les oscillations calciques mitochondriales suggérant que les mitochondries agit à titre de senseur de Ca^{2+} intracellulaire en présentant un patron de signaux calciques intramitochondriaux correspondant au patron de signaux calciques intracellulaires [621]. La proximité entre les IP_3Rs du RE et le complexe VDAC-mCU de la mitochondrie permet ainsi un transfert efficace des signaux calciques d'un organe à l'autre [668]. Ainsi, une délocalisation des mitochondries par rapport aux IP_3Rs pourrait résulter en une modification des dynamiques de recapture de Ca^{2+} intracellulaire (*i.e* des transients calciques intracellulaires prolongés suite à une incapacité de recapter le Ca^{2+} rapidement). Une altération subséquente de la fonction mitochondriale pourrait être observée et à un plus large degré, une dysfonction cellulaire pourrait être engendrée par une suractivation des mécanismes cellulaires dépendants du Ca^{2+} .

La mitochondrie ne semble pas être la principale source d'énergie pour l'endothélium puisque la glycolyse semble fournir l'apport majeur en ATP dans ce type cellulaire [548]. Par contre, la mitochondrie pourrait jouer un rôle de modulateur des microdomaines calciques. Nous avons rapporté que la mitochondrie est un tampon important de Ca^{2+} [550]. Elle peut recapter et emmagasiner rapidement d'importantes quantités de Ca^{2+} ce qui lui permet d'être en 2^e position à titre de réserve calcique intracellulaire tel que démontré au sein de CE en culture [264]. Sa capacité à compartimenter le Ca^{2+} dans les cellules du pancréas [552] constitue l'un des fondements de la deuxième étude. Il était ainsi primordial d'établir la localisation des mitochondries par rapport à la PME. Pour ce faire, nous avons privilégié une approche par microscopie électronique. Cette approche nous permettait d'obtenir une très haute résolution de la structure de la PME suite à des coupes transversales d'artères mésentériques de souris bien qu'elle soit une évaluation statique de la disposition des mitochondries sur des artères fixées et ayant subi une coupe transversale. Une localisation préférentielle des mitochondries tout juste en face de la PME a été observée. En effet, une quantification nous a permis d'établir que près de 50% des mitochondries observées pour une coupe contenant une PME étaient localisées à l'embouchure de la PME (*i.e* <600 nm). Ce positionnement constitue une localisation de choix pour limiter la dispersion du Ca^{2+} de la PME en recaptant ce dernier avant sa propagation dans l'ensemble de la cellule (Figure 7, étude 2). Il est d'ailleurs suggéré que ces oscillations calciques tel que les pulsars calciques ont un plus haut potentiel de recrutement de la mitochondrie (*via* son mécanisme d'immobilisation dépendant du Ca^{2+}) que les augmentations intracellulaires transitoires monophasiques [579]. Ainsi, les résultats que nous avons obtenus concernant la localisation préférentielle des mitochondries face à la PME et les informations de la littérature nous apportent à nous questionner sur la capacité des pulsars calciques à moduler la mobilité mitochondriale et immobiliser les mitochondries à l'embouchure. Une augmentation des oscillations (*i.e* des pulsars calciques) pourrait favoriser l'arrêt des mitochondries à long terme face à la PME ce qui permettrait de contrôler ces oscillations et s'assurer d'une restriction du signal calcique à la PME. Il pourrait être suggéré qu'une diminution des oscillations permet aux mitochondries de se déplacer à nouveau dans la cellule. Ainsi, une dysfonction au niveau du mécanisme de motilité mitochondriale (*Ex.* une mutation dans l'appareil permettant le déplacement de la mitochondrie sur les microtubules, une mutation dans la protéine fournissant au mécanisme de

motilité la dépendance au Ca^{2+}) ou une altération du réseau de microtubules en lui-même pourrait influencer les dynamiques intracellulaires qu'elle contrôle par son incapacité à adapter sa localisation aux signaux calciques. Inversement, une modification de la localisation de la mitochondrie par rapport à la PME pourrait influencer l'effet de la mitochondrie sur les pulsars calciques. Si la mitochondrie est près des IP_3R s à l'embouchure de la PME, la sortie de Ca^{2+} provenant de la mitochondrie peut maintenir le IP_3R dans un état d'inhibition puisque les récepteurs seraient positionnés au départ du gradient de Ca^{2+} généré par la sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie. Par contre, si la mitochondrie n'est pas directement localisée face à la PME, l' IP_3R pourrait se situer dans la portion du gradient de concentration en Ca^{2+} généré par la sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie qui favorise plutôt son activation. Ceci permet de mettre en relief l'importance de la localisation de la mitochondrie par rapport à la PME afin de contrôler les pulsars calciques qui s'y retrouvent tel qu'il sera décrit dans la section 4.7.

Différentes approches ont été utilisées dans le but d'étudier la capacité de recrutement des mitochondries par les pulsars calciques de façon dynamique puisque la microscopie électronique constitue un résultat statique. En effet, certaines molécules fluorescentes disponibles commercialement permettent de marquer les mitochondries («*mitotracker*») [688] et permettrait de visualiser le déplacement des mitochondries dans notre préparation artérielle (artère ouverte longitudinalement en mode *en face*). Il aurait ainsi été intéressant d'établir une corrélation entre le niveau d'activité des pulsars calciques et la localisation mitochondriale. Par contre, plusieurs marqueurs de mitochondries utilisés dans notre préparation résultent en un marquage important des mitochondries des CMLs de la paroi vasculaire ce qui limite la visualisation adéquate des mitochondries dans l'endothélium. De plus, l'utilisation de certains de ces marqueurs mitochondriaux en combinaison avec le marqueur de Ca^{2+} optimisé au laboratoire aurait rendu ce type d'expérience difficilement réalisable dans nos conditions expérimentales dû à l'impossibilité d'utiliser simultanément 2 marqueurs fluorescents qui requiert les mêmes longueurs d'onde d'excitation et qui génère les mêmes longueurs d'onde d'émission. Notons également que notre système d'acquisition de microscopie à disques rotatifs («*spinning disks*») ne permet pas l'acquisition dans les deux longueurs d'onde distinctes de façon simultanée (ou quasi simultanée) et que le temps requis par le système de microscopie pour passer d'un filtre à l'autre pourrait engendrer une perte d'informations des

pulsars calciques qui présentent des cinétiques rapides [258]. Finalement, bien que certains groupes de recherche ont développé des outils techniques, des algorithmes et des logiciels permettant d'évaluer les cinétiques de déplacement des mitochondries ou de quantifier le transport mitochondrial [568, 689, 690], ces algorithmes ou logiciels ne sont pas adaptés à nos conditions expérimentales (*Ex.* système d'acquisition, type d'échantillon, limitations dues à la structure artérielle, mouvement de la préparation induit par la contraction du muscle lisse de la paroi) ce qui aurait rendu l'évaluation d'une corrélation motilité mitochondriale/pulsar calcique très fastidieuse. L'ensemble de ces facteurs a rendu impossible l'exploration de cette question bien qu'elle ait été d'intérêt. Ces expériences constituent des objectifs à long terme pour ce projet et ils seront étudiés dès que les outils appropriés seront disponibles ou développés.

4.7 La modulation des pulsars calciques par la mitochondrie est multifactorielle

Les pulsars calciques proviennent des IP₃Rs. Les IP₃Rs possèdent une dynamique d'activation/déactivation complexe et ils sont modulés par plusieurs facteurs dont le Ca²⁺ qui constitue un élément critique de cette régulation [285, 289, 291, 292]. Le milieu intracellulaire est un environnement dynamique où l'ensemble de ces facteurs varie constamment de façon spatiotemporelle et où la distribution/regroupement des récepteurs peut fortement influencer l'aspect du signal calcique résultant. Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'une altération de la fonction mitochondriale par des moyens pharmacologiques engendre une modification des dynamiques calciques intracellulaires, que ce soit suite à une altération de la $\Delta\psi_m$ par l'utilisation de découpleurs mitochondriaux [622, 674, 675], une inhibition spécifique de la recapture de Ca²⁺ par la mitochondrie [676] ou par une inhibition de la sortie de Ca²⁺ de la mitochondrie [680], et ce dans divers types cellulaires. Ainsi, considérant que la mitochondrie module les dynamiques calciques intracellulaires, que le Ca²⁺ constitue un élément fondamental dans la régulation des IP₃Rs et considérant que la mitochondrie est localisée à un endroit favorable pour moduler le Ca²⁺ dans la PME, il était intéressant d'évaluer si la mitochondrie influence les dynamiques des pulsars calciques.

Nous avons débuté cette étude par une approche globale où les mécanismes de transport du Ca^{2+} mitochondrial sont affectés par l'utilisation d'un découpleur mitochondrial résultant en une mitochondrie non fonctionnelle (*i.e* perte du potentiel membranaire tel qu'évalué par un marquage de TMRE; Figure Suppl. 1, étude 2). Dans cette condition, une augmentation du nombre de sites présentant des pulsars calciques comparativement à la condition témoin a été constatée (Figure 1, étude 2). Ce résultat suggère que la mitochondrie maintient dans l'inactivité certains sites qui possèdent les composantes structurelles et protéiques pour générer des pulsars calciques, mais dont les conditions environnementales semblent défavorables au déclenchement d'évènements calciques. Cet effet est également obtenu lorsque l'on inhibe spécifiquement les mécanismes de sortie du Ca^{2+} mitochondrial (Figure 5 et 6, étude 2) ou lorsque stimule l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie (Figure 4, étude 2). D'après ces résultats, il est possible d'émettre l'hypothèse que dans ces 2 conditions expérimentales, les évènements calciques sont déclenchés suite à un déplacement de la gamme de concentrations de Ca^{2+} cytosolique inhibant les l'IP₃Rs près de la PME à une gamme de concentrations qui stimule la libération de Ca^{2+} par les IP₃Rs de la PME. Cependant, cette hypothèse est difficile à vérifier puisqu'il serait nécessaire de mesurer le niveau d'activité individuelle des IP₃Rs (*Ex.* conductance, probabilité d'ouverture) ainsi que de quantifier précisément les variations de concentrations de Ca^{2+} libre à proximité du site activateur et inhibiteur de l'IP₃R suite à ces altérations mitochondriales. Bien qu'une augmentation du nombre de sites actifs soit notée dans les 2 conditions rapportées ci-haut, il est important de mettre en relief que l'activité à chacun de ces sites est pour sa part réduite. De façon intéressante, les sites précédemment inactifs présentent en générale une fréquence de pulsars calciques encore plus faible que les sites qui présentaient déjà une activité (Figure 4, 5 et 6, étude 2). De ces résultats, il est possible de conclure que: (1) la mitochondrie permet de maintenir des sites potentiels de pulsars dans un état d'inactivité; (2) la mitochondrie est déterminante pour la fréquence des pulsars puisqu'une altération pharmacologique de ses mécanismes modifie la fréquence des pulsars ; (3) les sites de pulsars qui étaient actifs en condition témoin ou qui sont recrutés par la drogue doivent présenter des caractéristiques distinctes puisque leurs fréquences sont significativement différentes pour une même condition pharmacologique. Les résultats obtenus en altérant la fonction mitochondriale sur le niveau d'activité des pulsars soulève la question concernant l'effet du positionnement de la

mitochondrie par rapport à la PME puisque ceci pourrait affecter les mécanismes d'activation/déactivation des IP₃Rs en fonction de la localisation des IP₃Rs dans le gradient de diffusion du Ca²⁺ provenant de la mitochondrie. Il a entre autres été montré que les régions présentant une densité importante de mitochondries présentent moins de Ca²⁺ *puffs* au sein de l'oocyte de *Xenopus* suggérant que la mitochondrie inhibe de l'activité calcique dans ce modèle [678]. De ce fait, des études permettant d'établir une corrélation entre la densité mitochondriale d'une PME et le niveau d'activité calcique dans cette même PME aurait permis de répondre à cette question. En dépit des limitations concernant la difficulté de corréler la densité mitochondriale avec le niveau d'activité calcique dans une PME donnée, les résultats obtenus suggèrent fortement que la mitochondrie peut contrôler localement le niveau de Ca²⁺ dans la PME de façon à maintenir inactif les pulsars calciques. Par ailleurs, la fréquence plus faible des pulsars calciques lors d'une altération des mécanismes de sorties de Ca²⁺ de la mitochondrie pourrait être expliquée par l'interruption de l'échange de Ca²⁺ mitochondrie-RE ce qui réduit le Ca²⁺ disponible pour la libération par les IP₃Rs du RE. Il est également possible d'émettre l'hypothèse que la localisation préférentielle de la mitochondrie face à la PME permet d'augmenter localement la concentration de Ca²⁺ du RE de la PME. Cette hypothèse sous-tend la présence d'une hétérogénéité en termes de concentration de Ca²⁺ dans le RE [271]. Ainsi, il aurait été intéressant d'une part de déterminer si la localisation de la mitochondrie influence les concentrations de Ca²⁺ intraréticulum dans l'endothélium et d'autre part d'évaluer si altérer les mouvements de Ca²⁺ de la mitochondrie (*Ex.* lors d'une inhibition des mécanismes de sorties de Ca²⁺ mitochondriale) affecte la distribution du Ca²⁺ intraréticulum particulièrement au niveau du RE de la PME. Cette question serait d'autant plus intéressante à évaluer qu'il est suggéré que la concentration de Ca²⁺ intraréticulum peut stimuler l'activité des IP₃Rs lorsque qu'elle atteint un certain seuil tel que suggéré dans les hépatocytes [294].

Tel que mentionné à de multiples reprises, la mitochondrie peut compartimenter le Ca²⁺ cytosolique en limitant la dispersion d'un signal calcique à certaines régions de la cellule. Un des paramètres analysés lors de l'étude 2 a donc été la capacité de la mitochondrie à restreindre la dispersion des pulsars calciques. En présence de FCCP qui induit une mitochondrie non-fonctionnelle par la perte de son potentiel membranaire, des pulsars

calciques de plus grande superficie d'environ 25% sont observées. Les pulsars calciques provenant des sites recrutés lors de l'ajout du FCCP présente une superficie de 60% plus grande que ceux observés en condition contrôle (Figure 2, étude 2). Ces résultats suggèrent que les sites maintenus inactifs par les mitochondries présentent la capacité de générer des évènements de plus grande envergure que les sites précédemment actifs et il serait intéressant de caractériser ces deux populations de sites afin d'établir quelle composante pourrait expliquer cette différence (*Ex.* position de la mitochondrie par rapport à la PME, distribution des IP₃Rs, présence de protéines régulatrices dans la PME, présence de protéines tampon dans la PME, contenu en Ca²⁺ du RE présent dans la PME). Lorsque l'on module individuellement l'entrée et la sortie de Ca²⁺ de la mitochondrie par divers traitements pharmacologiques, seul l'altération des dynamiques de recapture de Ca²⁺ modifie la superficie couverte par le pulsar calcique. Une inhibition du mCU génère des pulsars calciques qui couvrent une plus grande surface (Figure 3, étude 2). À l'opposé, une stimulation de l'activité du mCU engendre des pulsars calciques qui couvrent une plus petite surface (Figure 4, étude 2). Ces résultats appuient notre hypothèse selon laquelle la mitochondrie peut limiter la dispersion du signal calcique dans l'espace en agissant telle une barrière. La notion de barrière mitochondriale inclut deux composantes. La première composante est une barrière à titre d'obstacle physique qui obstrue le passage du Ca²⁺. La deuxième composante est une barrière à titre de tampon en captant le Ca²⁺ afin de limiter sa dispersion dans la cellule. La composante tampon est évaluée lorsque l'on altère la fonction mitochondriale ce qui limite la capacité de la mitochondrie à capter le Ca²⁺. Dans cette condition, la mitochondrie est toujours en place pour exercer son rôle de barrière physique sur les pulsars calciques. Une délocalisation de la mitochondrie fonctionnelle permettrait de déterminer si la mitochondrie est une barrière physique à la dispersion du Ca²⁺ issu des pulsars calciques. Les résultats de nos travaux fournissent toutefois des évidences suggérant que l'impact de la mitochondrie sur la propagation du pulsar calcique n'est pas principalement à titre de barrière physique. Par exemple, l'analyse approfondie de la dispersion du pulsar calcique en absence et en présence d'un découpleur de la mitochondrie nous suggère que la mitochondrie ne présente pas un obstacle physique prépondérant. En effet, l'anisotropie de la surface couverte par un pulsar n'est pas significativement différente que la mitochondrie soit fonctionnelle ou non. En d'autres termes, lorsque l'on limite la capacité de la mitochondrie à capter le Ca²⁺ provenant de la PME (tel qu'attendu par l'ajout de FCCP), la

dispersion du signal calcique dans la cellule conserve sa forme globale malgré que les pulsars calciques couvrent une plus grande superficie. Si la mitochondrie jouait également un rôle de barrière physique, la dispersion du signal calcique serait modifiée par l'obstruction physique de cette structure intracellulaire sur la diffusion des ions calciques, ce qui n'est pas le cas. Il est toutefois possible que l'anisotropie du signal calcique, tel qu'illustré à la figure supplémentaire 2 de l'étude 2, demeure inchangée en présence de FCCP malgré que la mitochondrie obstrue le passage du calcium. Dans ce cas, il faudrait considérer que les mitochondries sont disposées de façon homogène autour de la PME, ce qui est peu probable considérant les images de microscopie électronique de la PME. Les résultats de microscopie électronique montrent d'ailleurs que les mitochondries sont généralement localisées au-dessus de la PME, où elles n'affecteraient pas l'anisotropie de la dispersion du pulsar calcique. Nos travaux suggèrent donc que l'entrave à la dispersion du pulsar calcique par la mitochondrie s'effectue via un rôle actif impliquant la recapture du Ca^{2+} plutôt qu'en tant que barrière physique passive ou obstacle au déplacement des ions.

Les manipulations pharmacologiques de la fonction mitochondriale ont une incidence directe sur la production de ROS [609, 610]. D'un autre côté, l'activité des IP_3Rs est sensible à l'oxydation [287] de même que celle des pompes SERCA [321, 322]. L'oxydation des isoformes 1 et 2 des IP_3Rs induite par $\text{l'O}_2\bullet^-$ est associée à une augmentation des oscillations calciques, un effet non observé sur l' $\text{IP}_3\text{R3}$ qui est expliqué par une différence de séquence entre les isoformes [287]. Puisque les $\text{IP}_3\text{R1}$ et $\text{IP}_3\text{R2}$ sont les isoformes identifiées comme étant responsables des pulsars calciques lors de l'étude 1, les pulsars calciques seraient susceptibles d'être modulés par les ROS dont les ROS mitochondriaux. Une étude du laboratoire a d'ailleurs permis de mettre en évidence le potentiel de régulation des ROS sur les pulsars calciques. Dans cette étude, l'ajout d'ANGII augmente la fréquence des pulsars calciques et cet effet est partiellement dépendant des ROS puisque l'utilisation d'une molécule antioxydante permet de limiter cette augmentation de fréquence [527]. Il est intéressant de noter que l'application d'ANGII sur des BAEC engendre la production de ROS majoritairement *via* la mitochondrie [691] ce qui suggère que l'effet des ROS sur les pulsars calciques suite à l'application d'ANGII pourrait découler de ROS mitochondriaux. Il serait possible d'évaluer cette composante par l'utilisation d'antioxydant spécifique à la

mitochondrie [692]. En ce qui concerne les diverses conditions expérimentales effectuées dans l'étude 2, la fréquence des pulsars calciques était soit plus faible ou non-modifié par rapport à la condition contrôle. Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle les conditions expérimentales de l'étude 2 n'induisent pas ou pas suffisamment de ROS mitochondriaux pour oxyder les IP₃R de façon à augmenter la fréquence des oscillations calciques. Il peut également être suggéré que dans les conditions expérimentales de l'étude 2, l'effet des ROS mitochondriaux est surpassé par d'autres facteurs résultant en une réduction des oscillations calciques. Les outils pharmacologiques utilisés lors de l'étude 2 ont été appliqués de façon aigüe sur la préparation et une incubation prolongée de ces diverses drogues pourraient engendrer un niveau de production de ROS mitochondriaux suffisant afin d'augmenter la fréquence des pulsars calciques.

Nous sommes les premiers à rapporter la régulation des dynamiques calciques d'ordre locale dans l'endothélium natif par les mitochondries. Une délocalisation de mitochondriale par rapport à la PME ou un dysfonctionnement mitochondrial tel qu'observé en pathologie pourrait affecter la dynamique des pulsars calciques. De ce fait, la balance d'activation des mécanismes dépendants du Ca²⁺ de la PME pourrait se retrouver altérée. Il est par contre difficile de s'avancer sur l'effet de ces altérations sur les pulsars calciques puisque l'effet de la mitochondrie semble dépendre d'un fin équilibre entre plusieurs éléments (localisation, dynamique de recapture et de sortie du Ca²⁺, production de ROS). Il serait essentiel d'évaluer individuellement l'effet de ces altérations mitochondriales sur la dynamique des pulsars calciques.

4.8 Relation entre CaMKII, les mitochondries et les pulsars calciques : de nombreuses interactions possibles.

Dans la littérature, 2 études publiées dans *Nature* ont évalué si CaMKII régule l'entrée de Ca²⁺ dans la mitochondrie en modulant l'activité de mCU. *Joiner et al., 2012* [693] suggère que le courant I_{mCU} mitochondrial est augmenté suite à l'ajout d'une CaMKII mutée constitutivement active du côté correspondant à la matrice mitochondriale. Les auteurs ont également observé une diminution du courant du mCU de mitochondries qui expriment un dominant négatif de CaMKII. Ces résultats suggèrent que CaMKII localisée dans la

mitochondrie augmente la conductance du mCU. Toutefois, *Fieni et al., 2014 [694]* déclarent leur incapacité à reproduire ces travaux. Ils suggèrent que le courant mesuré dans l'étude de *Joiner et al., 2012* n'est pas associé au mCU dû à son amplitude trop grande comparativement à la précédente étude de *Feini et al., 2012* caractérisant le I_{mCU} dans différents tissus [695]. Advenant que CaMKII peut stimuler le mCU, cette régulation ne serait pas dépendante de l'activation de CaMKII par pulsars calciques dû à la différence de compartiments des 2 éléments. Notons également que les évidences suggérant la présence de CaMKII dans la mitochondrie se reposent essentiellement sur cette référence de *Joiner et al., [693]* où CaMKII a été associée à la membrane de mitoplastes (*i.e* portion de membrane provenant de mitochondrie fragmentée). D'autres études seraient donc nécessaire afin de renforcer cette observation.

Bien que les études du laboratoire aient généralement mis l'accent sur la capacité du Ca^{2+} à activer CaMKII, plusieurs études ont démontré l'activation de CaMKII par son oxydation [435, 511, 696]. Cette régulation par l'oxydation n'a pas été une caractéristique évaluée lors cette thèse puisque l'étude de cette composante sur la dynamique des pulsars calciques aurait nécessité une mutation de CaMKII aux sites d'oxydation puisqu'aucun inhibiteur ne peut affecter directement et uniquement cette modification post-traductionnelle. Notons que l'activation de CaMKII par le Ca^{2+} est une étape nécessaire afin de permettre les modification post-traductionnelle qui active cette enzyme (phosphorylation ou oxydation). Dans une condition de dysfonction mitochondriale chronique présentant une augmentation de la production de ROS mitochondriales, une modification des voies de signalisation présentes dans la PME peut être observée tel qu'une augmentation des oscillations calciques résultants des IP_3R1 et IP_3R2 oxydés, mais également par une modification du patron d'activation de CaMKII par le Ca^{2+} et l'oxydation. Puisque selon les littératures actuelles, il n'y a pas d'étude permettant d'affirmer que CaMKII oxydée présente des cibles différentes que CaMKII phosphorylée, l'activation initiale de CaMKII par les pulsars calciques et son oxydation subséquente par les ROS mitochondriaux pourrait contrer la suractivation des IP_3Rs par les ROS mitochondriaux en agissant sur les IP_3R de façon inhiber l'activité de ce canal. Bien que ceci est rapporté de prime abord comme étant une réaction en chaîne, ces éléments peuvent se

chevaucher à plusieurs endroits et nécessiterait donc plus d'investigation afin d'en évaluer la réelle résultante au niveau physiopathologique.

4.9 Altération mitochondriale : relation potentielle avec la dysfonction endothéliale et la dynamique des pulsars calciques

En ce qui concerne les pathologies mitochondriales et la dysfonction endothéliale, les études se sont généralement concentrées sur l'augmentation de la production de ROS ou sur une modification en termes de biogenèse mitochondriale. La mitochondrie est sensible aux changements métaboliques et il est suggéré qu'une surexposition des CEs au glucose tel qu'observé en diabète augmente la production d' $O_2^{\bullet-}$ mitochondriale [697]. Assumant la sensibilité des IP_3Rs aux ROS, il serait attendu que la dysfonction mitochondriale augmente les pulsars calciques de gens atteints de diabète. Notons toutefois qu'une réduction de la réponse calcique endothéliale d'artères utéroplacentaires pressurisées provenant de femelle rate avec du diabète gestationnel suite à l'application d'ACh a été dénotée [698]. Par contre, cette étude ne permet pas d'évaluer les dynamiques calciques locales.

Par ailleurs, il est également rapporté qu'une fragmentation des mitochondries est observée dans les CEs provenant de patients diabétiques et il est suggéré que ceci participe à la dysfonction endothéliale observée chez ces patients particulièrement en réduisant l'activité de la NOS-3 ou en diminuant la biodisponibilité du NO [699]. Il est possible de suggérer que la diminution de l'activité de la NOS-3 observé dans cette condition de dysfonction endothéliale découle d'une altération de la dynamique de pulsars calciques due à la fragmentation des mitochondries qui sont principalement localisées face à la PME tel que démontré dans notre étude 2. En effet, la fragmentation des mitochondries engendre une perte de la $\Delta\psi_m$ [700]. Considérant qu'un plus grand nombre de site de pulsars calciques, mais avec une fréquence d'oscillation plus faible, est observé suite à l'ajout de FCCP, il serait possible de suggérer que la fragmentation de la mitochondrie engendre une altération de la fréquence des pulsars calciques qui se traduit par une réduction de l'activité de CaMKII dont le niveau d'activité est sensible aux fréquences d'oscillations [420]. L'activité de la NOS-3 qui est également localisée dans cette structure [62] serait réduite puisqu'elle est contrôlée par CaMKII et ce, de façon pulsars-dépendante telle qu'observée précédemment au laboratoire [527].

Certaines mutations mitochondriales sont associées à l'hypertension. Notons que 2 d'entre elles sont localisées dans des gènes codants pour des protéines essentielles pour la fusion mitochondriale, soit OPA1 [701] et MNF2 [702]. La MNF2 est également une protéine localisée à la membrane du RE qui peut permettre un ancrage Ca^{2+} -dépendant de la mitochondrie aux régions hautement dynamiques en Ca^{2+} [671]. Malheureusement, les études démontrant la corrélation entre les mutations de OPA1 et MF2 et l'hypertension sont des études d'association entre l'augmentation de la pression sanguine et la mutation étudiée. Elles ne permettent pas d'évaluer l'impact de ces mutations sur la biogenèse mitochondriale au sein des cellules ou sur les dynamiques calciques intracellulaires endothéliales. Par ailleurs, l'effet généré par ces mutations sur ces deux protéines (*i.e* gain ou perte de fonction) n'a pas été mis en évidence signifiant qu'il est impossible d'établir (1) si les mitochondries des cellules avec ces mutations présentent des dynamiques de fusion augmentées ou diminuées, (2) si cela altère le recrutement des mitochondries aux régions dynamiques en Ca^{2+} ou (3) si cela affecte le contenu en Ca^{2+} du RE.

4.10 La PME est-elle un microdomaine gouverné par les concentrations locales d'ATP mitochondriale?

La PME est un microdomaine de signalisation dont le bon fonctionnement repose sur l'équilibre entre différents mécanismes, dont les concentrations locales d'ATP, et qui serait, d'après les résultats obtenus dans l'étude 2, fortement dépendant des mitochondries localisées à l'embouchure de la PME.

La distribution des IP_3Rs en fonction de leur dépendance à l'ATP peut s'ajouter aux mécanismes cellulaires permettant de contrôler les pulsars calciques. Il peut être suggéré que le récepteur à l' $\text{IP}_3\text{R3}$ localisé à la périphérie de la PME limite la dispersion du signal calcique tel qu'exposé dans la section 4.5. Toutefois, il a été rapporté qu'une augmentation importante de la concentration d'ATP permet de maintenir l' $\text{IP}_3\text{R3}$ actif pour une plus grande gamme de concentration intracellulaire en Ca^{2+} [2, 282]. Ainsi, il est tentant de suggérer qu'un bolus de production locale d'ATP augmente la dispersion du signal calcique *via* son effet sur les $\text{IP}_3\text{R3s}$ localisés en périphérie de la PME. D'autre part, bien que cet aspect n'ait pas été directement évalué dans cette thèse, la recapture de Ca^{2+} par le RE *via* la pompe SERCA est un élément

essentiel pour les dynamiques présentes dans la PME puisqu'une inhibition de cette dernière élimine complètement la présence des pulsars calciques [197]. L'activité de la pompe SERCA est également directement dépendante des concentrations d'ATP intracellulaires [303] et la proximité de la mitochondrie avec la PME pourrait permettre de réagir à la libération de Ca^{2+} dans cette structure en produisant localement l'ATP nécessaire aux pompes SERCA afin de ramener le niveau basal de Ca^{2+} dans la PME. Nous avons également mis en relief que CaMKII, une kinase qui utilise l'ATP comme substrat, régule négativement les pulsars calciques (Étude 1). La production d'ATP par la population de mitochondries localisées à l'embouchure de la PME pourrait spécifiquement fournir du substrat à CaMKII localisé dans la PME afin d'effectuer sa fonction de kinase inhibant ainsi les pulsars calciques. D'autres kinases telles que la PKC requiert également l'ATP afin d'effectuer leur activité catalytique et donc, moduler les voies de signalisation présentes dans la PME telles que les *TRPV4 sparklets* [393]. Ainsi, la disponibilité d'ATP à proximité de ces effecteurs serait un élément essentiel pour la régulation des dynamiques calciques localisées dans la PME.

La mitochondrie peut agir à titre de senseur d'oscillations calciques en présentant un patron d'oscillations calciques similaire à celui présent au sein du cytosol [703]. Ainsi, la production d'ATP par les mitochondries localisées en face de la PME pourrait être directement couplée aux demandes métaboliques induites par ces augmentations de Ca^{2+} au sein de la PME [553-555]. Il serait ainsi intéressant d'évaluer dans quelle mesure les pulsars calciques sont capables de moduler la production d'ATP par la mitochondrie. Est-ce que la production d'ATP mitochondriale pourrait être couplée aux patrons des oscillations des pulsars calciques et influence-t-elle l'aspect des pulsars calciques comme mécanisme de rétroaction? Certaines molécules FRET sensibles à l'ATP ont été conçues, mais celles-ci impliquent la transfection d'une construction moléculaire [704, 705]. Considérant qu'il soit difficile de transfecter les CEs *in situ* sans affecter l'intégrité artérielle, il serait préférable d'utiliser une sonde fluorescente sensible à l'ATP pouvant être chargée dans l'endothélium de façon similaire au marquage du Ca^{2+} par le Fluo-4. Toutefois, ce type de sonde est pour le moment inexistant sur le marché. Les études portant sur le métabolisme ont généralement recours à des systèmes tels le Seahorse XF[®] analyzer[®] afin d'évaluer la fonction mitochondriale (incluant la production d'ATP) en mesurant la consommation d'O₂ dans

diverses conditions pharmacologiques où l'activité des complexes de la chaîne de transport d'électrons est altérée. Plusieurs trousseaux commerciaux qui permettent de doser l'ATP sont également disponibles sur le marché. Par contre, ces deux méthodes nécessitent des cellules ou mitochondries isolées brisant ainsi l'intégrité des PME. En absence d'avancées technologiques qui permettraient d'évaluer les variations d'ATP cytosoliques dans notre préparation, il est malheureusement difficile d'évaluer le rôle de la composante de l'ATP mitochondriale dans le microdomaine de signalisation de la PME.

4.11 Limitations imposées par le modèle d'étude utilisé

Les études présentées dans cette thèse ont été effectuées sur des artères mésentériques de souris de 3^e et 4^e ordre (diamètre de 80 à 120 μm ; des artères de résistance). Ces artères mésentériques ont été ouvertes longitudinalement et épinglées sur un cube de silicone (configuration *en face*) afin de permettre un meilleur enregistrement des dynamiques présentes dans l'endothélium. L'utilisation d'artères natives permet de conserver la structure physiologique du vaisseau et de façon plus importante, de conserver la structure anatomique de la PME. Ainsi, ce modèle constitue notre préparation de prédilection pour l'ensemble des expériences présentées dans cette thèse. Bien que cette préparation permette une prise de vue optimale sur la composante endothéliale, cela impose certaines limites.

Il est reconnu que les cellules formant la paroi vasculaire sont fortement influencées par le niveau d'étirement. Elles expriment des canaux dont l'activité est variable en fonction de l'étirement de la membrane dans laquelle ils sont ancrés [706]. Lors de la préparation de l'artère, un biais peut être induit par les variations au niveau de l'étirement de l'artère exercé par le manipulateur. Malheureusement, l'étirement de la paroi est nécessaire puisqu'il permet de s'assurer que les CEs de l'ensemble du champ optique soient dans le même plan focal. Puisque nos études sont effectuées sur des tissus vivants et que nous affectons en général des mécanismes pouvant faire varier le niveau de contraction des CMLs, l'étirement nous permet de minimiser le mouvement de l'artère lors de l'acquisition. Bien que tout soit mis en œuvre afin de conserver un étirement similaire entre les divers échantillons et les divers utilisateurs, il est impossible d'avoir exactement la même tension entre les préparations ce qui augmente la variabilité. Par ailleurs, il est impossible de comparer le type d'étirement induit par le

manipulateur sur l'artère ouverte avec la pression exercée par le sang dans la lumière du vaisseau en condition physiologique. En effet, l'absence de pression intraluminale constitue une limite de notre modèle d'artères ouvertes. Des techniques telles que l'artériographe pressurisé peuvent imposer une pression intraluminale au niveau d'un vaisseau isolé. Il est également possible de varier débit du liquide dans la lumière du vaisseau [707]. Le débit sanguin induit des contraintes de cisaillement sur la paroi endothéliale qui ont des répercussions sur les voies de signalisation intracellulaires [373]. Le passage des solutions physiologiques en circulation induit également des contraintes de cisaillements qu'il nous ait impossible de comparer avec celles induites par un débit sanguin. Il est possible de faire l'étude des dynamiques calciques endothéliales sur des artères pressurisées ce qui permet de conserver le vaisseau intact [197, 708]. Cependant, la structure arrondie de l'artère limite considérablement la taille du champ optique acquis sur un même plan focal. De plus, l'épaisseur de la paroi vasculaire limite la résolution optique des dynamiques intracellulaires endothéliales. Ainsi, notre préparation d'artères ouvertes favorise l'enregistrement des dynamiques intracellulaires endothéliales pour un grand nombre de cellules sur un même plan focal ce qui permet d'obtenir un plus grand échantillonnage en termes de sites de pulsars calciques.

Les CEs et les CMLs sont électriquement et chimiquement couplées par la présence de jonctions GAP au niveau de la PME [76]. Lors des expériences effectuées en microscopie confocale à haute vitesse, les molécules pharmacologiques sont ajoutées en circulation sur la totalité de l'artère, ce qui pourrait aussi altérer l'activité des CMLs sous-jacentes. Il aurait été possible d'évaluer cette composante par l'ajout d'inhibiteur de jonctions GAP ce qui aurait permis de s'assurer d'éliminer la rétroaction du muscle lisse pouvant affecter les voies de signalisation dans la PME.

Malgré ces limites, le modèle expérimental choisi demeure la meilleure préparation afin d'étudier la signalisation calcique endothéliale tout en conservant la structure de la PME. Le modèle de co-culture CE-CML permettant de recréer artificiellement des PMEs [71, 382] pourrait être une alternative intéressante permettant l'utilisation de technique de biologie moléculaire. De plus, ceci pourrait permettre de limiter l'usage d'animaux. Par contre, il est important de noter que la densité et la taille des perforations de la membrane des supports

obtenus commercialement sont peu représentatives des caractéristiques d'une LEI ce qui limite fortement l'extrapolation des résultats obtenus dans ce cadre expérimental.

5. Conclusion

L'objectif principal de cette thèse était d'identifier des mécanismes régulant les pulsars calciques en conditions physiologiques.

Lors de notre première étude, nous avons ciblé CaMKII, une kinase dont le niveau d'activation varie en fonction des oscillations calciques. Nous avons démontré que CaMKII inhibe les sites de pulsars calciques, et ce *via* la voie des IP₃Rs ce qui corrèle avec la littérature. Parallèlement, nous avons identifié les isoformes des IP₃Rs responsables des pulsars calciques, soit IP₃R1 et IP₃R2, isoformes préalablement identifiées comme étant responsable des dynamiques calciques de type oscillatoire. Avec cette étude, nous avons établi CaMKII comme une composante importante d'une boucle de rétroaction négative, en contrôlant les sites actifs de pulsars tel un interrupteur.

Lors de notre deuxième étude, nous avons ciblé la mitochondrie comme mécanisme de régulation des pulsars en raison d'un rôle potentiel de modulateur des dynamiques calciques intracellulaires. Nous avons démontré qu'une proportion importante de mitochondries de l'endothélium est localisée à l'embouchure de la PME. Une modulation pharmacologique de plusieurs mécanismes mitochondriaux (globaux ou ciblés) modifie la dynamique des pulsars calciques. Nos travaux démontrent que la mitochondrie restreint la dispersion des pulsars calciques *via* son mécanisme d'entrée de Ca²⁺. La mitochondrie *via* ses mécanismes de sortie contrôle la fréquence des pulsars calciques à chaque site. Avec cette étude, nous avons montré que la mitochondrie peut contrôler plusieurs composantes de la dynamique des pulsars calciques (contrôle du nombre de sites actifs de pulsars calciques, de la fréquence des sites actifs de pulsars ou de la dispersion des pulsars calciques).

Compartimenter le signal calcique intracellulaire permet de cibler une fonction cellulaire précise comparativement à l'activation de l'ensemble des mécanismes cellulaire sensibles au Ca²⁺ lors d'un signal calcique global. Ainsi, l'originalité de nos travaux réside en l'identification de mécanismes modulant un signal calcique local dans l'endothélium natif, les pulsars calciques. Une altération pathologique d'un de ces mécanismes peut avoir des répercussions sur les pulsars calciques ainsi que sur le maintien de la fonction vasculaire dépendante de l'endothélium. Notre laboratoire a précédemment noté une altération de la

dynamique de pulsars calciques en pathologie d'HA. Une meilleure compréhension de la régulation des pulsars calciques en condition physiologique permet un ciblage de voies à investiguer en condition pathologique et qui peuvent avoir un effet significatif sur cette signalisation calcique.

Les études présentées dans cette thèse ont permis approfondir notre compréhension des dynamiques des pulsars calciques en identifiant les isoformes de IP₃Rs responsables des pulsars calciques ainsi qu'en démontrant le rôle régulateur de CaMKII et de la mitochondrie en condition basale (Figure 28).

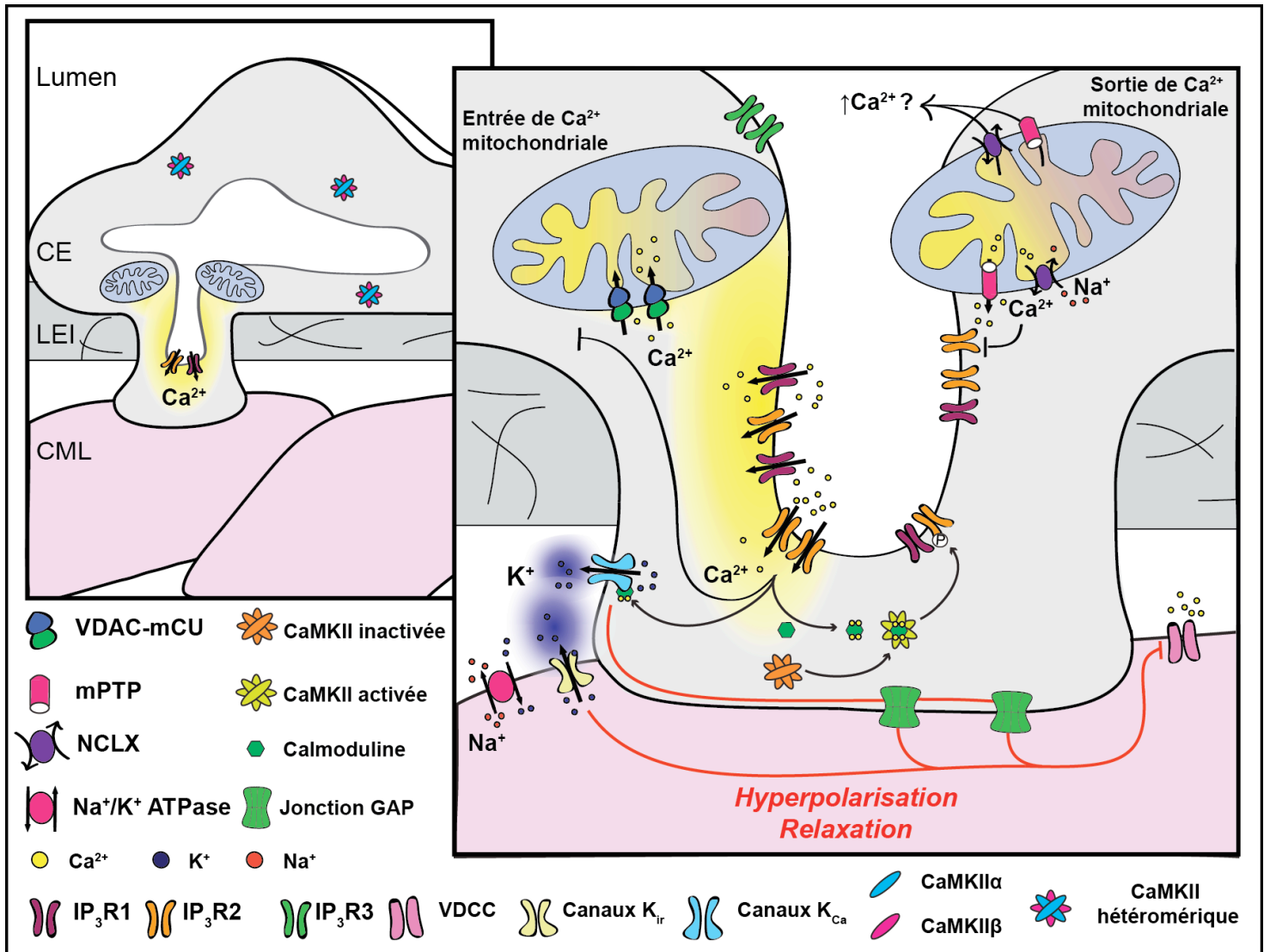


Figure 29. Mise à jour de la caractérisation des pulsars calciques incluant les résultats obtenus et présentés dans cette thèse.

Les pulsars calciques résultent d'une libération de calcium (Ca^{2+}) des récepteurs à l'inositol 1,4-5 triphosphate (IP₃R) de type 1 (IP₃R1) et de type 2 (IP₃R2) ; les IP₃R de type 3 (IP₃R3) étant localisés à l'extérieur de la projection myoendothéliale (PME). La protéine kinase II dépendante du complexe calcium/calmoduline (CaMKII) permet de contrôler le nombre de sites actifs de pulsars calciques en agissant *via* les IP₃Rs. Au niveau de l'endothélium natif, une hétéromérisation entre les isoformes α et β de CaMKII a été constatée. Les pulsars calciques peuvent également être contrôlés par les mitochondries qui sont localisées en forte concentration à l'embouchure de la PME. La recapture de Ca^{2+} par la mitochondrie influence le niveau de dispersion du pulsar calcique. La sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie influence le niveau d'activité à chaque site de pulsar potentiel. Na⁺ : Sodium, K⁺ : Potassium, VDAC : Voltage-dependent anion channel, mCU : Uniporteur calcique mitochondrial, mPTP : Pore de transition de perméabilité mitochondrial, NCLX : échangeur Na⁺/Ca²⁺ mitochondrial, VDCC : Canaux calciques dépendants du voltage, K_{ir} : Canaux potassiques à rectification entrante, K_{Ca} : Canaux potassiques dépendant du Ca²⁺

7. Bibliographie

1. Zhao, Y., P.M. Vanhoutte, and S.W. Leung, *Vascular nitric oxide: Beyond eNOS*. J Pharmacol Sci, 2015. **129**(2): p. 83-94.
2. Tu, H., Z. Wang, and I. Bezprozvanny, *Modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms by calcium: a role of calcium sensor region*. Biophys J, 2005. **88**(2): p. 1056-69.
3. Mas, M., *A Close Look at the Endothelium: Its Role in the Regulation of Vasomotor Tone*. European Urology Supplements, 2009. **8**(2): p. 48-57.
4. Vandecasteele, G., G. Szabadkai, and R. Rizzuto, *Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules*. IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 213-9.
5. Jackson, S.P., *The growing complexity of platelet aggregation*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5087-95.
6. Song, Y.H., *A Memory Molecule, Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Redox Stress; Key Factors for Arrhythmias in a Diseased Heart*. Korean Circ J, 2013. **43**(3): p. 145-51.
7. Chernorudskiy, A.L. and E. Zito, *Regulation of Calcium Homeostasis by ER Redox: A Close-Up of the ER/Mitochondria Connection*. J Mol Biol, 2017. **429**(5): p. 620-632.
8. Kerr, P.M., et al., *Endothelial feedback and the myoendothelial projection*. Microcirculation, 2012. **19**(5): p. 416-22.
9. Oldroyd, G.E. and J.A. Downie, *Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(7): p. 566-76.
10. Tortora, G.J. and B.H. Derrickson, *Principles of Anatomy and Physiology*. 2008(12th edition): p. 1280.
11. Aitsebaomo, J., et al., *Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity*. Circ Res, 2008. **103**(9): p. 929-39.
12. Pugsley, M.K. and R. Tabrizchi, *The vascular system. An overview of structure and function*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000. **44**(2): p. 333-40.
13. Westerhof, N., J.W. Lankhaar, and B.E. Westerhof, *The arterial Windkessel*. Med Biol Eng Comput, 2009. **47**(2): p. 131-41.
14. Mitchell, G.F., *Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage*. J Appl Physiol (1985), 2008. **105**(5): p. 1652-60.
15. Quinn, U., L.A. Tomlinson, and J.R. Cockcroft, *Arterial stiffness*. JRSM Cardiovasc Dis, 2012. **1**(6).
16. Bayliss, W.M., *On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure*. J Physiol, 1902. **28**(3): p. 220-31.
17. Dobrin, P.B., *Mechanical properties of arterises*. Physiol Rev, 1978. **58**(2): p. 397-460.
18. Harkness, M.L., R.D. Harkness, and D.A. McDonald, *The collagen and elastin content of the arterial wall in the dog*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **146**(925): p. 541-51.
19. Martinez-Lemus, L.A., *The dynamic structure of arterioles*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012. **110**(1): p. 5-11.

20. Falcone, J.C., M.J. Davis, and G.A. Meininger, *Endothelial independence of myogenic response in isolated skeletal muscle arterioles*. Am J Physiol, 1991. **260**(1 Pt 2): p. H130-5.
21. Davis, M.J. and M.A. Hill, *Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 387-423.
22. Lombard, J.H., et al., *Effect of reduced oxygen availability upon myogenic depolarization and contraction of cat middle cerebral artery*. Circ Res, 1986. **58**(4): p. 565-9.
23. Sommer, N., et al., *Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms*. Eur Respir J, 2008. **32**(6): p. 1639-51.
24. Wagenseil, J.E. and R.P. Mecham, *Vascular extracellular matrix and arterial mechanics*. Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 957-89.
25. Kirby, B.S., et al., *Robust internal elastic lamina fenestration in skeletal muscle arteries*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54849.
26. Sandow, S.L., D.J. Gzik, and R.M. Lee, *Arterial internal elastic lamina holes: relationship to function?* J Anat, 2009. **214**(2): p. 258-66.
27. Hill, M.A., et al., *Small Artery Elastin Distribution and Architecture-Focus on Three Dimensional Organization*. Microcirculation, 2016. **23**(8): p. 614-620.
28. Witter, K., Z. Tonar, and H. Schopper, *How many Layers has the Adventitia? - Structure of the Arterial Tunica Externa Revisited*. Anat Histol Embryol, 2016.
29. Hu, Y., et al., *Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1258-65.
30. Passman, J.N., et al., *A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(27): p. 9349-54.
31. Kelley, C., et al., *Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall*. J Cell Biol, 1987. **104**(3): p. 483-90.
32. Hamilton, N.B., D. Attwell, and C.N. Hall, *Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease*. Front Neuroenergetics, 2010. **2**.
33. Briones, A.M., et al., *Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 1): p. 185-95.
34. Masuda, H., et al., *Adaptive remodeling of internal elastic lamina and endothelial lining during flow-induced arterial enlargement*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(10): p. 2298-307.
35. Dolan, J.M., et al., *Endothelial cells express a unique transcriptional profile under very high wall shear stress known to induce expansive arterial remodeling*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(8): p. C1109-18.
36. Sho, E., et al., *High flow drives vascular endothelial cell proliferation during flow-induced arterial remodeling associated with the expression of vascular endothelial growth factor*. Exp Mol Pathol, 2003. **75**(1): p. 1-11.
37. Sho, E., et al., *Arterial enlargement in response to high flow requires early expression of matrix metalloproteinases to degrade extracellular matrix*. Exp Mol Pathol, 2002. **73**(2): p. 142-53.
38. Ma, Z.L., et al., *A rabbit model of atherosclerosis at carotid artery: MRI visualization and histopathological characterization*. Eur Radiol, 2008. **18**(10): p. 2174-81.

39. Coutard, M. and M.J. Osborne-Pellegrin, "*Spontaneous*" endothelial injury and lipid accumulation in the rat caudal artery. *Am J Pathol*, 1986. **122**(1): p. 120-8.
40. Cooper, L.L. and G.F. Mitchell, *Aortic Stiffness, Cerebrovascular Dysfunction, and Memory*. *Pulse (Basel)*, 2016. **4**(2-3): p. 69-77.
41. Cooper, L.L., et al., *Cerebrovascular Damage Mediates Relations Between Aortic Stiffness and Memory*. *Hypertension*, 2016. **67**(1): p. 176-82.
42. Heberlein, K.R., A.C. Straub, and B.E. Isakson, *The myoendothelial junction: breaking through the matrix?* *Microcirculation*, 2009. **16**(4): p. 307-22.
43. Straub, A.C., A.C. Zeigler, and B.E. Isakson, *The myoendothelial junction: connections that deliver the message*. *Physiology (Bethesda)*, 2014. **29**(4): p. 242-9.
44. Luscher, T.F., *The endothelium and cardiovascular disease--a complex relation*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(15): p. 1081-3.
45. Vanhoutte, P.M., et al., *Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017. **219**(1): p. 22-96.
46. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. *Circulation*, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
47. Sandoval, R., et al., *Ca²⁺ signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions*. *J Physiol*, 2001. **533**(Pt 2): p. 433-45.
48. Sandoval, R., et al., *Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **280**(2): p. L239-47.
49. Rinne, A., K. Banach, and L.A. Blatter, *Regulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in vascular endothelial cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **47**(3): p. 400-10.
50. Hellermann, G.R. and L.P. Solomonson, *Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(18): p. 12030-4.
51. Venema, R.C., et al., *Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(11): p. 6435-40.
52. Ledoux, J., A.D. Bonev, and M.T. Nelson, *Ca²⁺-activated K⁺ channels in murine endothelial cells: block by intracellular calcium and magnesium*. *J Gen Physiol*, 2008. **131**(2): p. 125-35.
53. Yamamoto, K., et al., *Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca²⁺ influx into pulmonary artery endothelial cells*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(2): p. H793-803.
54. Krans, J.L., *The sliding filament theory of muscle contraction*. *Nature Education*, 2010. **3**(9).
55. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. *Adv Physiol Educ*, 2003. **27**(1-4): p. 201-6.
56. Berridge, M.J., *Smooth muscle cell calcium activation mechanisms*. *J Physiol*, 2008. **586**(21): p. 5047-61.
57. Little, T.L., J. Xia, and B.R. Duling, *Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall*. *Circ Res*, 1995. **76**(3): p. 498-504.

58. Christ, G.J., et al., *Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone.* *Circ Res*, 1996. **79**(4): p. 631-46.
59. Sanderson, M.J., et al., *Mechanisms and function of intercellular calcium signaling.* *Mol Cell Endocrinol*, 1994. **98**(2): p. 173-87.
60. Figueroa, X.F. and B.R. Duling, *Gap junctions in the control of vascular function.* *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(2): p. 251-66.
61. Moore, D.H. and H. Ruska, *The fine structure of capillaries and small arteries.* *J Biophys Biochem Cytol*, 1957. **3**(3): p. 457-62.
62. Straub, A.C., et al., *Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(2): p. 399-407.
63. Sandow, S.L. and C.E. Hill, *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*, 2000. **86**(3): p. 341-6.
64. McNeish, A.J., et al., *Evidence for involvement of both IKCa and SKCa channels in hyperpolarizing responses of the rat middle cerebral artery.* *Stroke*, 2006. **37**(5): p. 1277-82.
65. Chadha, P.S., et al., *Endothelium-dependent vasodilation in human mesenteric artery is primarily mediated by myoendothelial gap junctions intermediate conductance calcium-activated K⁺ channel and nitric oxide.* *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **336**(3): p. 701-8.
66. Haddock, R.E., et al., *Diet-induced obesity impairs endothelium-derived hyperpolarization via altered potassium channel signaling mechanisms.* *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16423.
67. Maarouf, N., et al., *Structural Analysis of Endothelial Projections from Mesenteric Arteries.* *Microcirculation*, 2016.
68. Hald, B.O., et al., *Less is more: minimal expression of myoendothelial gap junctions optimizes cell-cell communication in virtual arterioles.* *J Physiol*, 2014. **592**(15): p. 3243-55.
69. Tomioka, H., et al., *Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions.* *J Vasc Res*, 1999. **36**(4): p. 311-20.
70. Sandow, S.L., et al., *Structure, function, and endothelium-derived hyperpolarizing factor in the caudal artery of the SHR and WKY rat.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(5): p. 822-8.
71. Isakson, B.E., S.I. Ramos, and B.R. Duling, *Ca²⁺ and inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction.* *Circ Res*, 2007. **100**(2): p. 246-54.
72. Dora, K.A., M.P. Doyle, and B.R. Duling, *Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(12): p. 6529-34.
73. Haefliger, J.A., P. Nicod, and P. Meda, *Contribution of connexins to the function of the vascular wall.* *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(2): p. 345-56.
74. de Wit, C. and T.M. Griffith, *Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses.* *Pflugers Arch*, 2010. **459**(6): p. 897-914.

75. Brisset, A.C., B.E. Isakson, and B.R. Kwak, *Connexins in vascular physiology and pathology*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(2): p. 267-82.
76. Emerson, G.G. and S.S. Segal, *Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control*. Circ Res, 2000. **87**(6): p. 474-9.
77. Wiedeman, M.P., *Dimensions of blood vessels from distributing artery to collecting vein*. Circ Res, 1963. **12**: p. 375-8.
78. dela Paz, N.G. and P.A. D'Amore, *Arterial versus venous endothelial cells*. Cell Tissue Res, 2009. **335**(1): p. 5-16.
79. Lurie, F., R.L. Kistner, and B. Eklof, *The mechanism of venous valve closure in normal physiologic conditions*. J Vasc Surg, 2002. **35**(4): p. 713-7.
80. Meissner, M.H., et al., *The hemodynamics and diagnosis of venous disease*. J Vasc Surg, 2007. **46 Suppl S**: p. 4S-24S.
81. Florey, *The endothelial cell*. Br Med J, 1966. **2**(5512): p. 487-90.
82. Furchgott, R.F. and S. Bhadrakom, *Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs*. J Pharmacol Exp Ther, 1953. **108**(2): p. 129-43.
83. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
84. Furchgott, R.F., et al., *Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries*. J Cardiovasc Pharmacol, 1984. **6 Suppl 2**: p. S336-43.
85. Arnold, W.P., et al., *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(8): p. 3203-7.
86. Furchgott, R.F., *Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide*. Biosci Rep, 1999. **19**(4): p. 235-51.
87. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. Circ Res, 2007. **100**(2): p. 158-73.
88. Aird, W.C., *Endothelial cell heterogeneity*. Crit Care Med, 2003. **31**(4 Suppl): p. S221-30.
89. Garlanda, C. and E. Dejana, *Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(7): p. 1193-202.
90. Stan, R.V., et al., *The diaphragms of fenestrated endothelia: gatekeepers of vascular permeability and blood composition*. Dev Cell, 2012. **23**(6): p. 1203-18.
91. Levick, J.R. and L.H. Smaje, *An analysis of the permeability of a fenestra*. Microvasc Res, 1987. **33**(2): p. 233-56.
92. Mann, G.E., L.H. Smaje, and D.L. Yudilevich, *Permeability of the fenestrated capillaries in the cat submandibular gland to lipid-insoluble molecules*. J Physiol, 1979. **297**(0): p. 335-54.
93. Wisse, E., *An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids*. J Ultrastruct Res, 1970. **31**(1): p. 125-50.
94. Braet, F. and E. Wisse, *Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review*. Comp Hepatol, 2002. **1**(1): p. 1.
95. Joo, F., *Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences*. Prog Neurobiol, 1996. **48**(3): p. 255-73.

96. Stamatovic, S.M., R.F. Keep, and A.V. Andjelkovic, *Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier*. *Curr Neuropharmacol*, 2008. **6**(3): p. 179-92.
97. Thurston, G., P. Baluk, and D.M. McDonald, *Determinants of endothelial cell phenotype in venules*. *Microcirculation*, 2000. **7**(1): p. 67-80.
98. Bienvenu, K. and D.N. Granger, *Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(5 Pt 2): p. H1504-8.
99. Perry, M.A. and D.N. Granger, *Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(5): p. 1798-804.
100. Muller, W.A., *Migration of leukocytes across the vascular intima molecules and mechanisms*. *Trends Cardiovasc Med*, 1995. **5**(1): p. 15-20.
101. Papaioannou, T.G. and C. Stefanadis, *Vascular wall shear stress: basic principles and methods*. *Hellenic J Cardiol*, 2005. **46**(1): p. 9-15.
102. Hoeben, A., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. *Pharmacol Rev*, 2004. **56**(4): p. 549-80.
103. Krock, B.L., N. Skuli, and M.C. Simon, *Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil*. *Genes Cancer*, 2011. **2**(12): p. 1117-33.
104. Kwon, H.M., et al., *Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(8): p. 1551-6.
105. Semenza, G.L., *Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999. **15**: p. 551-78.
106. Pepper, M.S., *Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(7): p. 1104-17.
107. Prager, G.W., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells*. *Blood*, 2004. **103**(3): p. 955-62.
108. Bernatchez, P.N., et al., *Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1*. *J Cell Biochem*, 2002. **85**(3): p. 629-39.
109. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
110. Ruhrberg, C., et al., *Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis*. *Genes Dev*, 2002. **16**(20): p. 2684-98.
111. Schaper, J., et al., *The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1976. **370**(3): p. 193-205.
112. Watanabe, T. and J. Fan, *Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis*. *Int J Cardiol*, 1998. **66 Suppl 1**: p. S45-53; discussion S55.
113. Scholz, D., et al., *Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)*. *Virchows Arch*, 2000. **436**(3): p. 257-70.

114. Shyy, J.Y., et al., *The cis-acting phorbol ester "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate"-responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 8069-73.
115. Cushing, S.D., et al., *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5134-8.
116. Arras, M., et al., *Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb.* J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 40-50.
117. Schirmer, S.H., et al., *Exercise promotes collateral artery growth mediated by monocytic nitric oxide.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(8): p. 1862-71.
118. Newby, A.C., *Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(12): p. 2108-14.
119. Bergmann, C.E., et al., *Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice.* J Leukoc Biol, 2006. **80**(1): p. 59-65.
120. Sangkuhl, K., et al., *Platelet aggregation pathway.* Pharmacogenet Genomics, 2011. **21**(8): p. 516-21.
121. Cassar, K., P. Bachoo, and J. Brittenden, *The role of platelets in peripheral vascular disease.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 2003. **25**(1): p. 6-15.
122. Badimon, L., T. Padro, and G. Vilahur, *Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease.* Eur Heart J Acute Cardiovasc Care, 2012. **1**(1): p. 60-74.
123. Tohgi, H., et al., *Platelet volume, aggregation, and adenosine triphosphate release in cerebral thrombosis.* Stroke, 1991. **22**(1): p. 17-21.
124. Azuma, H., M. Ishikawa, and S. Sekizaki, *Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation.* Br J Pharmacol, 1986. **88**(2): p. 411-5.
125. Hawkins, D.J., B.O. Meyrick, and J.J. Murray, *Activation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor released from cultured cells.* Biochim Biophys Acta, 1988. **969**(3): p. 289-96.
126. Kauskot, A. and M.F. Hoylaerts, *Platelet receptors.* Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 23-57.
127. Wagner, D.D., *Cell biology of von Willebrand factor.* Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 217-46.
128. Sakariassen, K.S., et al., *The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium.* Br J Haematol, 1986. **63**(4): p. 681-91.
129. Savage, B., M.H. Ginsberg, and Z.M. Ruggeri, *Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow.* Blood, 1999. **94**(8): p. 2704-15.
130. Nachman, R.L. and L.L. Leung, *Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen.* J Clin Invest, 1982. **69**(2): p. 263-9.
131. Gralnick, H.R., S.B. Williams, and B.S. Collier, *Fibrinogen competes with von Willebrand factor for binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex when platelets are stimulated with thrombin.* Blood, 1984. **64**(4): p. 797-800.

132. Ni, H., et al., *Control of thrombus embolization and fibronectin internalization by integrin alpha IIb beta 3 engagement of the fibrinogen gamma chain*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3609-14.
133. Siebenlist, K.R., et al., *Studies on the basis for the properties of fibrin produced from fibrinogen-containing gamma' chains*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2730-6.
134. Alheid, U., J.C. Frolich, and U. Forstermann, *Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets*. Thromb Res, 1987. **47**(5): p. 561-71.
135. Wang, G.R., et al., *Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 4888-93.
136. Ellinworth, D.C., et al., *Interactions between thromboxane A(2), thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(1): p. 9-16.
137. Naik, U.P., P.M. Patel, and L.V. Parise, *Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 4651-4.
138. Woulfe, D., J. Yang, and L. Brass, *ADP and platelets: the end of the beginning*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1503-5.
139. da Silva, C.G., et al., *Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells*. Circulation, 2009. **119**(6): p. 871-9.
140. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide*. Br J Pharmacol, 1987. **92**(3): p. 639-46.
141. Pappenheimer, J.R., E.M. Renkin, and L.M. Borrero, *Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability*. Am J Physiol, 1951. **167**(1): p. 13-46.
142. Yap, A.S., W.M. Briehar, and B.M. Gumbiner, *Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 119-46.
143. Lampugnani, M.G., et al., *A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts*. J Cell Biol, 1992. **118**(6): p. 1511-22.
144. Hordijk, P.L., et al., *Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 12)**: p. 1915-23.
145. Tiruppathi, C., et al., *Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability*. Microcirculation, 2006. **13**(8): p. 693-708.
146. Predescu, D. and G.E. Palade, *Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium*. Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 2): p. H725-33.
147. Simionescu, M., A. Gafencu, and F. Antohe, *Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey*. Microsc Res Tech, 2002. **57**(5): p. 269-88.
148. Oh, P., D.P. McIntosh, and J.E. Schnitzer, *Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium*. J Cell Biol, 1998. **141**(1): p. 101-14.

149. Gavard, J. and J.S. Gutkind, *VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1223-34.
150. Guyton, A.C., *The relationship of cardiac output and arterial pressure control*. Circulation, 1981. **64**(6): p. 1079-88.
151. Mayet, J. and A. Hughes, *Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension*. Heart, 2003. **89**(9): p. 1104-9.
152. Lacolley, P., et al., *The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(2): p. 194-204.
153. Kannel, W.B., *Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor*. Am J Cardiol, 2000. **85**(2): p. 251-5.
154. Edwards, G., M. Feletou, and A.H. Weston, *Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 863-79.
155. Raman, C.S., et al., *Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center*. Cell, 1998. **95**(7): p. 939-50.
156. Hevel, J.M., K.A. White, and M.A. Marletta, *Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 22789-91.
157. Mayer, B., et al., *Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase*. FEBS Lett, 1991. **288**(1-2): p. 187-91.
158. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-14.
159. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
160. Silva, B.R., L. Pernomian, and L.M. Bendhack, *Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 441.
161. Dixon, L.J., et al., *Functional consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling in congestive cardiac failure*. Circulation, 2003. **107**(13): p. 1725-8.
162. Tewari, K. and J.M. Simard, *Sodium nitroprusside and cGMP decrease Ca²⁺ channel availability in basilar artery smooth muscle cells*. Pflugers Arch, 1997. **433**(3): p. 304-11.
163. Yang, L., et al., *Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits*. Circ Res, 2007. **101**(5): p. 465-74.
164. Murthy, K.S. and H. Zhou, *Selective phosphorylation of the IP3R-I in vivo by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(2): p. G221-30.
165. Komalavilas, P. and T.M. Lincoln, *Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1994. **269**(12): p. 8701-7.
166. Cornwell, T.L., et al., *Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells*. Mol Pharmacol, 1991. **40**(6): p. 923-31.
167. Raeymaekers, L., F. Hofmann, and R. Casteels, *Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle*. Biochem J, 1988. **252**(1): p. 269-73.

168. Archer, S.L., et al., *Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(16): p. 7583-7.
169. Fellner, S.K. and W.J. Arendshorst, *Complex interactions of NO/cGMP/PKG systems on Ca²⁺ signaling in afferent arteriolar vascular smooth muscle*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(1): p. H144-51.
170. Rafikov, R., et al., *eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity*. J Endocrinol, 2011. **210**(3): p. 271-84.
171. Ju, H., et al., *Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18522-5.
172. Busconi, L. and T. Michel, *Endothelial nitric oxide synthase membrane targeting. Evidence against involvement of a specific myristate receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 25016-20.
173. Piazza, M., T. Dieckmann, and J.G. Guillemette, *Structural Studies of a Complex Between Endothelial Nitric Oxide Synthase and Calmodulin at Physiological Calcium Concentration*. Biochemistry, 2016.
174. Wu, P.R., et al., *Lobe-specific calcium binding in calmodulin regulates endothelial nitric oxide synthase activation*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39851.
175. Michel, J.B., et al., *Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15583-6.
176. Kobayashi, T., et al., *Involvement of CaM kinase II in the impairment of endothelial function and eNOS activity in aortas of Type 2 diabetic rats*. Clin Sci (Lond), 2012. **123**(6): p. 375-86.
177. Schneider, J.C., et al., *Involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. H2311-9.
178. Smith, W.L., Y. Urade, and P.J. Jakobsson, *Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 5821-65.
179. Caughey, G.E., et al., *Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2831-8.
180. Kawabe, J., F. Ushikubi, and N. Hasebe, *Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives*. Circ J, 2010. **74**(5): p. 836-43.
181. Lin, L., et al., *Expression of prostaglandin H₂-mediated mechanism of vascular contraction in hypertensive rats. Relation to lipoxygenase and prostacyclin synthase activities*. Circ Res, 1994. **74**(2): p. 197-205.
182. Dembinska-Kiec, A., W. Rucker, and P.S. Schonhofer, *Effects of PGI₂ and PGI analogues on cAMP levels in cultured endothelial and smooth muscle cells derived from bovine arteries*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1980. **311**(1): p. 67-70.
183. Shimokawa, H., et al., *Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig*. Br J Pharmacol, 1988. **95**(4): p. 1197-203.
184. Holzmann, S., W.R. Kukovetz, and K. Schmidt, *Mode of action of coronary arterial relaxation by prostacyclin*. J Cyclic Nucleotide Res, 1980. **6**(6): p. 451-60.

185. Cheng, X., et al., *Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(7): p. 651-62.
186. Schubert, R., et al., *Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 2): p. H1147-56.
187. White, R.E., et al., *cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells*. Circ Res, 2000. **86**(8): p. 897-905.
188. Jackson, W.F., et al., *Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels*. Am J Physiol, 1993. **264**(1 Pt 2): p. H238-43.
189. Orie, N.N., C.H. Fry, and L.H. Clapp, *Evidence that inward rectifier K⁺ channels mediate relaxation by the PGI₂ receptor agonist cicaprost via a cyclic AMP-independent mechanism*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(1): p. 107-15.
190. Cuinas, A., et al., *Activation of PKA and Epac proteins by cyclic AMP depletes intracellular calcium stores and reduces calcium availability for vasoconstriction*. Life Sci, 2016. **155**: p. 102-9.
191. Griffith, T.M., *Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?* Br J Pharmacol, 2004. **141**(6): p. 881-903.
192. Scotland, R.S., et al., *Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo*. Circulation, 2005. **111**(6): p. 796-803.
193. Feletou, M., *Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options?* Br J Pharmacol, 2009. **156**(4): p. 545-62.
194. Xia, X.M., et al., *Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 503-7.
195. Fanger, C.M., et al., *Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5746-54.
196. Sandow, S.L., et al., *Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K(Ca)) and connexins: possible relationship to vasodilator function?* J Anat, 2006. **209**(5): p. 689-98.
197. Ledoux, J., et al., *Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(28): p. 9627-32.
198. Dora, K.A., et al., *Modulation of endothelial cell KCa3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries*. Circ Res, 2008. **102**(10): p. 1247-55.
199. Smith, P.D., et al., *KIR channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle*. J Physiol, 2008. **586**(4): p. 1147-60.
200. Edwards, G., et al., *K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries*. Nature, 1998. **396**(6708): p. 269-72.
201. Weston, A.H., et al., *Impairment of endothelial SK(Ca) channels and of downstream hyperpolarizing pathways in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(4): p. 836-43.

202. Morth, J.P., et al., *A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(1): p. 60-70.
203. Dora, K.A., N.T. Ings, and C.J. Garland, *K(Ca) channel blockers reveal hyperpolarization and relaxation to K⁺ in rat isolated mesenteric artery*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(2): p. H606-14.
204. Eckman, D.M. and M.T. Nelson, *Potassium ions as vasodilators: role of inward rectifier potassium channels*. Circ Res, 2001. **88**(2): p. 132-3.
205. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(6): p. 1215-25.
206. Adeagbo, A.S. and M.K. Henzel, *Calcium-dependent phospholipase A2 mediates the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor in perfused rat mesenteric prearteriolar bed*. J Vasc Res, 1998. **35**(1): p. 27-35.
207. Bauersachs, J., M. Hecker, and R. Busse, *Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation*. Br J Pharmacol, 1994. **113**(4): p. 1548-53.
208. Fisslthaler, B., et al., *Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 493-7.
209. Rosolowsky, M. and W.B. Campbell, *Role of PGI2 and epoxyeicosatrienoic acids in relaxation of bovine coronary arteries to arachidonic acid*. Am J Physiol, 1993. **264**(2 Pt 2): p. H327-35.
210. Zink, M.H., et al., *12-lipoxygenase in porcine coronary microcirculation: implications for coronary vasoregulation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(2): p. H693-704.
211. Zhang, D.X., et al., *Cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent relaxation to arachidonic acid in rabbit small mesenteric arteries*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(1): p. H302-9.
212. Li, P.L. and W.B. Campbell, *Epoxyeicosatrienoic acids activate K⁺ channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein*. Circ Res, 1997. **80**(6): p. 877-84.
213. Campbell, W.B., et al., *Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors*. Circ Res, 1996. **78**(3): p. 415-23.
214. Hu, S. and H.S. Kim, *Activation of K⁺ channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid*. Eur J Pharmacol, 1993. **230**(2): p. 215-21.
215. Armogida, M., R. Nistico, and N.B. Mercuri, *Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(4): p. 1211-24.
216. Shimokawa, H. and K. Morikawa, *Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(5): p. 725-32.
217. Edwards, D.H., Y. Li, and T.M. Griffith, *Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca²⁺ mobilization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(10): p. 1774-81.

218. Sobey, C.G., D.D. Heistad, and F.M. Faraci, *Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels*. Stroke, 1997. **28**(11): p. 2290-4; discussion 2295.
219. Bychkov, R., et al., *Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells*. Circulation, 1999. **99**(13): p. 1719-25.
220. Liu, Y., et al., *H₂O₂ is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles*. Circ Res, 2011. **108**(5): p. 566-73.
221. Drouin, A., et al., *Up-regulation of thromboxane A₂ impairs cerebrovascular eNOS function in aging atherosclerotic mice*. Pflugers Arch, 2011. **462**(3): p. 371-83.
222. Gendron, M.E. and E. Thorin, *A change in the redox environment and thromboxane A₂ production precede endothelial dysfunction in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(4): p. H2508-15.
223. Auch-Schwelk, W., Z.S. Katusic, and P.M. Vanhoutte, *Nitric oxide inactivates endothelium-derived contracting factor in the rat aorta*. Hypertension, 1992. **19**(5): p. 442-5.
224. Feletou, M., E.H. Tang, and P.M. Vanhoutte, *Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4198-217.
225. Huang, J.S., et al., *Cell signalling through thromboxane A₂ receptors*. Cell Signal, 2004. **16**(5): p. 521-33.
226. Suzuki, K., S.Y. Saito, and T. Ishikawa, *Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in thromboxane A₂ receptor-mediated extracellular Ca²⁺(+) influx in rat aorta*. Eur J Pharmacol, 2012. **677**(1-3): p. 123-30.
227. Dorn, G.W., 2nd and M.W. Becker, *Thromboxane A₂ stimulated signal transduction in vascular smooth muscle*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **265**(1): p. 447-56.
228. Momotani, K., et al., *p63RhoGEF couples Galpha(q/11)-mediated signaling to Ca²⁺ sensitization of vascular smooth muscle contractility*. Circ Res, 2011. **109**(9): p. 993-1002.
229. Tsai, M.H. and M.J. Jiang, *Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction*. Pflugers Arch, 2006. **453**(2): p. 223-32.
230. Crane, G.J. and C.J. Garland, *Thromboxane receptor stimulation associated with loss of SKCa activity and reduced EDHF responses in the rat isolated mesenteric artery*. Br J Pharmacol, 2004. **142**(1): p. 43-50.
231. Scornik, F.S. and L. Toro, *U46619, a thromboxane A₂ agonist, inhibits KCa channel activity from pig coronary artery*. Am J Physiol, 1992. **262**(3 Pt 1): p. C708-13.
232. Giani, J.F., et al., *Renal generation of angiotensin II and the pathogenesis of hypertension*. Curr Hypertens Rep, 2014. **16**(9): p. 477.
233. Gruetter, C.A., et al., *Endothelium-dependent modulation of angiotensin II-induced contraction in blood vessels*. Eur J Pharmacol, 1988. **146**(1): p. 85-95.
234. Skinner, S.L., J.W. McCubbin, and I.H. Page, *Control of Renin Secretion*. Circ Res, 1964. **15**: p. 64-76.
235. de Senarclens, C.F., et al., *Renin synthesis, storage, and release in the rat: a morphological and biochemical study*. Kidney Int, 1977. **11**(3): p. 161-9.
236. Matsusaka, T., et al., *Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(7): p. 1181-9.
237. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. Physiol Rev, 2006. **86**(3): p. 747-803.

238. Pueyo, M.E., N. N'Diaye, and J.B. Michel, *Angiotensin II-elicited signal transduction via AT1 receptors in endothelial cells*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(1): p. 79-84.
239. Lohmeier, T.E., *Angiotensin II infusion model of hypertension: is there an important sympathetic component?* Hypertension, 2012. **59**(3): p. 539-41.
240. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
241. Khalil, R.A., *Modulators of the vascular endothelin receptor in blood pressure regulation and hypertension*. Curr Mol Pharmacol, 2011. **4**(3): p. 176-86.
242. Schneider, M.P., E.I. Boesen, and D.M. Pollock, *Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 731-59.
243. Ko, E.A., et al., *Endothelin-1 increases intracellular Ca(2+) in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells through phospholipase C*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(4): p. H1551-9.
244. Araki, S., et al., *Stimulation of phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphoinositides by endothelin in cultured rabbit aortic smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **159**(3): p. 1072-9.
245. Kodama, M., H. Yamamoto, and H. Kanaide, *Myosin phosphorylation and Ca2+ sensitization in porcine coronary arterial smooth muscle stimulated with endothelin-1*. Eur J Pharmacol, 1994. **288**(1): p. 69-77.
246. Lavallee, M., et al., *Crosstalk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone*. Heart Fail Rev, 2001. **6**(4): p. 265-76.
247. Boulanger, C. and T.F. Luscher, *Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide*. J Clin Invest, 1990. **85**(2): p. 587-90.
248. Brunner, F., *Interaction of nitric oxide and endothelin-1 in ischemia/reperfusion injury of rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(9): p. 2363-74.
249. Marsen, T.A., et al., *Tyrosine-kinase-dependent regulation of the nitric oxide synthase gene by endothelin-1 in human endothelial cells*. Pflugers Arch, 1999. **438**(4): p. 538-44.
250. Liu, S., et al., *Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49929-35.
251. Zheng, J.S., et al., *Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension*. Circulation, 2003. **108**(10): p. 1238-45.
252. Bohm, F. and J. Pernow, *The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease*. Cardiovasc Res, 2007. **76**(1): p. 8-18.
253. Hardingham, G.E. and H. Bading, *Calcium as a versatile second messenger in the control of gene expression*. Microsc Res Tech, 1999. **46**(6): p. 348-55.
254. Rasmussen, H., et al., *Calcium ion as second messenger*. Clin Endocrinol (Oxf), 1976. **5 Suppl**: p. 11S-27S.
255. Endo, M., *Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling*. J Pharmacol Sci, 2006. **100**(5): p. 519-24.
256. Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera, *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 552-65.

257. Trump, B.F. and I.K. Berezsky, *Calcium-mediated cell injury and cell death*. FASEB J, 1995. **9**(2): p. 219-28.
258. Nelson, M., et al., *Spinning Disk Confocal Microscopy of Calcium Signalling in Blood Vessel Walls*. Microsc Anal (Am Ed), 2010. **24**(2): p. 5-8.
259. Tanaami, T., et al., *High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks*. Appl Opt, 2002. **41**(22): p. 4704-8.
260. Echevarria, W., et al., *Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 440-6.
261. Usachev, Y.M., S.M. Marchenko, and S.O. Sage, *Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta*. J Physiol, 1995. **489** (Pt 2): p. 309-17.
262. Schwarz, D.S. and M.D. Blower, *The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(1): p. 79-94.
263. Fagone, P. and S. Jackowski, *Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function*. J Lipid Res, 2009. **50** Suppl: p. S311-6.
264. Wood, P.G. and J.I. Gillespie, *Evidence for mitochondrial Ca(2+)-induced Ca2+ release in permeabilised endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**(2): p. 543-8.
265. Yu, R. and P.M. Hinkle, *Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies with cameleon calcium indicators*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23648-53.
266. Sambrook, J.F., *The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum*. Cell, 1990. **61**(2): p. 197-9.
267. Roderick, H.L., J.D. Lechleiter, and P. Camacho, *Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b*. J Cell Biol, 2000. **149**(6): p. 1235-48.
268. Michalak, M., et al., *Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum*. Biochem J, 2009. **417**(3): p. 651-66.
269. Bedard, K., et al., *Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57*. Int Rev Cytol, 2005. **245**: p. 91-121.
270. Petersen, O.H., A. Tepikin, and M.K. Park, *The endoplasmic reticulum: one continuous or several separate Ca(2+) stores?* Trends Neurosci, 2001. **24**(5): p. 271-6.
271. Papp, S., et al., *Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca2+-handling proteins*. J Cell Biol, 2003. **160**(4): p. 475-9.
272. Santulli, G., et al., *Intracellular calcium release channels: an update*. J Physiol, 2017.
273. Neylon, C.B. and R.F. Irvine, *Synchronized repetitive spikes in cytoplasmic calcium in confluent monolayers of human umbilical vein endothelial cells*. FEBS Lett, 1990. **275**(1-2): p. 173-6.
274. Ziegelstein, R.C., et al., *A functional ryanodine-sensitive intracellular Ca2+ store is present in vascular endothelial cells*. Circ Res, 1994. **74**(1): p. 151-6.
275. Kansui, Y., C.J. Garland, and K.A. Dora, *Enhanced spontaneous Ca2+ events in endothelial cells reflect signalling through myoendothelial gap junctions in pressurized mesenteric arteries*. Cell Calcium, 2008. **44**(2): p. 135-46.
276. Tran, C.H., et al., *Endothelial Ca2+ wavelets and the induction of myoendothelial feedback*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(8): p. C1226-42.

277. Wilson, C., et al., *Clusters of specialized detector cells provide sensitive and high fidelity receptor signaling in the intact endothelium*. FASEB J, 2016. **30**(5): p. 2000-13.
278. Francis, M., et al., *Functional Tuning of Intrinsic Endothelial Ca²⁺ Dynamics in Swine Coronary Arteries*. Circ Res, 2016. **118**(7): p. 1078-90.
279. Streb, H., et al., *Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate*. Nature, 1983. **306**(5938): p. 67-9.
280. Supattapone, S., et al., *Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor*. J Biol Chem, 1988. **263**(3): p. 1530-4.
281. Blondel, O., et al., *Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP₃R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11356-63.
282. Tu, H., et al., *Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms*. Biophys J, 2005. **88**(2): p. 1046-55.
283. Miyakawa, T., et al., *Encoding of Ca²⁺ signals by differential expression of IP₃ receptor subtypes*. EMBO J, 1999. **18**(5): p. 1303-8.
284. Monkawa, T., et al., *Heterotetrameric complex formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunits*. J Biol Chem, 1995. **270**(24): p. 14700-4.
285. Bosanac, I., et al., *Structural insights into the regulatory mechanism of IP₃ receptor*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1742**(1-3): p. 89-102.
286. Hamada, K., A. Terauchi, and K. Mikoshiba, *Three-dimensional rearrangements within inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by calcium*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52881-9.
287. Bansaghi, S., et al., *Isoform- and species-specific control of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors by reactive oxygen species*. J Biol Chem, 2014. **289**(12): p. 8170-81.
288. Mak, D.O., S. McBride, and J.K. Foskett, *Inositol 1,4,5-trisphosphate [correction of tris-phosphate] activation of inositol trisphosphate [correction of tris-phosphate] receptor Ca²⁺ channel by ligand tuning of Ca²⁺ inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15821-5.
289. Adkins, C.E. and C.W. Taylor, *Lateral inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cytosolic Ca(2+)*. Curr Biol, 1999. **9**(19): p. 1115-8.
290. Mak, D.O., S.M. McBride, and J.K. Foskett, *Spontaneous channel activity of the inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor (InsP₃R). Application of allosteric modeling to calcium and InsP₃ regulation of InsP₃R single-channel gating*. J Gen Physiol, 2003. **122**(5): p. 583-603.
291. Bezprozvanny, I., J. Watras, and B.E. Ehrlich, *Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum*. Nature, 1991. **351**(6329): p. 751-4.
292. Rahman, T., *Dynamic clustering of IP₃ receptors by IP₃*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(2): p. 325-30.
293. Caroppo, R., et al., *A reassessment of the effects of luminal [Ca²⁺] on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release from internal stores*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39503-8.

294. Nunn, D.L. and C.W. Taylor, *Luminal Ca²⁺ increases the sensitivity of Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate*. *Mol Pharmacol*, 1992. **41**(1): p. 115-9.
295. Higo, T., et al., *Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44*. *Cell*, 2005. **120**(1): p. 85-98.
296. Shuttleworth, T.J., *Ca²⁺ release from inositol trisphosphate-sensitive stores is not modulated by intraluminal [Ca²⁺]*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(6): p. 3573-6.
297. Shuttleworth, T.J., *A re-evaluation of the apparent effects of luminal Ca²⁺ on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release*. *Cell Calcium*, 1995. **17**(6): p. 393-8.
298. Zhang, S., et al., *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype-specific regulation of calcium oscillations*. *Neurochem Res*, 2011. **36**(7): p. 1175-85.
299. Newton, C.L., G.A. Mignery, and T.C. Sudhof, *Co-expression in vertebrate tissues and cell lines of multiple inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptors with distinct affinities for InsP3*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(46): p. 28613-9.
300. Alzayady, K.J., et al., *Defining the stoichiometry of inositol 1,4,5-trisphosphate binding required to initiate Ca²⁺ release*. *Sci Signal*, 2016. **9**(422): p. ra35.
301. Dickinson, G.D., et al., *Hindered cytoplasmic diffusion of inositol trisphosphate restricts its cellular range of action*. *Sci Signal*, 2016. **9**(453): p. ra108.
302. Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram, *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease*. *Muscle Nerve*, 2007. **35**(4): p. 430-42.
303. Moller, J.V., et al., *The sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase: design of a perfect chemi-osmotic pump*. *Q Rev Biophys*, 2010. **43**(4): p. 501-66.
304. Smith, I.C., et al., *ATP consumption by sarcoplasmic reticulum Ca(2)(+) pumps accounts for 40-50% of resting metabolic rate in mouse fast and slow twitch skeletal muscle*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e68924.
305. Rossi, A.E., S. Boncompagni, and R.T. Dirksen, *Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial symbiosis: bidirectional signaling in skeletal muscle*. *Exerc Sport Sci Rev*, 2009. **37**(1): p. 29-35.
306. Espinoza-Fonseca, L.M., J.M. Autry, and D.D. Thomas, *Sarcolipin and phospholamban inhibit the calcium pump by populating a similar metal ion-free intermediate state*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **463**(1-2): p. 37-41.
307. Shaikh, S.A., S.K. Sahoo, and M. Periasamy, *Phospholamban and sarcolipin: Are they functionally redundant or distinct regulators of the Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Calcium ATPase?* *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **91**: p. 81-91.
308. MacLennan, D.H. and E.G. Kranias, *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(7): p. 566-77.
309. Kranias, E.G. and R.J. Hajjar, *Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome*. *Circ Res*, 2012. **110**(12): p. 1646-60.
310. Bluhm, W.F., et al., *Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(1): p. H249-55.
311. Young, H.S., D.K. Ceholski, and C.A. Trieber, *Deception in simplicity: hereditary phospholamban mutations in dilated cardiomyopathy*. *Biochem Cell Biol*, 2015. **93**(1): p. 1-7.
312. Haghghi, K., et al., *Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(6): p. 869-76.

313. Netticadan, T., et al., *Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase is altered in heart failure*. *Circ Res*, 2000. **86**(5): p. 596-605.
314. Sande, J.B., et al., *Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(2): p. 382-91.
315. Gustavsson, M., et al., *Allosteric regulation of SERCA by phosphorylation-mediated conformational shift of phospholamban*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(43): p. 17338-43.
316. Karczewski, P., et al., *Site-specific phosphorylation of a phospholamban peptide by cyclic nucleotide- and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases of cardiac sarcoplasmic reticulum*. *Basic Res Cardiol*, 1997. **92 Suppl 1**: p. 37-43.
317. Wegener, A.D., et al., *Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(19): p. 11468-74.
318. Cornea, R.L., et al., *Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers*. *Biochemistry*, 1997. **36**(10): p. 2960-7.
319. Toyofuku, T., et al., *Identification of regions in the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum that affect functional association with phospholamban*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(4): p. 2809-15.
320. Toyofuku, T., et al., *Amino acids Glu2 to Ile18 in the cytoplasmic domain of phospholamban are essential for functional association with the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(4): p. 3088-94.
321. Barnes, K.A., S.E. Samson, and A.K. Grover, *Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-pump isoform SERCA3a is more resistant to superoxide damage than SERCA2b*. *Mol Cell Biochem*, 2000. **203**(1-2): p. 17-21.
322. Grover, A.K., S.E. Samson, and C.M. Misquitta, *Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ pump isoform SERCA3 is more resistant than SERCA2b to peroxide*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(2 Pt 1): p. C420-5.
323. Mountian, I., et al., *Expression patterns of sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in vascular endothelial cells*. *Cell Calcium*, 1999. **25**(5): p. 371-80.
324. Khan, I., et al., *SERCA pump isoform expression in endothelium of veins and arteries: every endothelium is not the same*. *Mol Cell Biochem*, 2000. **203**(1-2): p. 11-5.
325. Anger, M., et al., *The sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase mRNA isoform, SERCA 3, is expressed in endothelial and epithelial cells in various organs*. *FEBS Lett*, 1993. **334**(1): p. 45-8.
326. Contreras, L., et al., *Mitochondria: the calcium connection*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1797**(6-7): p. 607-18.
327. Szabadkai, G. and M.R. Duchen, *Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling*. *Physiology (Bethesda)*, 2008. **23**: p. 84-94.
328. Sullivan, M.N. and S. Earley, *TRP channel Ca(2+) sparklets: fundamental signals underlying endothelium-dependent hyperpolarization*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013. **305**(10): p. C999-C1008.
329. Asanov, A., et al., *Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels*. *Cell Calcium*, 2015. **57**(1): p. 1-13.

330. Earley, S. and J.E. Brayden, *Transient receptor potential channels in the vasculature*. *Physiol Rev*, 2015. **95**(2): p. 645-90.
331. Kwan, H.Y., Y. Huang, and X. Yao, *TRP channels in endothelial function and dysfunction*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1772**(8): p. 907-14.
332. Huang, J., X. Zhang, and P.A. McNaughton, *Modulation of temperature-sensitive TRP channels*. *Semin Cell Dev Biol*, 2006. **17**(6): p. 638-45.
333. Pedersen, S.F. and B. Nilius, *Transient receptor potential channels in mechanosensing and cell volume regulation*. *Methods Enzymol*, 2007. **428**: p. 183-207.
334. Stathopoulos, P.B., et al., *Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(47): p. 35855-62.
335. Feske, S. and M. Prakriya, *Conformational dynamics of STIM1 activation*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(8): p. 918-9.
336. Huang, G.N., et al., *STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(9): p. 1003-10.
337. Zhang, S.L., et al., *STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane*. *Nature*, 2005. **437**(7060): p. 902-5.
338. Bird, G.S., et al., *Methods for studying store-operated calcium entry*. *Methods*, 2008. **46**(3): p. 204-12.
339. Trebak, M., *STIM1/Orai1, ICRAC, and endothelial SOC*. *Circ Res*, 2009. **104**(9): p. e56-7.
340. El Boustany, C., et al., *Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation*. *Hepatology*, 2008. **47**(6): p. 2068-77.
341. Hogan, P.G. and A. Rao, *Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **460**(1): p. 40-9.
342. Hogan, P.G. and A. Rao, *Dissecting ICRAC, a store-operated calcium current*. *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(5): p. 235-45.
343. Sweadner, K.J. and C. Donnet, *Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca(2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum*. *Biochem J*, 2001. **356**(Pt 3): p. 685-704.
344. Graupner, M., F. Ertler, and M. Meyer-Hermann, *A theory of plasma membrane calcium pump stimulation and activity*. *J Biol Phys*, 2005. **31**(2): p. 183-206.
345. Enyedi, A., et al., *The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(13): p. 6425-30.
346. Di Leva, F., et al., *The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation*. *Arch Biochem Biophys*, 2008. **476**(1): p. 65-74.
347. Penniston, J.T. and A. Enyedi, *Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump*. *J Membr Biol*, 1998. **165**(2): p. 101-9.
348. Moe, M.K., et al., *Total structure characterization of unsaturated acidic phospholipids provided by vicinal di-hydroxylation of fatty acid double bonds and negative electrospray ionization mass spectrometry*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005. **16**(1): p. 46-59.

349. Mangialavori, I., et al., *Determination of the dissociation constants for Ca²⁺ and calmodulin from the plasma membrane Ca²⁺ pump by a lipid probe that senses membrane domain changes.* J Biol Chem, 2010. **285**(1): p. 123-30.
350. Krebs, J., *The plethora of PMCA isoforms: Alternative splicing and differential expression.* Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(9): p. 2018-24.
351. Szewczyk, M.M., et al., *Ca²⁺-pumps and Na²⁺-Ca²⁺-exchangers in coronary artery endothelium versus smooth muscle.* J Cell Mol Med, 2007. **11**(1): p. 129-38.
352. Tran, Q.K., et al., *Hetero-oligomeric Complex between the G Protein-coupled Estrogen Receptor 1 and the Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase 4b.* J Biol Chem, 2015. **290**(21): p. 13293-307.
353. Enyedi, A., et al., *The Ca²⁺ affinity of the plasma membrane Ca²⁺ pump is controlled by alternative splicing.* J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 41-3.
354. Elwess, N.L., et al., *Plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca²⁺.* J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 17981-6.
355. Sepulveda, M.R., et al., *The plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes.* J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 447-53.
356. Klishin, A., M. Sedova, and L.A. Blatter, *Time-dependent modulation of capacitative Ca²⁺ entry signals by plasma membrane Ca²⁺ pump in endothelium.* Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 1): p. C1117-28.
357. Paszty, K., et al., *Plasma membrane Ca(2)(+)-ATPases can shape the pattern of Ca(2)(+) transients induced by store-operated Ca(2)(+) entry.* Sci Signal, 2015. **8**(364): p. ra19.
358. Reuter, H. and N. Seitz, *The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition.* J Physiol, 1968. **195**(2): p. 451-70.
359. Baker, P.F., et al., *The influence of calcium on sodium efflux in squid axons.* J Physiol, 1969. **200**(2): p. 431-58.
360. Reeves, J.P. and C.C. Hale, *The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system.* J Biol Chem, 1984. **259**(12): p. 7733-9.
361. Lederer, W.J., E. Niggli, and R.W. Hadley, *Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space.* Science, 1990. **248**(4953): p. 283.
362. Dipla, K., et al., *The sarcoplasmic reticulum and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger both contribute to the Ca²⁺ transient of failing human ventricular myocytes.* Circ Res, 1999. **84**(4): p. 435-44.
363. Chen, S. and S. Li, *The Na⁺/Ca(2)⁺ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury.* Med Sci Monit, 2012. **18**(11): p. RA161-5.
364. Blaustein, M.P. and W.J. Lederer, *Sodium/calcium exchange: its physiological implications.* Physiol Rev, 1999. **79**(3): p. 763-854.
365. Quednau, B.D., D.A. Nicoll, and K.D. Philipson, *Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat.* Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 1): p. C1250-61.
366. Giladi, M., I. Tal, and D. Khananshvili, *Structural Features of Ion Transport and Allosteric Regulation in Sodium-Calcium Exchanger (NCX) Proteins.* Front Physiol, 2016. **7**: p. 30.

367. Sedova, M. and L.A. Blatter, *Dynamic regulation of $[Ca^{2+}]_i$ by plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and Na^+/Ca^{2+} exchange during capacitative Ca^{2+} entry in bovine vascular endothelial cells*. Cell Calcium, 1999. **25**(5): p. 333-43.
368. Wang, X., et al., *Ca^{2+} removal mechanisms in freshly isolated rabbit aortic endothelial cells*. Cell Calcium, 2002. **31**(6): p. 265-77.
369. Dupont, G., L. Combettes, and L. Leybaert, *Calcium dynamics: spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level*. Int Rev Cytol, 2007. **261**: p. 193-245.
370. Taylor, M.S., et al., *Dynamic Ca^{2+} signal modalities in the vascular endothelium*. Microcirculation, 2012. **19**(5): p. 423-9.
371. Busse, R., et al., *Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells*. Am J Physiol, 1988. **255**(4 Pt 2): p. H965-9.
372. Colden-Stanfield, M., et al., *Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells*. Circ Res, 1987. **61**(5): p. 632-40.
373. Shen, J., et al., *Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells*. Am J Physiol, 1992. **262**(2 Pt 1): p. C384-90.
374. Haga, T., *Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2013. **89**(6): p. 226-56.
375. Werry, T.D., G.F. Wilkinson, and G.B. Willars, *Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca^{2+}* . Biochem J, 2003. **374**(Pt 2): p. 281-96.
376. Steinberg, S.F., *Structural basis of protein kinase C isoform function*. Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1341-78.
377. Aromolaran, A.A. and L.A. Blatter, *Modulation of intracellular Ca^{2+} release and capacitative Ca^{2+} entry by CaMKII inhibitors in bovine vascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(6): p. C1426-36.
378. Himmel, H.M., A.R. Whorton, and H.C. Strauss, *Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells*. Hypertension, 1993. **21**(1): p. 112-27.
379. Kerem, A., et al., *Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca^{2+} signaling and cytoskeletal reorganization*. Circ Res, 2010. **106**(6): p. 1103-16.
380. Wang, L.Y., et al., *Reduction of Store-Operated Ca^{2+} Entry Correlates with Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Atherosclerotic Mice*. Stem Cells Dev, 2015. **24**(13): p. 1582-90.
381. Billaud, M., et al., *Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(2): p. 513-69.
382. Isakson, B.E., *Localized expression of an $Ins(1,4,5)P_3$ receptor at the myoendothelial junction selectively regulates heterocellular Ca^{2+} communication*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 21): p. 3664-73.
383. Lamboley, M., et al., *Evidence for signaling via gap junctions from smooth muscle to endothelial cells in rat mesenteric arteries: possible implication of a second messenger*. Cell Calcium, 2005. **37**(4): p. 311-20.
384. Yashiro, Y. and B.R. Duling, *Integrated Ca^{2+} signaling between smooth muscle and endothelium of resistance vessels*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 1048-54.

385. Abe, K., H. Saito, and N. Matsuki, *Changes in intracellular free Ca²⁺ concentration by activation of alpha-adrenoceptors in rat tail artery*. Jpn J Pharmacol, 1990. **52**(2): p. 337-44.
386. Navedo, M.F., et al., *Mechanisms underlying heterogeneous Ca²⁺ sparklet activity in arterial smooth muscle*. J Gen Physiol, 2006. **127**(6): p. 611-22.
387. Navedo, M.F., et al., *Constitutively active L-type Ca²⁺ channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11112-7.
388. Wang, S.Q., et al., *Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells*. Nature, 2001. **410**(6828): p. 592-6.
389. Essin, K., et al., *Indirect coupling between Cav1.2 channels and ryanodine receptors to generate Ca²⁺ sparks in murine arterial smooth muscle cells*. J Physiol, 2007. **584**(Pt 1): p. 205-19.
390. O'Neil, R.G. and S. Heller, *The mechanosensitive nature of TRPV channels*. Pflugers Arch, 2005. **451**(1): p. 193-203.
391. Sonkusare, S.K., et al., *Elementary Ca²⁺ signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function*. Science, 2012. **336**(6081): p. 597-601.
392. Jin, M., et al., *Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16713.
393. Sonkusare, S.K., et al., *AKAP150-dependent cooperative TRPV4 channel gating is central to endothelium-dependent vasodilation and is disrupted in hypertension*. Sci Signal, 2014. **7**(333): p. ra66.
394. Mercado, J., et al., *Local control of TRPV4 channels by AKAP150-targeted PKC in arterial smooth muscle*. J Gen Physiol, 2014. **143**(5): p. 559-75.
395. Earley, S., A.L. Gonzales, and R. Crnich, *Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels*. Circ Res, 2009. **104**(8): p. 987-94.
396. Qian, X., et al., *Recruitment of dynamic endothelial Ca²⁺ signals by the TRPA1 channel activator AITC in rat cerebral arteries*. Microcirculation, 2013. **20**(2): p. 138-48.
397. Demuro, A. and I. Parker, *Imaging single-channel calcium microdomains*. Cell Calcium, 2006. **40**(5-6): p. 413-22.
398. Sullivan, M.N., et al., *Localized TRPA1 channel Ca²⁺ signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation*. Sci Signal, 2015. **8**(358): p. ra2.
399. Andersson, D.A., et al., *Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress*. J Neurosci, 2008. **28**(10): p. 2485-94.
400. Bootman, M.D., M.J. Berridge, and P. Lipp, *Cooking with calcium: the recipes for composing global signals from elementary events*. Cell, 1997. **91**(3): p. 367-73.
401. Parker, I., J. Choi, and Y. Yao, *Elementary events of InsP3-induced Ca²⁺ liberation in Xenopus oocytes: hot spots, puffs and blips*. Cell Calcium, 1996. **20**(2): p. 105-21.
402. Huser, J. and L.A. Blatter, *Elementary events of agonist-induced Ca²⁺ release in vascular endothelial cells*. Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 1): p. C1775-82.
403. Burdyga, T., et al., *A new technique for simultaneous and in situ measurements of Ca²⁺ signals in arteriolar smooth muscle and endothelial cells*. Cell Calcium, 2003. **34**(1): p. 27-33.

404. Bennett, M.K., N.E. Erondy, and M.B. Kennedy, *Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain*. J Biol Chem, 1983. **258**(20): p. 12735-44.
405. Erondy, N.E. and M.B. Kennedy, *Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain*. J Neurosci, 1985. **5**(12): p. 3270-7.
406. Katz, B. and R. Miledi, *The Effect of Calcium on Acetylcholine Release from Motor Nerve Terminals*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1965. **161**: p. 496-503.
407. Baker, P.F., A.L. Hodgkin, and E.B. Ridgway, *Depolarization and calcium entry in squid giant axons*. J Physiol, 1971. **218**(3): p. 709-55.
408. Huttner, W.B. and P. Greengard, *Multiple phosphorylation sites in protein I and their differential regulation by cyclic AMP and calcium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(10): p. 5402-6.
409. Shields, S.M., P.J. Vernon, and P.T. Kelly, *Autophosphorylation of calmodulin-kinase II in synaptic junctions modulates endogenous kinase activity*. J Neurochem, 1984. **43**(6): p. 1599-609.
410. Swulius, M.T. and M.N. Waxham, *Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(17): p. 2637-57.
411. Morris, E.P. and K. Torok, *Oligomeric structure of alpha-calmodulin-dependent protein kinase II*. J Mol Biol, 2001. **308**(1): p. 1-8.
412. Brocke, L., et al., *Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22713-22.
413. Gray, C.B. and J. Heller Brown, *CaMKIIdelta subtypes: localization and function*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 15.
414. Zheng, J., et al., *Alternative splicing in the variable domain of CaMKIIbeta affects the level of F-actin association in developing neurons*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(6): p. 2963-75.
415. Bayer, K.U., P. De Koninck, and H. Schulman, *Alternative splicing modulates the frequency-dependent response of CaMKII to Ca(2+) oscillations*. EMBO J, 2002. **21**(14): p. 3590-7.
416. Srinivasan, M., C.F. Edman, and H. Schulman, *Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus*. J Cell Biol, 1994. **126**(4): p. 839-52.
417. Shen, K. and T. Meyer, *Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation*. Science, 1999. **284**(5411): p. 162-6.
418. Borgesius, N.Z., et al., *betaCaMKII plays a nonenzymatic role in hippocampal synaptic plasticity and learning by targeting alphaCaMKII to synapses*. J Neurosci, 2011. **31**(28): p. 10141-8.
419. Kwiatkowski, A.P. and J.M. McGill, *Alternative splice variant of gamma-calmodulin-dependent protein kinase II alters activation by calmodulin*. Arch Biochem Biophys, 2000. **378**(2): p. 377-83.
420. De Koninck, P. and H. Schulman, *Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations*. Science, 1998. **279**(5348): p. 227-30.
421. Bayer, K.U., K. Harbers, and H. Schulman, *alphaKAP is an anchoring protein for a novel CaM kinase II isoform in skeletal muscle*. EMBO J, 1998. **17**(19): p. 5598-605.

422. Hoffman, L., et al., *Conformational changes underlying calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation*. EMBO J, 2011. **30**(7): p. 1251-62.
423. Chao, L.H., et al., *A mechanism for tunable autoinhibition in the structure of a human Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II holoenzyme*. Cell, 2011. **146**(5): p. 732-45.
424. Meyer, T., et al., *Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase*. Science, 1992. **256**(5060): p. 1199-202.
425. Lai, Y., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: identification of autophosphorylation sites responsible for generation of Ca²⁺/calmodulin-independence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5710-4.
426. Thiel, G., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: identification of threonine-286 as the autophosphorylation site in the alpha subunit associated with the generation of Ca²⁺-independent activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(17): p. 6337-41.
427. Hudmon, A. and H. Schulman, *Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. Biochem J, 2002. **364**(Pt 3): p. 593-611.
428. Strack, S., et al., *Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A*. J Neurochem, 1997. **68**(5): p. 2119-28.
429. Fukunaga, K., et al., *Dephosphorylation of autophosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 2C*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 133-7.
430. Hanson, P.I. and H. Schulman, *Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17216-24.
431. Patton, B.L., S.G. Miller, and M.B. Kennedy, *Activation of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase by Ca²⁺/calmodulin is inhibited by autophosphorylation of threonine within the calmodulin-binding domain*. J Biol Chem, 1990. **265**(19): p. 11204-12.
432. Colbran, R.J., *Inactivation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by basal autophosphorylation*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7163-70.
433. Howe, C.J., et al., *Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44573-81.
434. Li, H., S. Horke, and U. Forstermann, *Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(6): p. 313-9.
435. Erickson, J.R., et al., *A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation*. Cell, 2008. **133**(3): p. 462-74.
436. Villamena, F.A., *Molecular Basis of Oxidative Stress: Chemistry, Mechanisms, and Diseases Pathogenesis*. 2013: John Wiley & son.
437. Tokumitsu, H., et al., *KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem, 1990. **265**(8): p. 4315-20.
438. Sumi, M., et al., *The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **181**(3): p. 968-75.

439. Ledoux, J., D. Chartier, and N. Leblanc, *Inhibitors of calmodulin-dependent protein kinase are nonspecific blockers of voltage-dependent K⁺ channels in vascular myocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(3): p. 1165-74.
440. Hegyi, B., et al., *KN-93 inhibits IKr in mammalian cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **89**(Pt B): p. 173-6.
441. Anderson, M.E., et al., *KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **287**(3): p. 996-1006.
442. Smith, M.K., R.J. Colbran, and T.R. Soderling, *Specificities of autoinhibitory domain peptides for four protein kinases. Implications for intact cell studies of protein kinase function*. J Biol Chem, 1990. **265**(4): p. 1837-40.
443. Ishida, A., et al., *A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **212**(3): p. 806-12.
444. Pellicena, P. and H. Schulman, *CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 21.
445. Hvalby, O., et al., *Specificity of protein kinase inhibitor peptides and induction of long-term potentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4761-5.
446. Smith, M.K., et al., *Functional determinants in the autoinhibitory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Role of His282 and multiple basic residues*. J Biol Chem, 1992. **267**(3): p. 1761-8.
447. Zhang, R., et al., *Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease*. Nat Med, 2005. **11**(4): p. 409-17.
448. Gomez-Monterrey, I., et al., *Characterization of a selective CaMKII peptide inhibitor*. Eur J Med Chem, 2013. **62**: p. 425-34.
449. Chang, B.H., S. Mukherji, and T.R. Soderling, *Characterization of a calmodulin kinase II inhibitor protein in brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10890-5.
450. Singh, M.V., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II triggers cell membrane injury by inducing complement factor B gene expression in the mouse heart*. J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 986-96.
451. Vest, R.S., et al., *Dual mechanism of a natural CaMKII inhibitor*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 5024-33.
452. Fukunaga, K., D. Muller, and E. Miyamoto, *CaM kinase II in long-term potentiation*. Neurochem Int, 1996. **28**(4): p. 343-58.
453. Magupalli, V.G., et al., *Ca²⁺-independent activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain of CaV2.1 calcium channels*. J Biol Chem, 2013. **288**(7): p. 4637-48.
454. Walaas, S.I., F.S. Gorelick, and P. Greengard, *Presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in nerve terminals of rat brain*. Synapse, 1989. **3**(4): p. 356-62.
455. Stefani, G., et al., *Kinetic analysis of the phosphorylation-dependent interactions of synapsin I with rat brain synaptic vesicles*. J Physiol, 1997. **504** (Pt 3): p. 501-15.
456. Ceccaldi, P.E., et al., *Dephosphorylated synapsin I anchors synaptic vesicles to actin cytoskeleton: an analysis by videomicroscopy*. J Cell Biol, 1995. **128**(5): p. 905-12.
457. Vyklicky, V., et al., *Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels*. Physiol Res, 2014. **63** Suppl 1: p. S191-203.

458. Fukunaga, K., T.R. Soderling, and E. Miyamoto, *Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C by glutamate in cultured rat hippocampal neurons*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22527-33.
459. Barria, A., V. Derkach, and T. Soderling, *Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32727-30.
460. Derkach, V., A. Barria, and T.R. Soderling, *Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 3269-74.
461. Lee, H.K., et al., *Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity*. Nature, 2000. **405**(6789): p. 955-9.
462. Barria, A., et al., *Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2042-5.
463. Crombag, H.S., et al., *A necessary role for GluR1 serine 831 phosphorylation in appetitive incentive learning*. Behav Brain Res, 2008. **191**(2): p. 178-83.
464. Lu, W., L. Khatri, and E.B. Ziff, *Trafficking of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) receptor subunit GluA2 from the endoplasmic reticulum is stimulated by a complex containing Ca²⁺/calmodulin-activated kinase II (CaMKII) and PICK1 protein and by release of Ca²⁺ from internal stores*. J Biol Chem, 2014. **289**(27): p. 19218-30.
465. Chen, L., et al., *Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 936-43.
466. Opazo, P., et al., *CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin*. Neuron, 2010. **67**(2): p. 239-52.
467. Gu, Z., W. Liu, and Z. Yan, *{beta}-Amyloid impairs AMPA receptor trafficking and function by reducing Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II synaptic distribution*. J Biol Chem, 2009. **284**(16): p. 10639-49.
468. Giese, K.P., et al., *Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning*. Science, 1998. **279**(5352): p. 870-3.
469. Silva, A.J., et al., *Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice*. Science, 1992. **257**(5067): p. 201-6.
470. Couchonnal, L.F. and M.E. Anderson, *The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease*. Physiology (Bethesda), 2008. **23**: p. 151-9.
471. Mohler, P.J. and T.J. Hund, *Role of CaMKII in cardiovascular health, disease, and arrhythmia*. Heart Rhythm, 2011. **8**(1): p. 142-4.
472. Zhang, T. and J.H. Brown, *Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(3): p. 476-86.
473. Mattiazzi, A., et al., *Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. **308**(10): p. H1177-91.
474. Fearnley, C.J., H.L. Roderick, and M.D. Bootman, *Calcium signaling in cardiac myocytes*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(11): p. a004242.
475. Franzini-Armstrong, C., F. Protasi, and V. Ramesh, *Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles*. Biophys J, 1999. **77**(3): p. 1528-39.

476. Scriven, D.R., et al., *Analysis of Cav1.2 and ryanodine receptor clusters in rat ventricular myocytes*. *Biophys J*, 2010. **99**(12): p. 3923-9.
477. Yuan, W. and D.M. Bers, *Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(3 Pt 2): p. H982-93.
478. Guo, J. and H.J. Duff, *Calmodulin kinase II accelerates L-type Ca²⁺ current recovery from inactivation and compensates for the direct inhibitory effect of [Ca²⁺]_i in rat ventricular myocytes*. *J Physiol*, 2006. **574**(Pt 2): p. 509-18.
479. Anderson, M.E., et al., *Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca(2+)-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes*. *Circ Res*, 1994. **75**(5): p. 854-61.
480. Koval, O.M., et al., *CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(11): p. 4996-5000.
481. Abiria, S.A. and R.J. Colbran, *CaMKII associates with CaV1.2 L-type calcium channels via selected beta subunits to enhance regulatory phosphorylation*. *J Neurochem*, 2010. **112**(1): p. 150-61.
482. Lee, T.S., et al., *Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(35): p. 25560-7.
483. Blaich, A., et al., *Facilitation of murine cardiac L-type Ca(v)1.2 channel is modulated by calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(22): p. 10285-9.
484. Gao, L., L.A. Blair, and J. Marshall, *CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **345**(4): p. 1606-10.
485. Witcher, D.R., et al., *Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(17): p. 11144-52.
486. Currie, S., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 2): p. 357-66.
487. Bell, J.R., et al., *CaMKIIdelta and cardiomyocyte Ca(2+) signalling new perspectives on splice variant targeting*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015. **42**(12): p. 1327-32.
488. van Oort, R.J., et al., *Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure*. *Circulation*, 2010. **122**(25): p. 2669-79.
489. Respress, J.L., et al., *Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression*. *Circ Res*, 2012. **110**(11): p. 1474-83.
490. Brittsan, A.G., et al., *Maximal inhibition of SERCA2 Ca(2+) affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(16): p. 12129-35.
491. Jackson, W.A. and J. Colyer, *Translation of Ser16 and Thr17 phosphorylation of phospholamban into Ca²⁺-pump stimulation*. *Biochem J*, 1996. **316** (Pt 1): p. 201-7.
492. Zhao, W., et al., *Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(2): p. 607-12.

493. Xu, A. and N. Narayanan, *Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of the Ca²⁺-ATPase, uncoupled from phospholamban, stimulates Ca²⁺-pumping in native cardiac sarcoplasmic reticulum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **258**(1): p. 66-72.
494. Xu, A., C. Hawkins, and N. Narayanan, *Phosphorylation and activation of the Ca(2+)-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(12): p. 8394-7.
495. Bare, D.J., et al., *Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(16): p. 15912-20.
496. Zima, A.V., et al., *IP₃-dependent nuclear Ca²⁺ signalling in the mammalian heart*. *J Physiol*, 2007. **584**(Pt 2): p. 601-11.
497. Merlen, C., et al., *Intracrine endothelin signaling evokes IP₃-dependent increases in nucleoplasmic Ca(2)(+) in adult cardiac myocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **62**: p. 189-202.
498. Wu, X., et al., *Local InsP₃-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(3): p. 675-82.
499. Backs, J., et al., *CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1853-64.
500. Maxwell, J.T., S. Natesan, and G.A. Mignery, *Modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 channel activity by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)-mediated phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(47): p. 39419-28.
501. House, S.J., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-delta isoform regulation of vascular smooth muscle cell proliferation*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(6): p. C2276-87.
502. Pauly, R.R., et al., *Role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of vascular smooth muscle cell migration*. *Circulation*, 1995. **91**(4): p. 1107-15.
503. Pfliegerer, P.J., et al., *Modulation of vascular smooth muscle cell migration by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II-delta 2*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(6): p. C1238-45.
504. Li, W., et al., *The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II delta (CaMKIIdelta) controls neointima formation after carotid ligation and vascular smooth muscle cell proliferation through cell cycle regulation by p21*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(10): p. 7990-9.
505. Saddouk, F.Z., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-gamma (CaMKIIgamma) negatively regulates vascular smooth muscle cell proliferation and vascular remodeling*. *FASEB J*, 2016. **30**(3): p. 1051-64.
506. Bertoli, C., J.M. Skotheim, and R.A. de Bruin, *Control of cell cycle transcription during G1 and S phases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(8): p. 518-28.
507. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. *Genes Dev*, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
508. Kahl, C.R. and A.R. Means, *Regulation of cyclin D1/Cdk4 complexes by calcium/calmodulin-dependent protein kinase I*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(15): p. 15411-9.

509. Ginnan, R., et al., *MEF2 is regulated by CaMKII δ 2 and a HDAC4-HDAC5 heterodimer in vascular smooth muscle cells*. *Biochem J*, 2012. **444**(1): p. 105-14.
510. Scott, J.A., et al., *The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates vascular smooth muscle migration through matrix metalloproteinase 9*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **302**(10): p. H1953-64.
511. He, B.J., et al., *Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone*. *Nat Med*, 2011. **17**(12): p. 1610-8.
512. Zhang, W., et al., *Inhibition of calcium-calmodulin-dependent kinase II suppresses cardiac fibroblast proliferation and extracellular matrix secretion*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010. **55**(1): p. 96-105.
513. Scherberich, A., et al., *Migration of human vascular smooth muscle cells involves serum-dependent repeated cytosolic calcium transients*. *J Cell Sci*, 2000. **113** (Pt 4): p. 653-62.
514. Bilato, C., et al., *The inhibition of vascular smooth muscle cell migration by peptide and antibody antagonists of the α v β 3 integrin complex is reversed by activated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(3): p. 693-704.
515. Prasad, A.M., et al., *Differential control of calcium homeostasis and vascular reactivity by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*. *Hypertension*, 2013. **62**(2): p. 434-41.
516. Singh, P., M. Salih, and B.S. Tuana, *Alpha-kinase anchoring protein α KAP interacts with SERCA2A to spatially position Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and modulate phospholamban phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(41): p. 28212-21.
517. Large, W.A. and Q. Wang, *Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl- conductance in smooth muscle*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(2 Pt 1): p. C435-54.
518. Ledoux, J., et al., *Modulation of Ca²⁺-dependent Cl- channels by calcineurin in rabbit coronary arterial myocytes*. *J Physiol*, 2003. **552**(Pt 3): p. 701-14.
519. Greenwood, I.A., J. Ledoux, and N. Leblanc, *Differential regulation of Ca(2+)-activated Cl(-) currents in rabbit arterial and portal vein smooth muscle cells by Ca(2+)-calmodulin-dependent kinase*. *J Physiol*, 2001. **534**(Pt. 2): p. 395-408.
520. Rokolya, A. and H.A. Singer, *Inhibition of CaM kinase II activation and force maintenance by KN-93 in arterial smooth muscle*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. **278**(3): p. C537-45.
521. Kim, I., et al., *Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II-dependent activation of contractility in ferret aorta*. *J Physiol*, 2000. **526 Pt 2**: p. 367-74.
522. Eikemo, H., et al., *CaMKII in addition to MLCK contributes to phosphorylation of regulatory light chain in cardiomyocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **471**(1): p. 219-25.
523. Tobimatsu, T. and H. Fujisawa, *Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(30): p. 17907-12.
524. McGuinness, T.L., Y. Lai, and P. Greengard, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Isozymic forms from rat forebrain and cerebellum*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(3): p. 1696-704.

525. Wang, Z., et al., *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II delta 6 (CaMKIIdelta6) and RhoA involvement in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21303-12.
526. Deli, M.A., et al., *Calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II is present in primary cultures of cerebral endothelial cells*. J Neurochem, 1993. **60**(5): p. 1960-3.
527. Charbel, C., *Relation entre CaMKII et les dynamiques calciques endothéliales: Impact de l'hypertension artérielle*, in *Pharmacologie*. 2016, Université de Montréal.
528. Singh, R.B., et al., *Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process*. Exp Clin Cardiol, 2002. **7**(1): p. 40-53.
529. Rabiet, M.J., et al., *Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(3): p. 488-96.
530. Borbiev, T., et al., *Regulation of endothelial cell barrier function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(5): p. L983-90.
531. Wang, Q., et al., *A novel anti-inflammatory peptide inhibits endothelial cell cytoskeletal rearrangement, nitric oxide synthase translocation, and paracellular permeability increases*. J Cell Physiol, 1997. **172**(2): p. 171-82.
532. Wang, Q., et al., *Filamin translocation is an early endothelial cell inflammatory response to bradykinin: regulation by calcium, protein kinases, and protein phosphatases*. J Cell Biochem, 1996. **62**(3): p. 383-96.
533. De Bock, M., et al., *Low extracellular Ca²⁺ conditions induce an increase in brain endothelial permeability that involves intercellular Ca²⁺ waves*. Brain Res, 2012. **1487**: p. 78-87.
534. Huang, R.Y., et al., *Identification of CaMKII phosphorylation sites in Connexin43 by high-resolution mass spectrometry*. J Proteome Res, 2011. **10**(3): p. 1098-109.
535. Gilbert, D.F., et al., *Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) and Purinergic Receptor-Mediated Ca²⁺ Homeostasis in Murine bv2 Microglia Cells: Early Cellular Responses to ATP-Mediated Microglia Activation*. Front Mol Neurosci, 2016. **9**: p. 111.
536. Aromolaran, A.S., A.V. Zima, and L.A. Blatter, *Role of glycolytically generated ATP for CaMKII-mediated regulation of intracellular Ca²⁺ signaling in bovine vascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(1): p. C106-18.
537. Li, H., et al., *Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells*. Circulation, 2003. **107**(18): p. 2348-54.
538. Cai, H., et al., *Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(10): p. 1571-6.
539. Cai, H., et al., *Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(1): p. 121-5.
540. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. E68-75.
541. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
542. Park, J.H., et al., *Far-infrared radiation acutely increases nitric oxide production by increasing Ca(2+) mobilization and Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II-*

- mediated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1179*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **436**(4): p. 601-6.
543. Ramadoss, J., M.B. Pastore, and R.R. Magness, *Endothelial caveolar subcellular domain regulation of endothelial nitric oxide synthase*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013. **40**(11): p. 753-64.
544. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
545. Banumathi, E., et al., *VEGF-induced retinal angiogenic signaling is critically dependent on Ca(2)(+) signaling by Ca(2)(+)/calmodulin-dependent protein kinase II*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(6): p. 3103-11.
546. Dimmeler, S. and A.M. Zeiher, *Akt takes center stage in angiogenesis signaling*. *Circ Res*, 2000. **86**(1): p. 4-5.
547. Shiojima, I. and K. Walsh, *Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis*. *Circ Res*, 2002. **90**(12): p. 1243-50.
548. Dobrina, A. and F. Rossi, *Metabolic properties of freshly isolated bovine endothelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1983. **762**(2): p. 295-301.
549. De Bock, K., et al., *Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting*. *Cell*, 2013. **154**(3): p. 651-63.
550. Pecze, L., W. Blum, and B. Schwaller, *Routes of Ca²⁺ Shuttling during Ca²⁺ Oscillations: FOCUS ON THE ROLE OF MITOCHONDRIAL Ca²⁺ HANDLING AND CYTOSOLIC Ca²⁺ BUFFERS*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(47): p. 28214-30.
551. Boyman, L., et al., *Calcium movement in cardiac mitochondria*. *Biophys J*, 2014. **107**(6): p. 1289-301.
552. Petersen, O.H., *Specific mitochondrial functions in separate sub-cellular domains of pancreatic acinar cells*. *Pflugers Arch*, 2012. **464**(1): p. 77-87.
553. Cardenas, C., et al., *Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria*. *Cell*, 2010. **142**(2): p. 270-83.
554. Williams, G.S., L. Boyman, and W.J. Lederer, *Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 2015. **78**: p. 35-45.
555. Gellerich, F.N., et al., *The control of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium: the mitochondrial gas pedal*. *IUBMB Life*, 2013. **65**(3): p. 180-90.
556. Palade, G.E., *The fine structure of mitochondria*. *Anat Rec*, 1952. **114**(3): p. 427-51.
557. Comte, J., B. Maisterrena, and D.C. Gautheron, *Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **419**(2): p. 271-84.
558. Horvath, S.E. and G. Daum, *Lipids of mitochondria*. *Prog Lipid Res*, 2013. **52**(4): p. 590-614.
559. Paradies, G., et al., *Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1837**(4): p. 408-17.
560. Houtkooper, R.H. and F.M. Vaz, *Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(16): p. 2493-506.
561. Perry, S.W., et al., *Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide*. *Biotechniques*, 2011. **50**(2): p. 98-115.
562. Jakobs, S., *High resolution imaging of live mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1763**(5-6): p. 561-75.

563. Mitra, K. and J. Lippincott-Schwartz, *Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches*. Curr Protoc Cell Biol, 2010. **Chapter 4**: p. Unit 4 25 1-21.
564. McCarron, J.G., et al., *From structure to function: mitochondrial morphology, motion and shaping in vascular smooth muscle*. J Vasc Res, 2013. **50**(5): p. 357-71.
565. Chen, H. and D.C. Chan, *Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(R2): p. R169-76.
566. Chalmers, S., et al., *Mitochondrial motility and vascular smooth muscle proliferation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(12): p. 3000-11.
567. Chalmers, S., et al., *Age decreases mitochondrial motility and increases mitochondrial size in vascular smooth muscle*. J Physiol, 2016. **594**(15): p. 4283-95.
568. Chalmers, S., et al., *Flicker-assisted localization microscopy reveals altered mitochondrial architecture in hypertension*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16875.
569. Ishihara, N., Y. Eura, and K. Mihara, *Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 26): p. 6535-46.
570. Rojo, M., et al., *Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 8): p. 1663-74.
571. Chen, H., A. Chomyn, and D.C. Chan, *Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction*. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26185-92.
572. Huang, P., C.A. Galloway, and Y. Yoon, *Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20655.
573. Song, Z., et al., *Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(15): p. 3525-32.
574. Smirnova, E., et al., *Dynamamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(8): p. 2245-56.
575. Antonny, B., et al., *Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know*. EMBO J, 2016. **35**(21): p. 2270-2284.
576. Hinshaw, J.E. and S.L. Schmid, *Dynamamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 190-2.
577. Sweitzer, S.M. and J.E. Hinshaw, *Dynamamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation*. Cell, 1998. **93**(6): p. 1021-9.
578. Otera, H., et al., *Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells*. J Cell Biol, 2010. **191**(6): p. 1141-58.
579. Yi, M., D. Weaver, and G. Hajnoczky, *Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit*. J Cell Biol, 2004. **167**(4): p. 661-72.
580. Sheng, Z.H., *Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications*. J Cell Biol, 2014. **204**(7): p. 1087-98.
581. Kanai, Y., et al., *KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons*. J Neurosci, 2000. **20**(17): p. 6374-84.

582. Tanaka, Y., et al., *Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria*. Cell, 1998. **93**(7): p. 1147-58.
583. Randall, T.S., C. Moores, and F.A. Stephenson, *Delineation of the TRAK binding regions of the kinesin-1 motor proteins*. FEBS Lett, 2013. **587**(23): p. 3763-9.
584. Frederick, R.L., et al., *Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway*. J Cell Biol, 2004. **167**(1): p. 87-98.
585. Fransson, S., A. Ruusala, and P. Aspenstrom, *The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(2): p. 500-10.
586. Klosowiak, J.L., et al., *Structural coupling of the EF hand and C-terminal GTPase domains in the mitochondrial protein Miro*. EMBO Rep, 2013. **14**(11): p. 968-74.
587. Wang, X. and T.L. Schwarz, *The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility*. Cell, 2009. **136**(1): p. 163-74.
588. Zhang, F., et al., *Miro1 deficiency in amyotrophic lateral sclerosis*. Front Aging Neurosci, 2015. **7**: p. 100.
589. Verhoeven, K., et al., *MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2*. Brain, 2006. **129**(Pt 8): p. 2093-102.
590. Alberts B, J.A., Lewis J, et al., *How Cells Obtain Energy from Food*, in *Molecular Biology of the Cell*. 2002, Garland Science: New York.
591. Kim, J.W. and C.V. Dang, *Multifaceted roles of glycolytic enzymes*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(3): p. 142-50.
592. Stein, L.R. and S. Imai, *The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(9): p. 420-8.
593. Izai, K., et al., *Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase*. J Biol Chem, 1992. **267**(2): p. 1027-33.
594. Tarasov, A.I., E.J. Griffiths, and G.A. Rutter, *Regulation of ATP production by mitochondrial Ca(2+)*. Cell Calcium, 2012. **52**(1): p. 28-35.
595. Matta, C.F. and L. Massa, *Energy Equivalence of Information in the Mitochondrion and the Thermodynamic Efficiency of ATP Synthase*. Biochemistry, 2015. **54**(34): p. 5376-8.
596. Hatefi, Y., *The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 1015-69.
597. Leung, K.H. and P.C. Hinkle, *Reconstitution of ion transport and respiratory control in vesicles formed from reduced coenzyme Q-cytochrome c reductase and phospholipids*. J Biol Chem, 1975. **250**(21): p. 8467-71.
598. Alexandre, A., B. Reynafarje, and A.L. Lehninger, *Stoichiometry of vectorial H⁺ movements coupled to electron transport and to ATP synthesis in mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(11): p. 5296-300.
599. Yoshida, M., E. Muneyuki, and T. Hisabori, *ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(9): p. 669-77.
600. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. Nature, 1961. **191**: p. 144-8.
601. Ernster, L. and C.P. Lee, *Biological Oxidoreductions*. Annu Rev Biochem, 1964. **33**: p. 729-90.

602. Drose, S. and U. Brandt, *Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. Adv Exp Med Biol, 2012. **748**: p. 145-69.
603. Forman, N.G. and D.F. Wilson, *Dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation on activity of the adenine nucleotide translocase*. J Biol Chem, 1983. **258**(14): p. 8649-55.
604. Pebay-Peyroula, E., et al., *Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside*. Nature, 2003. **426**(6962): p. 39-44.
605. Sena, L.A. and N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 158-67.
606. Fridovich, I., *Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?* Ann N Y Acad Sci, 1999. **893**: p. 13-8.
607. Phaniendra, A., D.B. Jestadi, and L. Periyasamy, *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases*. Indian J Clin Biochem, 2015. **30**(1): p. 11-26.
608. Loschen, G., et al., *Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide*. FEBS Lett, 1974. **42**(1): p. 68-72.
609. Cadenas, E., et al., *Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria*. Arch Biochem Biophys, 1977. **180**(2): p. 248-57.
610. Chen, Q., et al., *Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36027-31.
611. Kussmaul, L. and J. Hirst, *The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7607-12.
612. Zhang, D.X. and D.D. Gutterman, *Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(5): p. H2023-31.
613. Graham, D., et al., *Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy*. Hypertension, 2009. **54**(2): p. 322-8.
614. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 787-90.
615. Chalmers, S. and J.G. McCarron, *The mitochondrial membrane potential and Ca²⁺ oscillations in smooth muscle*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 1): p. 75-85.
616. Robert, V., et al., *Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca²⁺] in cardiac cells*. EMBO J, 2001. **20**(17): p. 4998-5007.
617. Drummond, R.M. and R.A. Tuft, *Release of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum increases mitochondrial [Ca²⁺] in rat pulmonary artery smooth muscle cells*. J Physiol, 1999. **516** (Pt 1): p. 139-47.
618. Nunez, L., et al., *Bioluminescence imaging of mitochondrial Ca²⁺ dynamics in soma and neurites of individual adult mouse sympathetic neurons*. J Physiol, 2007. **580**(Pt. 2): p. 385-95.
619. Jackson, J.G. and S.A. Thayer, *Mitochondrial modulation of Ca²⁺ -induced Ca²⁺ -release in rat sensory neurons*. J Neurophysiol, 2006. **96**(3): p. 1093-104.
620. Hajnoczky, G., et al., *Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria*. Cell, 1995. **82**(3): p. 415-24.

621. Robb-Gaspers, L.D., et al., *Coupling between cytosolic and mitochondrial calcium oscillations: role in the regulation of hepatic metabolism*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1366**(1-2): p. 17-32.
622. Tinel, H., et al., *Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals*. *EMBO J*, 1999. **18**(18): p. 4999-5008.
623. Patergnani, S., et al., *Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs)*. *Cell Commun Signal*, 2011. **9**: p. 19.
624. Vasington, F.D. and J.V. Murphy, *Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation*. *J Biol Chem*, 1962. **237**: p. 2670-7.
625. Colombini, M., *A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane*. *Nature*, 1979. **279**(5714): p. 643-5.
626. Schein, S.J., M. Colombini, and A. Finkelstein, *Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria*. *J Membr Biol*, 1976. **30**(2): p. 99-120.
627. Messina, A., et al., *VDAC isoforms in mammals*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1818**(6): p. 1466-76.
628. Xu, X., et al., *Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability*. *J Membr Biol*, 1999. **170**(2): p. 89-102.
629. Shoshan-Barmatz, V., et al., *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death*. *Mol Aspects Med*, 2010. **31**(3): p. 227-85.
630. Rostovtseva, T. and M. Colombini, *VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function*. *Biophys J*, 1997. **72**(5): p. 1954-62.
631. Dolder, M., et al., *Crystallization of the human, mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel in the presence of phospholipids*. *J Struct Biol*, 1999. **127**(1): p. 64-71.
632. Tan, W. and M. Colombini, *VDAC closure increases calcium ion flux*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(10): p. 2510-5.
633. Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto, *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. *Nature*, 1999. **399**(6735): p. 483-7.
634. Bathori, G., et al., *Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC)*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(25): p. 17347-58.
635. Sasaki, K., et al., *VDAC: old protein with new roles in diabetes*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012. **303**(10): p. C1055-60.
636. Marchi, S. and P. Pinton, *The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications*. *J Physiol*, 2014. **592**(5): p. 829-39.
637. Baughman, J.M., et al., *Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter*. *Nature*, 2011. **476**(7360): p. 341-5.
638. Perocchi, F., et al., *MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake*. *Nature*, 2010. **467**(7313): p. 291-6.

639. Plovanich, M., et al., *MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55785.
640. Sancak, Y., et al., *EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex*. Science, 2013. **342**(6164): p. 1379-82.
641. Mallilankaraman, K., et al., *MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(12): p. 1336-43.
642. Tomar, D., et al., *MCUR1 Is a Scaffold Factor for the MCU Complex Function and Promotes Mitochondrial Bioenergetics*. Cell Rep, 2016. **15**(8): p. 1673-85.
643. Trenker, M., et al., *Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(4): p. 445-52.
644. Liao, Y., et al., *Mitochondrial calcium uniporter protein MCU is involved in oxidative stress-induced cell death*. Protein Cell, 2015. **6**(6): p. 434-42.
645. Kirichok, Y., G. Krapivinsky, and D.E. Clapham, *The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 360-4.
646. Rizzuto, R., et al., *Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria*. Science, 1993. **262**(5134): p. 744-7.
647. Collins, T.J., et al., *Mitochondrial Ca(2+) uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca(2+) signals*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26411-20.
648. Cao, C., et al., *Ion and inhibitor binding of the double-ring ion selectivity filter of the mitochondrial calcium uniporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(14): p. E2846-E2851.
649. Montero, M., et al., *Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 1): p. 19-24.
650. Kobayashi, T., et al., *Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome c release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury*. Brain Res, 2003. **960**(1-2): p. 62-70.
651. Woodfield, K., et al., *Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition*. Biochem J, 1998. **336** (Pt 2): p. 287-90.
652. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**(4): p. 807-15.
653. Crompton, M., S. Virji, and J.M. Ward, *Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore*. Eur J Biochem, 1998. **258**(2): p. 729-35.
654. Baines, C.P., et al., *Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(5): p. 550-5.
655. Leung, A.W., P. Varanyuwatana, and A.P. Halestrap, *The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26312-23.
656. Ong, S.B. and A.B. Gustafsson, *New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 190-6.
657. Webster, K.A., *Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species*. Future Cardiol, 2012. **8**(6): p. 863-84.

658. Petronilli, V., et al., *Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence*. *Biophys J*, 1999. **76**(2): p. 725-34.
659. Ichas, F., L.S. Jouaville, and J.P. Mazat, *Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals*. *Cell*, 1997. **89**(7): p. 1145-53.
660. Carafoli, E., et al., *The release of calcium from heart mitochondria by sodium*. *J Mol Cell Cardiol*, 1974. **6**(4): p. 361-71.
661. Palty, R., et al., *Lithium-calcium exchange is mediated by a distinct potassium-independent sodium-calcium exchanger*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(24): p. 25234-40.
662. Palty, R., et al., *NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(1): p. 436-41.
663. Chiesi, M., R. Schwaller, and K. Eichenberger, *Structural dependency of the inhibitory action of benzodiazepines and related compounds on the mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger*. *Biochem Pharmacol*, 1988. **37**(22): p. 4399-403.
664. Baron, K.T. and S.A. Thayer, *CGP37157 modulates mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons*. *Eur J Pharmacol*, 1997. **340**(2-3): p. 295-300.
665. Despa, S., et al., *Intracellular Na⁽⁺⁾ concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged*. *Circulation*, 2002. **105**(21): p. 2543-8.
666. Luongo, T.S., et al., *The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger is essential for Ca²⁺ homeostasis and viability*. *Nature*, 2017. **545**(7652): p. 93-97.
667. Copeland, D.E. and A.J. Dalton, *An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost*. *J Biophys Biochem Cytol*, 1959. **5**(3): p. 393-6.
668. Szabadkai, G., et al., *Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels*. *J Cell Biol*, 2006. **175**(6): p. 901-11.
669. Rizzuto, R., et al., *Ca⁽²⁺⁾ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1787**(11): p. 1342-51.
670. de Brito, O.M. and L. Scorrano, *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. *Nature*, 2008. **456**(7222): p. 605-10.
671. Misko, A., et al., *Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex*. *J Neurosci*, 2010. **30**(12): p. 4232-40.
672. Tomita, Y., et al., *Ca⁽²⁺⁾-dependent unidirectional vesicular release detected with a carbon-fibre electrode in rat pancreatic acinar cell triplets*. *Pflugers Arch*, 1994. **428**(1): p. 69-75.
673. Straub, S.V., D.R. Giovannucci, and D.I. Yule, *Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria*. *J Gen Physiol*, 2000. **116**(4): p. 547-60.
674. Ribeiro, C.M., et al., *The mitochondrial barriers segregate agonist-induced calcium-dependent functions in human airway epithelia*. *J Gen Physiol*, 2003. **122**(4): p. 377-87.
675. Medler, K. and E.L. Gleason, *Mitochondrial Ca⁽²⁺⁾ buffering regulates synaptic transmission between retinal amacrine cells*. *J Neurophysiol*, 2002. **87**(3): p. 1426-39.

676. Zhao, Z., et al., *Modulation of intracellular calcium waves and triggered activities by mitochondrial Ca^{2+} flux in mouse cardiomyocytes*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80574.
677. Boitier, E., R. Rea, and M.R. Duchen, *Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca^{2+} waves in rat cortical astrocytes*. J Cell Biol, 1999. **145**(4): p. 795-808.
678. Marchant, J.S., V. Ramos, and I. Parker, *Structural and functional relationships between Ca^{2+} puffs and mitochondria in *Xenopus* oocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(6): p. C1374-86.
679. Sward, K., et al., *Influence of mitochondrial inhibition on global and local $[Ca^{2+}]_i$ in rat tail artery*. Circ Res, 2002. **90**(7): p. 792-9.
680. Hernandez-SanMiguel, E., et al., *The mitochondrial Na^+/Ca^{2+} exchanger plays a key role in the control of cytosolic Ca^{2+} oscillations*. Cell Calcium, 2006. **40**(1): p. 53-61.
681. Malli, R., et al., *The role of mitochondria for Ca^{2+} refilling of the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12114-22.
682. Takeuchi, A., B. Kim, and S. Matsuoka, *The mitochondrial Na^+-Ca^{2+} exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2766.
683. Straub, A.C., et al., *Endothelial cell expression of haemoglobin alpha regulates nitric oxide signalling*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 473-7.
684. Billaud, M., et al., *Pannexin1 regulates alpha1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction*. Circ Res, 2011. **109**(1): p. 80-5.
685. Tallini, Y.N., et al., *Propagated endothelial Ca^{2+} waves and arteriolar dilation in vivo: measurements in Cx40BAC GCaMP2 transgenic mice*. Circ Res, 2007. **101**(12): p. 1300-9.
686. Oude Vrielink, H.H., et al., *Changes in vasomotion pattern and local arteriolar resistance during stepwise pressure reduction*. Pflugers Arch, 1989. **414**(5): p. 571-8.
687. Morel, J.L., et al., *Crucial role of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors for acetylcholine-induced Ca^{2+} oscillations in vascular myocytes*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1567-75.
688. Jonhson, I. and M. Spence, *Probes for organelles*, in *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 2010, Molecular probes invitrogen by life technologies.
689. Kandel, J., P. Chou, and D.M. Eckmann, *Automated detection of whole-cell mitochondrial motility and its dependence on cytoarchitectural integrity*. Biotechnol Bioeng, 2015. **112**(7): p. 1395-405.
690. Chen, M., et al., *A new method for quantifying mitochondrial axonal transport*. Protein Cell, 2016. **7**(11): p. 804-819.
691. Doughan, A.K., D.G. Harrison, and S.I. Dikalov, *Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction*. Circ Res, 2008. **102**(4): p. 488-96.
692. Oyewole, A.O. and M.A. Birch-Machin, *Mitochondria-targeted antioxidants*. FASEB J, 2015. **29**(12): p. 4766-71.
693. Joiner, M.L., et al., *CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart*. Nature, 2012. **491**(7423): p. 269-73.
694. Fieni, F., et al., *Mitochondrial Ca^{2+} uniporter and CaMKII in heart*. Nature, 2014. **513**(7519): p. E1-2.

695. Fieni, F., et al., *Activity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1317.
696. Swaminathan, P.D., et al., *Oxidized CaMKII causes cardiac sinus node dysfunction in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(8): p. 3277-88.
697. Makino, A., B.T. Scott, and W.H. Dillmann, *Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes*. Diabetologia, 2010. **53**(8): p. 1783-94.
698. Gokina, N.I., et al., *Role of impaired endothelial cell Ca(2+) signaling in uteroplacental vascular dysfunction during diabetic rat pregnancy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(7): p. H935-45.
699. Shenouda, S.M., et al., *Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Circulation, 2011. **124**(4): p. 444-53.
700. Twig, G., et al., *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 433-46.
701. Jin, H.S., et al., *Age-dependent association of the polymorphisms in the mitochondria-shaping gene, OPA1, with blood pressure and hypertension in Korean population*. Am J Hypertens, 2011. **24**(10): p. 1127-35.
702. Wang, Z., et al., *HSG/Mfn2 gene polymorphism and essential hypertension: a case-control association study in Chinese*. J Atheroscler Thromb, 2011. **18**(1): p. 24-31.
703. Ishii, K., K. Hirose, and M. Iino, *Ca²⁺ shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca²⁺ oscillations*. EMBO Rep, 2006. **7**(4): p. 390-6.
704. Imamura, H., et al., *Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15651-6.
705. Ando, T., et al., *Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA*. PLoS Pathog, 2012. **8**(3): p. e1002561.
706. Schubert, R. and J.E. Brayden, *Stretch-activated Cation Channels and the Myogenic Response of Small Arteries*, in *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*, A. Kamkin and I. Kiseleva, Editors. 2005: Moscow.
707. Raignault, A., et al., *Pulse pressure-dependent cerebrovascular eNOS regulation in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2017. **37**(2): p. 413-424.
708. Bagher, P., et al., *Low intravascular pressure activates endothelial cell TRPV4 channels, local Ca²⁺ events, and IKCa channels, reducing arteriolar tone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(44): p. 18174-9.

Annexe 1 : Liste de publications

1. Hertig V., Tardif K., Meus MA., Duquette N., Villeneuve L., **Toussaint F.**, Ledoux J., Calderone A. *Nestin expression is upregulated in the fibrotic rat heart and is localized in collagen-expressing mesenchymal cells and interstitial CD31(+)- cells.* (2017) PLoS One (article original)
2. **Toussaint F.**, Charbel C., Blanchette A., Ledoux J. *CaMKII regulates intracellular Ca²⁺ dynamics in native endothelial cells.* Cell Calcium. 2015 Sep;58(3):275-85 (article original)
3. **Toussaint F.**, Charbel C., Allen BG., Ledoux J. *Vascular CaMKII: heart and brain in your arteries.* Am J Physiol Cell Physiol. 2016 Sep 1;311(3):C462-78 (revue de littérature)
4. Béziau DM., **Toussaint F.**, Blanchette A., Dayeh NR., Charbel C., Tardif JC., Dupuis J., Ledoux J. *Expression of phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms in native endothelial cells.* PLoS One. 2015 Apr 13;10(4):e0123769 (article original)
5. Charbel C., **Toussaint F.**, Ledoux J. *Les dynamiques calciques : Côté lumineux de la signalisation endothéliale.* Médecine sciences amériques, CRCQ-2012 :vol2;No.2 (revue de littérature)