

Université de Montréal

Implication des ROS dans la régulation des dynamiques calciques locales de l'endothélium

par Marianne Berlatie

Département de pharmacologie et physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M. Sc.)
en Physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Juin 2019

© Marianne Berlatie, 2019

Résumé

L'endothélium est essentiel au maintien de l'homéostasie vasculaire, puisqu'il possède un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire. Cette régulation du tonus vasculaire s'exerce par l'intermédiaire des dynamiques calciques dans les cellules endothéliales. Une perturbation dans l'homéostasie calcique endothéliale entraîne une dysfonction endothéliale. Les dysfonctions endothéliales sont associées à plusieurs pathologies du système cardiovasculaire, notamment l'hypertension et l'athérosclérose. De ce fait, il est primordial de parfaire nos connaissances sur les signalisations calciques endothéliales impliquées dans la régulation du tonus vasculaire.

Dans une artère, la communication entre la cellule endothéliale et la cellule musculaire lisse est possible via des perforations de la lamina élastique interne. La structure permettant la communication se nomme projection myoendothéliale (PME). Une des dynamiques calciques endothéliales se situe dans la PME. Il s'agit des pulsars calciques qui sont caractérisés par la relâche spontanée de calcium provenant du réticulum endoplasmique par l'activation des récepteurs à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃Rs).

Des travaux réalisés en microscopie électronique ont montré la présence de mitochondrie à proximité de l'embouchure de PMEs. Les mitochondries font partie intégrante de l'homéostasie calcique en agissant à titre de réserve intracellulaire de calcium. De plus, elles participent à l'homéostasie cellulaire par leur production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). La sensibilité des IP₃Rs aux ROS implique que les ROS mitochondriaux (mROS) seraient un mécanisme de régulation local et précis pour les pulsars en modulant directement l'activité des récepteurs à l'IP₃. L'objectif de notre étude était d'évaluer l'impact des mROS sur les dynamiques calciques endothéliales.

Nos travaux ont montré que la chélation des ROS provenant de la mitochondrie, par le MitoTEMPO, diminue la fréquence des pulsars de 50% par rapport au contrôle et cette diminution est significative. De plus, nos travaux ont montré qu'un inhibiteur de la chaîne de transport des électrons des mitochondries (l'antimycine A) stimule la production des mROS et augmente significativement la fréquence des dynamiques calciques.

Ce mémoire a mis en lumière le lien entre les mROS et les pulsars calciques, soit que les ROS mitochondriaux sont un mécanisme de régulation des pulsars. La régulation des pulsars calciques et de l'homéostasie calcique endothéliale est primordiale pour le maintien des fonctions endothéliales. Nos résultats dévoilent une nouvelle avenue potentielle dans le développement de nouvelles cibles thérapeutiques dans la prévention de la dysfonction endothéliale et, ultimement, dans la prévention de maladies cardiovasculaires, telle l'hypertension liée à la dysfonction endothéliale.

Mots-clés : Endothélium, calcium, stress oxydant, artère, mitochondrie, dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)

Abstract

The endothelium is essential for vascular homeostasis through its important role in the regulation of vascular tone. This regulation is exerted via endothelial intracellular calcium dynamics. Disturbance in endothelial calcium homeostasis leads to endothelial dysfunction which is associated with several cardiovascular pathologies, including hypertension and atherosclerosis. Therefore, it is essential to strengthen our understanding of endothelial calcium dynamics involved in the regulation of vascular tone.

In arteries, communication between endothelial cells and smooth muscle cells is possible via fenestrations through the internal elastic lamina. The structure allowing this communication is called myoendothelial projection (MEP). The calcium pulsar is an endothelial calcium transient that is localized within these MEPs. Pulsars have been characterized and results from the spontaneous release of calcium from the endoplasmic reticulum upon the activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP₃R).

Electron microscopy images has shown the presence of mitochondria at the cleft of MEPs. Mitochondria have an important role in the calcium homeostasis and constitute an important intracellular source of calcium. In addition, they are involved in cellular homeostasis with their production of reactive oxygen species (ROS). IP₃R's sensitivity to ROS imply that mitochondrial ROS (mROS) could be part of a precise and local regulation mechanism for pulsars by modulating IP₃Rs activity. The main objective of our study was to evaluate the impact of mROS on endothelial calcium dynamics.

Our study has shown that mROS chelation, with MitoTEMPO, significantly reduced pulsar's frequency. Furthermore, our work shows that an inhibitor of the mitochondria electron transport chain (antimycin A) stimulates mROS production and therefore significantly increases the frequency of calcium dynamics.

Our work highlighted the link between mROS and calcium pulsars, that is mitochondrial ROS are a pulsar's regulation mechanism. Regulation of calcium pulsars and endothelial calcium homeostasis is essential for the maintenance of endothelial functions. Our results unveils a potential new avenue in the development of new therapies in the prevention

of endothelial dysfunction and, ultimately, of cardiovascular diseases, such as hypertension associated with endothelial dysfunction.

Keywords : Endothelium, calcium, oxidative stress, artery, mitochondria, reactive oxygen species (ROS)

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des sigles	ix
Remerciements	xii
Introduction	1
1.1 Système cardiovasculaire.....	1
1.1.1 Débit sanguin cardiaque et local.....	1
1.1.2 Structure des artères.....	3
Endothélium.....	4
Lamina élastique interne.....	5
Muscle lisse.....	5
1.1.3 Projection myoendothéliale	5
Fonction de la PME	6
1.2 Calcium endothélial	7
1.2.1 Sources de calcium	7
Réticulum endoplasmique.....	8
Mitochondrie.....	8
Calcium extracellulaire	11
1.2.2 Dynamiques calciques	12
Globales	13
Pulsars.....	13
1.3 Mitochondrie.....	14
1.3.1 Structure de la mitochondrie.....	14
1.3.2 Production d'ATP	15

Chaîne de transport des électrons	15
1.3.3 Calcium mitochondrial.....	17
1.4 Dérivés réactifs de l’oxygène.....	17
1.4.1 Sources de ROS	18
NADPH oxydase.....	18
Mitochondrie.....	18
1.4.2 Stress oxydatif.....	19
1.4.3 Antioxydants cellulaires.....	19
Superoxyde dismutase	20
Catalase et glutathion peroxydase.....	20
Mise en contexte du mémoire.....	21
2.1 Hypothèse du mémoire	23
2.2 Objectifs du mémoire.....	23
Article.....	24
3.1 Manuscrit	25
Discussion	49
4.1 ROS mitochondriaux et dynamiques calciques	49
4.1.1 Augmentation de la production des mROS	49
4.1.2 Chélation des mROS.....	51
4.1.3 Effets des mROS.....	51
4.2 Mécanismes d’action potentiels.....	53
4.3 Limitations	54
4.4 Perspectives.....	55
Conclusions et perspectives.....	56
Bibliographie	57

Liste des figures

Figure 1.	Représentation de la pression artérielle à travers le système circulatoire.....	2
Figure 2.	La projection myoendothéliale en microscopie électronique.	6
Figure 3.	Schématisation des voies de transport du calcium.....	10
Figure 4.	Chaîne de transport des électrons.	16
Figure 5.	Schématisation simplifiée des réactions de transformation des ROS.....	20

Liste des tableaux

Tableau I. Valeurs moyennes de paramètres cinétiques pour les différentes dynamiques calciques (blips, puffs, sparklets et pulsars).....	12
--	----

Liste des sigles

[Ca ²⁺] _i	Concentration de calcium intracellulaire
AA	Antimycine A
ACh	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cytochrome C
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
CAT	Catalase
CE	Cellule endothéliale
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CML	Cellule musculaire lisse
DAG	Diacylglycérol
e ⁻	Électron
EDHF	Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium
eNOS	Synthase de NO endothéliale
FADH	Flavine adénine dinucléotide (forme semiquinone)
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide (forme hydroquinone)
FC	Fréquence cardiaque
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GP	Protéine G
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GPx	Glutathion peroxydase
H ⁺	Ion hydrogène
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HO•	Radical hydroxyde
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate

IP ₃ R	Récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate
K ⁺	Ion potassium
LEI	Lamina élastique interne
Li ⁺	Ion lithium
MAM	<i>Mitochondria-associated membranes</i>
MCU	Uniporteur calcique mitochondrial
mNCX	Échangeur sodium-calcium mitochondrial
mPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
mROS	ROS mitochondriaux
Na ⁺	Ion sodium
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucleotide (forme oxydée)
NADH	Nicotinamide adénine dinucleotide (forme réduite)
NCX	Échangeur sodium-calcium
NF-κB	Facteur nucléaire κB
NO	Oxyde nitrique
NOX	NADPH oxydase
O ₂	Oxygène
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PGI ₂	Prostacycline
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Pompes ATPase de la membrane plasmique
PME	Projection myoendothéliale
Q	Coenzyme Q ₁₀
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
RS	Réticulum sarcoplasmique
RyR	Récepteur de la ryanodine

SERCA	Pompe sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SOD	Superoxyde dismutase
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α
TRPs	<i>Transient receptor potential channels</i>

Remerciements

Aux membres de mon jury, Dr Daniel Gagnon et Dr Bruno Larrivée,

Je sais pertinemment que la vie d'un chercheur est déjà bien remplie, malgré tout, vous avez accepté sans hésiter à corriger mon mémoire. Je vous en remercie. Merci de prendre le temps de me lire. Vos corrections et suggestions me permettront de rendre mon mémoire encore meilleur.

À mon directeur de recherche, Dr Jonathan Ledoux,

Tout d'abord, merci de m'avoir donné ma chance. J'ai commencé en tant que stagiaire d'été dans le labo et tu as dû voir quelque chose en moi, parce que tu as accepté sans hésiter quand je t'ai partagé mon désir de faire une maîtrise sous ta direction. Ce ne fut vraiment pas 2 années faciles, mais tu n'as jamais cessé de croire en moi et tu as toujours su trouver les bons mots encourageants quand rien n'allait comme je le voulais. Ton enthousiasme pour la recherche est contagieux et je suis très reconnaissante d'avoir pu faire mes études graduées sous ton aile. Merci de m'avoir permis de vivre des expériences incroyables, notamment EB2018 à San Diego. Je peux affirmer avoir énormément grandi dans ton laboratoire et je termine mon parcours en recherche en étant fière de ce que j'ai accompli avec ta précieuse aide.

À Alexandre Blanchette,

Mon parcours n'aurait tellement pas été pareil sans toi. J'ai vu avec les années notre complicité au labo grandir. Les rares journées où tu n'étais pas là étaient les plus plates de mes études graduées... Comme tu le sais, au départ, je n'osais pas demander de l'aide trop souvent, mais bien vite j'ai compris à quel point tu es bienveillant. J'ai pu voir que ma réussite tenait à tes yeux dans ton soutien constant. De se sentir supportée comme je l'ai été, ça vaut tout l'or du monde. Merci pour ton aide indispensable. Je vais m'ennuyer à me faire appeler « Marianopoliss » avec ta voix mélodieuse ;). Au labo, sans travail d'équipe, rien ne

fonctionne comme il le faut et je suis très heureuse de pouvoir affirmer que notre équipe était de « feu ».

À Fanny Toussaint,

Tu nous as quittés alors que je n'étais encore qu'au baccalauréat, mais sans toi mon mémoire n'aurait peut-être jamais vu le jour. Pour une étudiante qui était en fin de doctorat de se retrouver avec une jeune fille en fin de baccalauréat, qui l'a suivait comme son ombre et posait beaucoup de questions, n'a pas dû être facile. J'avais tout à apprendre et toi tu avais beaucoup d'autres trucs à faire, mais tu ne m'as jamais fait sentir comme tel et je te remercie pour ça. Tous les jours, tu m'as partagé un petit peu ta passion pour la science et tu m'as donné le goût de faire de la recherche.

À Corinne Céryre-Chartrand,

Mille fois merci d'avoir décidé de venir faire ton stage au labo! Je suis tellement choyée que tu sois entré dans ma vie. J'ai rencontré une vraie amie avec qui j'ai eu un réel plaisir à partager mes journées et à discuter de tout et de rien. Le laboratoire sans toi n'est plus du tout pareil. Tu es d'un positivisme sans faille. Tu as su illuminer mes journées et me partager ta passion pour le café! Merci aussi pour les millions de cellules que tu m'as toujours si gentiment « platées ».

À Louis Villeneuve,

Merci pour ta patience. J'ai passé plusieurs matinées avec toi à faire des expériences qui n'allaient définitivement pas toujours comme on le voulait. Je ne t'ai jamais vu baisser les bras. Au contraire, tu continuais à me donner des conseils pour la prochaine journée d'expérience.

À mes soeurs Carabins et à mes coachs,

Combiner sport et études n'est pas facile, mais d'être entourée tous les jours de femmes inspirantes comme vous m'amène à vouloir constamment me dépasser. Mon parcours universitaire aurait été tout à fait différent sans vous. Vous êtes toutes autant que vous êtes des femmes exceptionnelles. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir écouté et encouragé lors de nombreux entraînements où j'étais parfois trop fatiguée pour me motiver moi-même.

Merci à mes coachs de m'avoir accompagné et coaché autant sur le terrain qu'en dehors. Vous avez été des mentors et je suis très reconnaissante d'avoir pu compter sur vous durant mon parcours.

À ma famille,

Personne n'ayant fait de la recherche fondamentale dans la famille avant moi, ce n'est pas toujours facile d'expliquer son quotidien de recherche durant les soupers de famille. Merci pour votre appui et vos nombreux encouragements.

À mes parents, merci pour tout! Merci d'avoir cultivé ma curiosité qui m'aura mené très loin. Merci d'avoir su encourager tous mes projets les plus fous et merci aussi d'avoir ensuite su me supporter afin que je les mène à terme. J'ai vécu plusieurs épreuves durant les 3 dernières années, mais quand ça n'allait pas, je savais toujours que je pouvais me tourner vers vous.

À Marie-Pier,

Marie-Pier, quand je t'ai rencontrée, je savais que ma vie allait changer. Tu es dans ma vie depuis 3 ans et je sais que ce n'est que le début d'une longue histoire. Merci de t'être toujours intéressée à ce que je faisais au labo, même si je sais très bien que tu ne comprenais pas tout ce que je t'expliquais. Tu as toujours été là pour me remonter le moral lorsque mes expériences ne fonctionnaient pas. Tu as su m'écouter et m'encourager. Ce mémoire ne se serait simplement pas écrit sans toi. Tu as d'ailleurs fait l'épicerie et nos lunchs plus souvent que je ne peux compter. Merci pour tout! Et je suis très heureuse de pouvoir commencer une nouvelle étape de ma vie avec toi à mes côtés.

“Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. C'est maintenant le moment de comprendre davantage, afin de craindre moins.” — Marie Curie

Introduction

1.1 Système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire comporte 2 composantes majeures, le cœur et le système circulatoire. Le cœur agit à titre de pompe pour le système circulatoire. Il propulse le sang et permet son avancement dans le système circulatoire. Dans l'ordre, le système circulatoire est composé ainsi : artères, artérioles, capillaires, veinules et veines. Ces différents segments sont disposés en séries. Le système circulatoire est composé de deux circulations distinctes, la circulation systémique (aussi appelé grande circulation) et la circulation pulmonaire. Dans la circulation systémique, le sang oxygéné quitte le cœur gauche en se laissant conduire par des artères et artérioles pour aller jusqu'aux tissus. Rendus aux tissus, les capillaires permettent les échanges de gaz et de nutriments entre le sang et le tissu. Ensuite, les veines conduisent le sang désoxygéné vers le cœur (dans l'oreillette droite). Dans la circulation pulmonaire, le sang désoxygéné quitte le ventricule droit par les artères pulmonaires et se rend aux poumons. Le sang est oxygéné dans les capillaires pulmonaires qui sont en contact avec les alvéoles. Ensuite, le sang oxygéné revient vers l'oreillette gauche à l'aide des veines pulmonaires (1).

1.1.1 Débit sanguin cardiaque et local

Le débit cardiaque se définit comme étant la quantité de sang expulsée des ventricules par unité de temps. Le débit cardiaque est égal dans chacun des segments du système vasculaire, puisqu'ils sont disposés en séries (1). Plusieurs organes se partagent le débit cardiaque total (chacun en recevant une certaine fraction). Pour ce faire, dans chaque segment du système circulatoire, il y a des ramifications permettant la perfusion de tous les organes. Ces ramifications sont disposées en parallèle. Ceci implique que l'addition des débits vasculaires de chaque vaisseau (ou ramification) d'un même segment donne le débit vasculaire total de ce segment et le débit vasculaire total d'un segment est égal au débit cardiaque. Par exemple, dans le segment artériolaire, l'addition des débits vasculaires de chaque artériole donne le débit cardiaque.

Mathématiquement, le débit vasculaire d'un vaisseau est calculé en fonction de 2 variables : la différence de pression artérielle (ΔP) et la résistance du système (R). La différence de pression artérielle est la variation de pression d'un bout à l'autre d'un vaisseau donné dans le système. La résistance est définie comme étant l'obstacle à l'écoulement dans un système. La formule du débit vasculaire s'écrit comme suit (2) :

$$\text{Débit} = \Delta P / R$$

Tous les organes du corps ont des besoins métaboliques différents et qui varient dans le temps. Ces besoins variables forcent le système circulatoire à avoir un contrôle sur le débit sanguin envoyé à chaque organe individuellement (débit sanguin local). Afin de mieux comprendre comment ce contrôle se produit, cette illustration représente la pression artérielle à travers le système circulatoire.

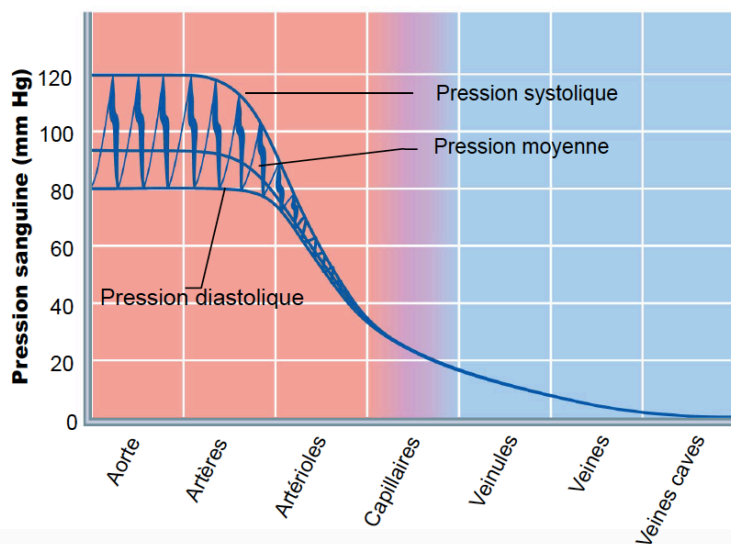


Figure 1. Représentation de la pression artérielle à travers le système circulatoire.

Pression sanguine (systolique, moyenne et diastolique) en fonction du segment dans le système circulatoire. (Tiré de Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines. 2015. (3))

Tel qu'illustré, à travers l'arbre artériel, la pression diminue le plus dans le segment artériolaire. Sachant que le débit cardiaque est égal dans chaque segment vasculaire, une grande diminution de la pression s'explique par une plus grande résistance périphérique à cet endroit (en se rapportant à l'équation du débit cardiaque). La grande résistance périphérique dans les artérioles (aussi appelées artères de résistances) indique que c'est dans le segment artériolaire que le contrôle du débit local est effectué. Les résistances permettent aux artérioles de diriger efficacement le sang aux lits capillaires en ayant le plus besoin, les artérioles étant

disposées directement en aval des capillaires (4-6). La résistance vasculaire est le résultat de trois variables : la longueur du vaisseau (l), la viscosité de liquide qui s'écoule dans le vaisseau (η) et le rayon du vaisseau (r) (7).

$$R = 8\eta l / \pi r^4$$

Dans la loi de Poiseuille ci-mentionnée, la variable qui est considérée comme ayant le plus grand impact sur la résistance vasculaire est le rayon du vaisseau, puisqu'elle est à la puissance 4 dans le calcul de la résistance. Une petite variation du rayon aura un plus grand impact qu'un changement de longueur ou de viscosité sur la résistance. De plus, le rayon est la seule des trois variables qui peut être modifiée de manière aiguë (8). Concrètement dans le système, si les besoins métaboliques d'un organe diminuent, les artérioles desservant cet organe vont se contracter afin de diminuer leur rayon et donc de diminuer leur débit. Le contraire est vrai aussi. Si la perfusion sanguine d'un organe doit augmenter, les artérioles qui perfusent cet organe se dilateront (9).

1.1.2 Structure des artères

Les artères sont composées de trois tuniques : l'intima, la media et l'externa (aussi appelé adventice). L'intima est composée de cellules endothéliales et de la lamina élastique interne (LEI). La lamina élastique interne isole l'intima de la média. La média est surtout composée de cellules musculaires lisses avec aussi quelques fragments d'élastine et des fibres de collagène. La tunique externa est séparée de la média par la lamina élastique externe. La tunica externa est composée en majeure partie de collagène. Le collagène est un tissu conjonctif et il entoure l'extérieur de l'artère. Il lui confère les propriétés passives des artères et une stabilité positionnelle avec son environnement extérieur dans le corps humain (10). La tunica externa inclut aussi les terminaisons nerveuses et les adipocytes.

Les compositions et épaisseurs de chacune de ces tuniques dépendent de l'endroit où l'artère qu'elles forment se trouve dans l'arbre artériel. Les artères de conductance, comme l'aorte, ont des parois épaisses afin de supporter les pressions sanguines élevées à la sortie du cœur. Les artères de résistances ont plutôt une média bien développée pour avoir un meilleur

contrôle sur la régulation de leur diamètre artériel. Les proportions des tuniques peuvent aussi être affectées lors de certaines pathologies comme l'hypertension (11). Dans le cadre de ce mémoire, nos travaux portaient sur le segment artériolaire.

Endothélium

L'endothélium artériolaire est composé d'une seule couche de cellules endothéliales (CEs). Avec la LEI, ils forment la tunique intima. L'endothélium est disposé du côté luminal de l'artère, ce qui signifie que les CEs sont en contact direct avec le sang. Autrefois, l'endothélium était perçu comme étant une simple barrière mécanique prévenant l'écoulement du sang hors des artères. Or, l'endothélium remplit de nombreuses fonctions essentielles à l'homéostasie vasculaire (12). Toutes ses fonctions lui viennent principalement du fait qu'il est disposé à un endroit stratégique pour faire le lien entre le sang artériel et les tissus locaux. Il est une interface de communication essentielle à plusieurs fonctions cardiovasculaires (13).

Tout d'abord, les cellules endothéliales permettent le contrôle du tonus vasculaire (14). En effet, leur contact avec le sang permet aux CEs de percevoir des messagers chimiques sanguins (grâce aux récepteurs à leur surface) et de percevoir aussi les forces de cisaillement exercées par le débit sanguin. Elles intègrent ces informations et peuvent produire de nombreux facteurs vasorelaxants (tel le NO) et vasoconstricteurs (telle la thromboxane A_2). Ces facteurs peuvent ensuite être transmis aux cellules musculaires lisses (CMLs) où ils pourront avoir leurs effets (12, 15). Les mécanismes impliqués dans la production de ces facteurs seront traités plus en détail au chapitre 1.1.3.

L'endothélium a plusieurs autres fonctions aussi. Il joue un rôle dans la physiologie de l'angiogenèse, la migration et la prolifération cellulaire (15). Les cellules endothéliales interagissent avec les leucocytes activés durant la réponse immunitaire. Les CEs permettent l'adhésion cellulaire de leucocytes et contribuent à la réponse inflammatoire et la réparation vasculaire. L'endothélium contrôle la perméabilité vasculaire et permet la diapédèse des cellules immunitaires (16). Il est aussi une composante importante de l'hémostase en permettant l'activation des plaquettes avec le contact du collagène provenant des CEs

endommagées et en sécrétant de nombreuses molécules nécessaires à la cascade de coagulation (15-17).

Lamina élastique interne

La lamina élastique interne est composée de molécules d'élastine. Elle est la barrière physique entre les CEs et les CMLs. Cependant, elle possède de nombreuses fenestrations où le contact cellulaire est possible entre l'endothélium et le muscle lisse. La communication entre les deux types cellulaires est uniquement possible à travers les fenestrations de la LEI (4). La taille et le nombre de fenestrations varient entre les nombreux segments artériels (18).

Muscle lisse

Les CML sont responsables du diamètre artériel, puisqu'elles peuvent se contracter et se relaxer. Elles génèrent le tonus artériel. Leurs contractions sont régulées par de nombreux facteurs produits par les CEs, ainsi que par des hormones, par la stimulation nerveuse du système nerveux sympathique et par des facteurs provenant du tissu environnant (communication paracrine) (19). Les CML peuvent aussi contracter suite à des changements abrupts de pression artérielle. Ce phénomène se nomme « le tonus myogénique ». Le tonus myogénique est impliqué dans l'autorégulation du débit sanguin local (1).

1.1.3 Projection myoendothéliale

Tel que vu brièvement déjà, le seul endroit où il y a communication entre les CEs et les CMLs se situe à travers les fenestrations dans la LEI. À ces endroits, la CE se projette dans le trou de la LEI et fait contact à une cellule musculaire lisse avec des jonctions communicantes (GAP) (6, 20). Cette structure se nomme « la projection myoendothéliale » (PME) (5, 9, 21) (voir la Fig. 2).

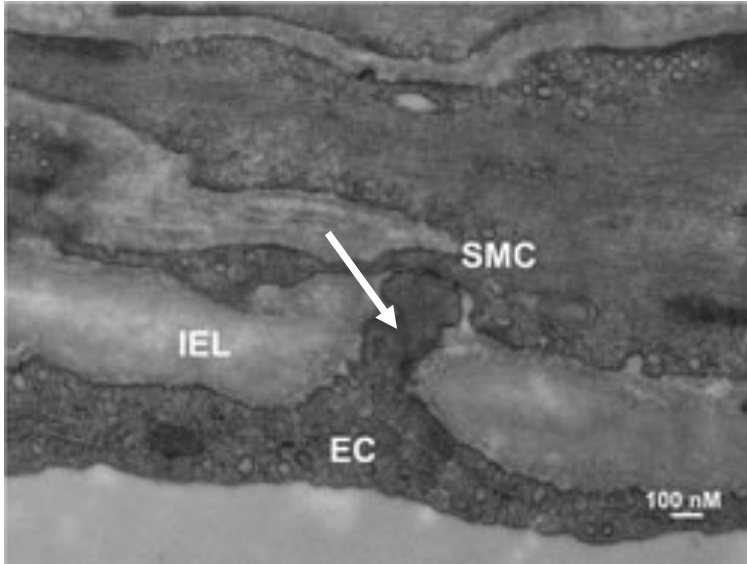


Figure 2. La projection myoendothéliale en microscopie électronique.

Image montrant la projection (indiqué par la flèche) de la cellule endothéliale (EC) à travers la lamina élastique interne (IEL) pour faire contact avec la cellule musculaire lisse (SMC) (préparation faite avec une artère provenant d'un muscle squelettique d'hamster). Échelle : 100 nm. (D'après Kerr PM. et coll., 2012. (6))

Fonction de la PME

Cette structure représente un microdomaine de communication primordial dans les artérioles, puisque l'endothélium vasculaire module la contraction des CMLs (12, 13). Les cellules endothéliales modulent la contractilité des cellules musculaires lisses en produisant des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. La production de ces nombreux facteurs dépend du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire endothélial. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la génération de facteurs endothéliaux liés au contrôle du tonus vasculaire (6, 22, 23).

Les forces de cisaillement dans une artère peuvent être perçues par un récepteur à la surface de celle-ci, tout comme certaines molécules sanguines peuvent activer des récepteurs à la surface des CEs (par exemple, un récepteur couplé aux protéines G (GPCR)). L'activation du récepteur engendre une augmentation de la concentration calcique intracellulaire (24) (via des dynamiques calciques (soit globales ou locales) qui sont discutées au chapitre 1.2). Ces dynamiques calciques activent ensuite des voies de signalisation qui produiront des facteurs vasodilatateurs. Une augmentation de la concentration de calcium endothéliale a pour résultat de diminuer la contraction des CMLs et donc de favoriser la vasodilatation (25).

Parmi les facteurs vasodilatateurs synthétisés par la CE, il y a, par exemple, l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline (PGI_2). Après avoir été produits dans la CE, ils diffusent vers

la CML par le biais de la projection myoendothéliale. Une fois dans la CML, ils induisent une relaxation de la cellule musculaire par l'activation de voies de signalisation vasorelaxantes telle la formation de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) (14, 25).

En cas de dysfonction endothéliale, il y a une perte de ces voies de signalisation et donc diminution de la production de facteurs vasodilatateurs produits par l'endothélium. Il en résulte une perte de la capacité du muscle à se relaxer liée à la dysfonction endothéliale (14).

La communication entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses peut aussi être effectuée par un transfert du potentiel membranaire ou via le passage de messagers chimiques (second messenger) dans la PME (6, 14, 21).

1.2 Calcium endothélial

Tel que déjà mentionné, la concentration calcique intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) de l'endothélium varie face à certains stimuli (par exemple, l'activation de GPCR endothélial ou les forces de cisaillement exercées sur les parois vasculaires). L'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ de l'endothélium permet l'activation de plusieurs voies de signalisation, alors le maintien de son homéostasie est primordial (26). De nombreux mécanismes veillent donc à la régulation du calcium endothélial. Un déséquilibre de ces mécanismes régulateurs peut entraîner une dysfonction endothéliale qui mènerait à plusieurs pathologies cardiovasculaires, comme l'hypertension et l'athérosclérose (15).

1.2.1 Sources de calcium

Le calcium intracellulaire de l'endothélium peut provenir principalement de trois sources : le réticulum endoplasmique, la mitochondrie et le Ca^{2+} extracellulaire. Pour chacune de ces sources, il y a des mécanismes régulateurs pour l'entrée et pour la sortie du Ca^{2+} , afin que la concentration calcique intracellulaire soit toujours contrôlée.

Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est la principale source de Ca^{2+} intracellulaire. La sortie de Ca^{2+} du RE vers le cytoplasme cellulaire passe par l'activation des récepteurs à inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3Rs).

À titre comparatif, les CMLs possèdent elles aussi du RE (appelé réticulum sacroplasmique (RS) dans les CMLs) qui expriment des IP_3Rs (27), mais ils possèdent en plus le récepteur de la ryanodine (RyR) situé à la surface des RSs. Tout comme les IP_3Rs , les RyRs permettent eux aussi la sortie de calcium à partir des RSs. Or, les cellules endothéliales natives n'expriment pas les RyRs. C'est pourquoi la libération de Ca^{2+} du RE vers le cytosol de la cellule endothéliale passe principalement par les IP_3Rs (28).

Il existe 3 sous-types du récepteur à IP_3 (les sous-types 1, 2 et 3). Ils sont évidemment sensibles à l' IP_3 , mais leur activité peut aussi être modulée par le calcium lui-même, par l'adénosine triphosphate (ATP), ainsi que par la calmoduline (CaM) (29). Le calcium module l'activité des IP_3Rs de deux façons. À basse concentration calcique intracellulaire, il stimule le récepteur afin d'augmenter la probabilité de son ouverture et donc d'augmenter la relâche de Ca^{2+} dans le cytosol et, à haute concentration calcique, il inhibe le récepteur (phénomène d'autorégulation) (26).

Afin de réguler la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la cellule, des mécanismes sont aussi en place pour permettre au calcium de retourner à l'intérieur du RE, suite à son action cellulaire. Ce sont les pompes sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCAs) qui permettent l'entrée de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique. Elles utilisent l'ATP afin de forcer l'entrée de calcium contre son gradient électrochimique (30).

Mitochondrie

La mitochondrie est la 2^e plus importante source intracellulaire de Ca^{2+} après le RE. Elle emmagasine environ 25% du calcium global de la cellule. La mitochondrie a longtemps été perçue comme ayant pour seule fonction la production d'ATP, mais de nombreux travaux démontrent maintenant son importance dans l'homéostasie calcique cellulaire (26, 31, 32). De

plus, le calcium mitochondrial a un rôle important dans la formation de l'ATP. La régulation de la concentration calcique intra-mitochondriale est aussi primordiale pour la survie cellulaire (33).

Dans les cellules endothéliales, la sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie est possible par l'échangeur sodium-lithium-calcium (NCLX ou mNCX). Le NCLX échange trois molécules de sodium (Na^+) pour permettre la sortie d'une molécule de Ca^{2+} (34). Il est différent de l'échangeur sodium-calcium (NCX) retrouvé à la membrane cellulaire. Il a, notamment, été montré que le NCX mitochondrial (NCLX ou mNCX) pouvait aussi utiliser l'ion lithium (Li^+) pour co-transporter le Ca^{2+} (d'où l'abréviation NCLX) (35).

De manière physiologique, le NCLX est la seule voie connue qui permet la sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie. Par contre, lors de certaines pathologies, le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) peut s'ouvrir. Le mPTP n'est jamais utilisé de manière physiologique (36, 37). Il est situé à la membrane interne des mitochondries et s'ouvre lorsque la concentration calcique dans la matrice mitochondriale devient trop élevée (voir délétère) pour la mitochondrie. Par exemple, s'il a un défaut dans la régulation du Ca^{2+} mitochondrial.

Le mPTP est non-spécifique et peut laisser sortir toutes les molécules de 1,5 kDa et moins contenues dans la mitochondrie (pas uniquement le calcium). Ceci perturbe grandement l'homéostasie mitochondriale et peut exacerber la pathologie (38). Des travaux ont montré que l'inhibition de l'activité du NCLX à la membrane mitochondriale menait à une rupture de la balance calcique dans la mitochondrie, à l'ouverture du mPTP et à la mort cellulaire (39, 40).

L'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie est possible grâce à l'unipporteur calcique mitochondrial (MCU) (41). Le MCU est lui aussi localisé à la membrane interne de la mitochondrie. Il est hautement sélectif et son activité est modulée par la concentration calcique cytoplasmique (26, 33, 42). Les voies d'entrée et de sortie du calcium du RE et de la mitochondrie sont schématisées à la figure 3.

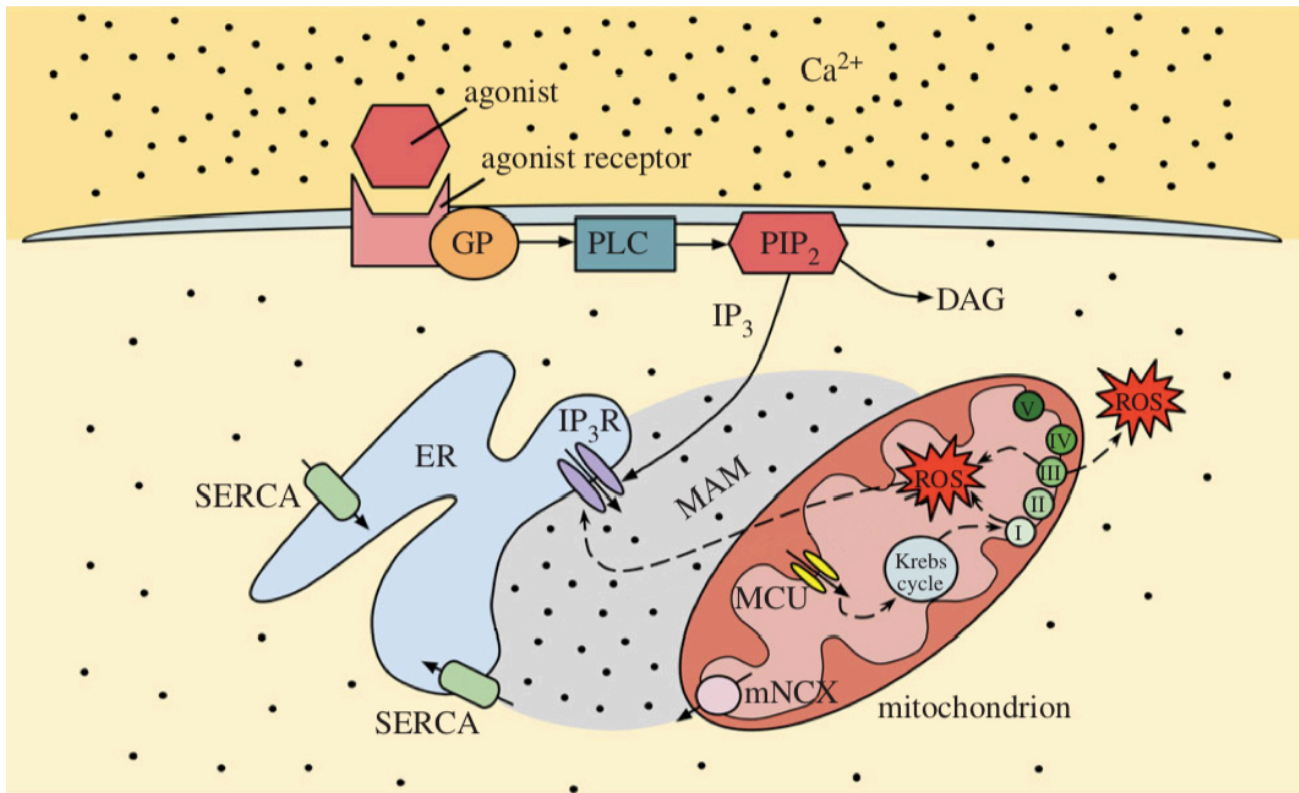


Figure 3. Schématisation des voies de transport du calcium.

Le calcium entre dans le réticulum endoplasmique grâce aux pompes SERCA et il sort du RE par les récepteurs à IP_3 . Le calcium entre dans la matrice mitochondriale à l'aide de l'uniporteur calcique mitochondrial et il sort de la mitochondrie par l'échangeur sodium-calcium mitochondrial. La production d' IP_3 est possible par l'activation de PLC via un récepteur à protéine G. La production de ROS par la mitochondrie peut se faire par le complexe I ou III de la chaîne et le récepteur à l' IP_3 est sensible aux ROS. (Adapté d'après Alevriadou BR. et coll., 2017. (26))

Agonist : agoniste, Agonist receptor : récepteur de l'agoniste, Ca^{2+} : calcium, DAG: diacylglycérol, ER : réticulum endoplasmique, GP : protéine G, IP_3 : inositol 1,4,5-trisphosphate, IP_3R : récepteur à l' IP_3 , MAM : *mitochondria-associated membranes*, Mitochondrion : mitochondrie, MCU : uniporteur calcique mitochondrial, mNCX : échangeur sodium-calcium mitochondrial, PIP_2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PLC : phospholipase C, ROS : dérivés réactifs de l'oxygène, SERCA : pompe sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.

Calcium extracellulaire

À la membrane cellulaire des cellules endothéliales, des canaux participent aussi grandement à la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Le calcium est présent en plus grande quantité à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule (43). Ce gradient peut être utilisé par la cellule afin de réguler sa concentration calcique intracellulaire, notamment lorsque les réserves calciques intracellulaires (RE et mitochondrie) sont déplétées.

Tout d'abord, les canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRPs) permettent l'entrée de calcium dans la cellule. Ils peuvent être stimulés par le Ca^{2+} , la CaM, la température ($> \sim 27^\circ\text{C}$), les forces de cisaillement et autres (44). Il y a 28 types de TRPs connus dans la littérature (27 de présent chez l'humain). Ils possèdent tous des structures semblables, mais ont des modes d'activation différents (45).

Ensuite, la sortie du calcium est possible via l'échangeur sodium-calcium (NCX) et les pompes ATPase de la membrane plasmique (PMCA). Le NCX est retrouvé à la membrane cellulaire (39). Tout comme le NCLX, le NCX échange trois molécules de sodium (Na^+) pour permettre la sortie d'une molécule de Ca^{2+} . Il utilise le gradient électrochimique du sodium afin de sortir le Ca^{2+} de la cellule. Les PMCA utilisent de l'ATP pour sortir le calcium contre son gradient électrochimique. Il existe 4 sous-types de PMCA (les sous-types 1, 2, 3 et 4) codés par 4 gènes différents (46, 47). Les PMCA possèdent une affinité plus grande pour le Ca^{2+} que le NCX, mais elles sont un peu plus lentes, puisqu'elles utilisent de l'ATP (47).

En résumé, l'homéostasie calcique endothéliale est régulée grâce à l'équilibre entre l'entrée et la sortie de Ca^{2+} pouvant provenir de 3 principales sources : le RE, la mitochondrie et le Ca^{2+} extracellulaire. L'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est possible via les IP_3Rs , le NCLX et les TRPs. La diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est possible via les pompes SERCA, le MCU et le NCX.

1.2.2 Dynamiques calciques

Afin de réguler l'activité des nombreuses voies dépendantes du calcium, la concentration calcique intracellulaire endothéliale fluctue. Ces fluctuations sont énormément étudiées et elles portent le nom de « dynamiques calciques ». Il existe plusieurs types de dynamiques, notamment les « blips », les « puffs », les « *sparklets* », les « pulsars » et autres. Elles varient toutes dans leurs cinétiques uniques et leurs développements spatio-temporels différents (voir Tableau I). Les *sparklets*, par exemple, sont causés par les canaux TRPs et la cinétique de cette dynamique varie en fonction de l'isoforme de TRP impliqué (48). Dans le cadre de ce mémoire, seuls les pulsars seront traités, puisque le pulsar est une dynamique localisée à un endroit précis et stratégique (la PME) qui dépend du calcium intracellulaire et dont son impact sur le tonus vasculaire a déjà été démontré (49, 50).

<i>Dynamiques</i>	<i>Durée (ms)</i>	<i>Superficie (μm^2)</i>	<i>Amplitude (F/F_0)</i>	<i>Source</i>
<i>Blips</i>	De 10 à 100	1 à 3 μm	$0,29 \pm 0,1$	(51, 52)
<i>Puffs</i>	100	~ 3	50 nM	(52)
<i>Sparklets</i>	$37,0 \pm 0,7$	$11.2 \pm 0,4$	De 0,19 à 0,29	(23) (pour l'isoforme TRPV4)
<i>Pulsars</i>	257 ± 12	$15,9 \pm 0,6$	$1,77 \pm 0,10$	(53)

Tableau I. Valeurs moyennes de paramètres cinétiques pour les différentes dynamiques calciques (blips, puffs, sparklets et pulsars).

Les valeurs des « blips » ont été recueillies dans des cellules endothéliales d'artère pulmonaire en culture, alors que les valeurs de « sparklets » et des pulsars ont été recueillies à l'aide de cellules endothéliales in situ provenant d'artère mésentérique murine.

Globales

Certaines fluctuations de la $[Ca^{2+}]_i$ sont répandues à travers toute la cellule. Il s'agit alors d'une augmentation calcique dite « globale ». Cette dynamique peut être activée par l'action d'un agoniste cellulaire telle l'acétylcholine, mais aussi par des stimuli mécaniques sur les cellules endothéliales (comme les forces de cisaillement) (22, 54). Quoiqu'elles peuvent être utiles au niveau physiologique, les augmentations globales de Ca^{2+} peuvent parfois être délétères pour la cellule. Une augmentation du calcium intracellulaire prolongée peut notamment entraîner la mort cellulaire (55).

Pulsars

À l'opposé des augmentations globales de calcium, les pulsars sont des dynamiques calciques locales qui se manifestent dans les cellules endothéliales. Un pulsar calcique est, par définition, une libération spontanée de Ca^{2+} à un endroit précis de la cellule. Le mécanisme du pulsar est une relâche de Ca^{2+} par le RE suite à l'activation des IP_3Rs (6).

Les pulsars sont localisés dans les perforations de la LEI et donc dans les PME. Avec des expériences d'immunofluorescence, Ledoux et coll. ont montré, en 2008, la localisation d' IP_3Rs dans les trous de la LEI (53) confirmant que les pulsars sont co-localisés avec des récepteurs à l' IP_3 . Les pulsars, situés dans les PME, permettent une communication de premier plan entre les CE et les CMLs, en plus d'être économiques pour la CE par la restriction spatiale de la dynamique calcique.

Les IP_3Rs peuvent être activés par l' IP_3 pour générer un pulsar. Ils sont aussi sensibles aux variations intracellulaires d'ATP et de calcium (29). La source du pulsar est bien documentée, mais les mécanismes par lesquels les pulsars sont régulés sont méconnus. Il est difficile de prévoir quand le pulsar se produira et à quelle fréquence. Ceci procure aux pulsars la composante spontanée de cette dynamique. Les pulsars sont en effet présents dans l'endothélium en condition basale, donc en l'absence de stimulation (56).

La fréquence des pulsars peut, par contre, être augmentée par la stimulation de la cellule endothéliale. L'activation d'un récepteur à protéine G, à la surface de la cellule,

entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂). Ce clivage génère du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). Le DAG reste à la membrane pour exercer ses effets physiologiques de second messenger (par exemple, l'activation de la protéine kinase C (PKC)). L'IP₃ aura pour effet d'activer les IP₃Rs (24, 26, 53), ce qui entraîne la formation de pulsars et l'augmentation de leur fréquence.

1.3 Mitochondrie

La mitochondrie est une organelle essentielle au bon fonctionnement de la cellule. Les mitochondries étaient anciennement des bactéries capables de vie indépendamment d'un hôte cellulaire. Ceci explique pourquoi la mitochondrie est la seule organelle à contenir son propre matériel génétique. L'intégration des mitochondries à l'intérieur des eucaryotes aurait donné la chance à ces organismes (alors unicellulaires) de se développer. Les mitochondries pouvaient leur fournir l'énergie supplémentaire requise qu'ils ne possédaient pas avant avec l'unique utilisation de la glycolyse (57, 58).

La mitochondrie possède de nombreuses fonctions. Outre, la production d'énergie sous forme d'ATP, elle possède un rôle important dans l'homéostasie calcique intracellulaire (26, 31, 32). De plus, la mitochondrie produit une importante quantité de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui sont primordiaux pour la physiologie de la cellule (chapitre 1.4).

1.3.1 Structure de la mitochondrie

La mitochondrie est composée de 2 membranes, interne et externe. À l'intérieur de la membrane interne se trouve la matrice mitochondriale et entre les deux membranes se trouve l'espace intermembranaire (59). L'espace intermembranaire est plus riche en ions hydrogène (H⁺) que la matrice mitochondriale. La différence ionique entre l'espace intermembranaire et la matrice crée un gradient électrochimique qui confère une différence de potentiel membranaire à la mitochondrie (60).

1.3.2 Production d'ATP

La production d'ATP est possible par le libre passage d' H^+ vers la matrice. Les ions hydrogène passent à travers le complexe protéique ATP synthase situé à la membrane interne. Ce passage active l'ATP synthase qui phosphoryle l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) (61).

Chaîne de transport des électrons

Grâce à sa chaîne de transport des électrons, la mitochondrie peut maintenir ce gradient électrochimique elle-même. Cette chaîne est constituée de 5 complexes protéiques transmembranaires qui sont illustrés à la figure 4. Les complexes I, III et IV servent à pomper des ions hydrogènes dans l'espace intermembranaire. Le complexe V est l'ATP synthase. Il utilise le passage des ions hydrogènes pour synthétiser l'ATP (62).

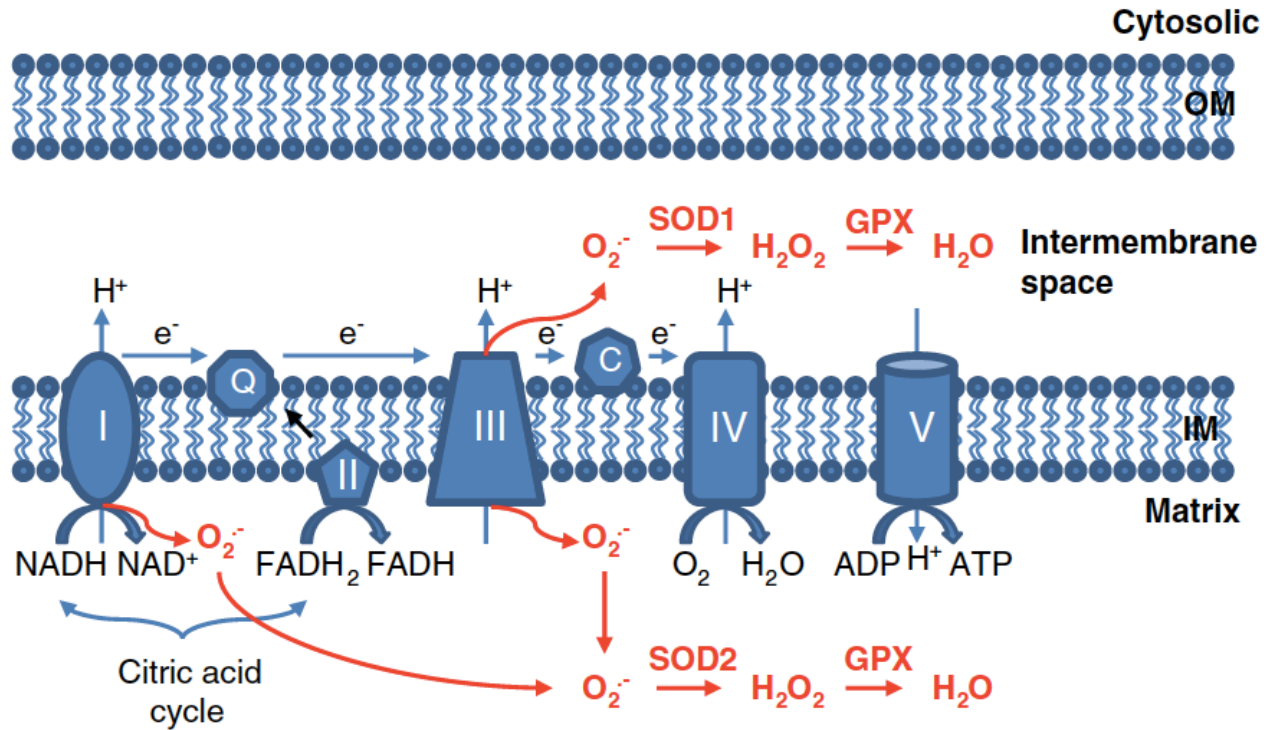


Figure 4. Chaîne de transport des électrons.

Schéma représentant les 5 complexes (I, II, III, IV et V) formant la chaîne de transport des électrons et qui ensemble mènent à la formation d'ATP, ainsi que les endroits propices à la production de ROS par la chaîne. (D'après Li X. et coll., 2013 (61))

ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate, C : cytochrome C, Citric acid cycle : cycle de l'acide citrique, Cytosolic : cytoplasme, e^- : électron, $FADH_2$: flavine adénine dinucléotide (forme hydroquinone), $FADH$: flavine adénine dinucléotide (forme semiquinone), GPx : glutathion peroxydase, H^+ : ion hydrogène, H_2O : eau, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, IM : membrane interne, Intermembrane space : espace intermembranaire, Matrix : matrice, NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée), $NADH$: nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite), O_2 : oxygène, O_2^- : anion superoxyde, OM : membrane externe, SOD1/2 : superoxyde dismutase (isoformes 1 et 2).

1.3.3 Calcium mitochondrial

Tel que déjà mentionné, le calcium mitochondrial aide à maintenir l'homéostasie du calcium endothélial. Le calcium mitochondrial possède aussi des fonctions importantes à l'intérieur même de la mitochondrie et sa régulation est primordiale.

Dans la mitochondrie (tel que dans la cellule), le calcium agit comme un important second messenger pour certaines voies de signalisation. En effet, il est un agent régulateur dans la production d'ATP (63, 64). Sa présence augmente la respiration mitochondriale. Par contre, à forte concentration, le Ca^{2+} peut bloquer totalement la production d'ATP (64).

Des travaux ont aussi montré que les cellules exprimant le MCU (comme les cellules endothéliales) étaient plus sensibles à l'apoptose. Une activité augmentée du MCU augmente la concentration intra-mitochondriale de Ca^{2+} et prédispose la cellule à une apoptose (28). Ceci démontre encore une fois l'importance de la régulation calcique.

1.4 Dérivés réactifs de l'oxygène

Dans tous les organismes utilisant l'oxygène (O_2) pour leurs réactions physiologiques, il y aura production des métabolites nommés dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Il existe plusieurs molécules différentes dans la famille des ROS. Par définition, un ROS est une molécule chimique contenant de l' O_2 qui a perdu un électron, ceci la rendant très réactive (65). À cause de leur réactivité, les ROS ont longtemps été perçus comme nocifs pour la cellule. Par contre, vers les années 80, il fut démontré que les dérivés réactifs de l'oxygène font partie intégrante de l'homéostasie de la cellule (66-68) et que leur déplétion complète est aussi toxique pour la cellule que l'augmentation de leur production (69). Ces sous-produits du métabolisme sont donc de mieux en mieux documentés.

Un des principaux ROS est l'anion superoxyde (O_2^-). Comme beaucoup de ROS, il a une demi-vie très courte (66, 68), puisqu'il est très réactif. Ceci le rend difficile à étudier. Il est normalement rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) grâce à l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (68, 70). Le H_2O_2 peut ensuite être transformé en eau (H_2O) et oxygène, réaction catalysée par la catalase (CAT). D'autres molécules comptent parmi les

ROS, comme le radical hydroxyde (HO^\bullet), le monoxyde d'azote (NO^\bullet), le peroxydinitrite (ONOO^-).

1.4.1 Sources de ROS

La production de ROS dans la cellule est possible par diverses sources, puisque la plupart des réactions physiologiques cellulaires utilisent de l' O_2 . Par contre, la majeure partie de la production de ROS provient de deux sources principales : les enzymes NADPH oxydase (NOXs) et la mitochondrie (71). Pour ce mémoire, les ROS provenant de la mitochondrie seront plus approfondis à cause du positionnement intracellulaire stratégique des mitochondries (voir la mise en contexte du mémoire).

NADPH oxydase

La NOX est un complexe enzymatique à 6 passages transmembranaires. Chez les mammifères, il existe 7 isoformes (NOX1 à 5, DUOX1 et DUOX2) (70, 72). Seul NOX1, 2, 4 et 5 sont exprimés dans l'endothélium vasculaire (73). Les complexes enzymatiques NOXs sont les seuls enzymes à avoir pour seule fonction connue la production de ROS. Certains isoformes produisent du O_2^- et d'autres du H_2O_2 . Toutes les NOXs produisent les ROS, non pas comme le déchet d'une réaction, mais bien pour le maintien de la physiologie cellulaire (68, 73).

Mitochondrie

Dans la mitochondrie, les ROS sont produits par la chaîne de transport des électrons (voir la Fig. 4). Dans la littérature, il est dénombré que la chaîne de transport possède 7 sites où la production de ROS peut survenir (74, 75). Par contre, ce sont les complexes protéiques I et III qui sont responsables de la majeure partie de la production de ROS mitochondriaux. Aux complexes I et III de la chaîne, il est possible qu'un électron soit « échappé » par les complexes (une fuite d'électron) (74, 76). Cet électron libre interagit avec une molécule d' O_2

et cause la formation d'un anion superoxyde (O_2^-) (77). La production de superoxyde fait partie de l'activité basale de la chaîne. Le superoxyde ne passe pas les membranes cellulaires. Ainsi, une fois produit, il est transformé en H_2O_2 par la CAT. Cette molécule traverse les membranes afin d'exercer son effet intracellulaire (66).

Tout comme le ROS cellulaire, les ROS mitochondriaux (mROS) ont de nombreuses fonctions dans la physiologie cellulaire. En effet, des études démontrent que les mROS ont un rôle à jouer dans l'homéostasie vasculaire (12), ainsi que dans l'activation de molécules de survie cellulaire (par les voies de signalisation NF- κ B et TNF- α) (26). Ils participent aussi au recrutement de synapses inhibitrices médié par le neurotransmetteur acide γ -aminobutyrique (GABA) (78) et sont une composante importante du système immunitaire, parce que les ROS sont antimicrobiens (65, 68).

1.4.2 Stress oxydatif

Le stress oxydatif survient lorsque la balance oxydative est rompue; c'est-à-dire, lorsque la production de ROS excède la capacité antioxydante de la cellule (66). Une trop grande quantité de ROS dans la cellule est associée à des dommages aux protéines cellulaires, aux lipides, ainsi qu'à l'acide désoxyribonucléique (ADN) (68, 71). Dans l'endothélium par exemple, le stress oxydatif est corrélé à de nombreuses maladies cardiovasculaires, parce que l'excès de ROS cause une dysfonction endothéliale (79, 80).

1.4.3 Antioxydants cellulaires

De manière physiologique, les ROS sont utiles à la signalisation cellulaire, mais une trop grande quantité de ROS est délétère pour la cellule. La cellule doit conserver sa balance oxydative (77). Pour ce faire, des mécanismes sont en place afin de transformer les ROS en eau ou les retransformer en O_2 (voir la Fig. 5). Ces mécanismes sont qualifiés « d'antioxydants ». Ils existent plusieurs molécules antioxydantes, notamment les enzymes SOD et CAT.

Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase permet la catalyse de la transformation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène. La SOD est une métallo-enzyme qui existe sous trois isoformes chez les mammifères. La SOD1 se retrouve dans le cytoplasme de la cellule et l'espace intermembranaire de la mitochondrie et la SOD3 est extracellulaire. Les deux isoformes contiennent en leurs sites actifs des ions Cuivre/Zinc. La SOD2 est présente dans la matrice mitochondriale et possède un ion manganèse à son site actif (81).

Catalase et glutathion peroxydase

La catalase et le glutathion peroxydase (GPx) sont des enzymes qui catalysent la réaction qui transforme le H_2O_2 en H_2O . La catalase se situe principalement dans les peroxysomes, mais elle peut aussi être dans le cytosol et dans les mitochondries. Le GPx se retrouve dans le cytosol et les mitochondries. (82).

Ensemble, les antioxydants protègent la cellule des dommages du stress oxydatif.

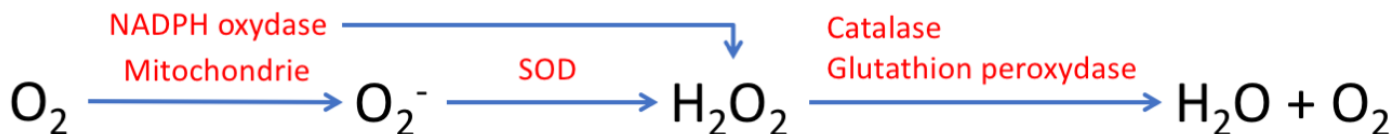


Figure 5. Schématisation simplifiée des réactions de transformation des ROS.

Tout d'abord, l'anion superoxyde est produit à partir d'oxygène par les NADPH oxydases (NOXs) ou la mitochondrie. La SOD catalyse la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Selon l'isoforme des NOXs impliqué, les NOXs peuvent produire l'anion superoxyde ou directement produire le peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène peut ensuite être transformé en eau et en oxygène par la catalase ou la glutathion peroxydase.

H_2O : eau, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, NOX : NADPH oxydase, O_2 : oxygène, O_2^- : anion superoxyde, SOD : superoxyde dismutase.

Mise en contexte du mémoire

Dans les pays développés et en voie de développement, les maladies cardiovasculaires sont un véritable fléau. Elles sont responsables de 31% des décès annuels mondiaux (WHO, 2019). Afin de mieux les prévenir et les traiter, il est primordial de mieux connaître le fonctionnement du système cardiovasculaire.

Dans le système cardiovasculaire, le maintien de la pression artérielle est nécessaire à la perfusion adéquate de chaque organe et au maintien de leurs fonctions physiologique. Une maladie cardiovasculaire des plus répandues est l'hypertension. Il s'agit d'une élévation chronique de la pression artérielle qui entraîne de nombreux désordres circulatoires et peut mener à de plus graves maladies cardiovasculaires, tel un anévrisme. De nombreuses études montrent que l'hypertension est associée à des dysfonctions endothéliales (14, 15). En effet, dans le système artériel, la régulation du tonus vasculaire est modulée via des mécanismes activés par le calcium endothélial. C'est par les fluctuations de la concentration de calcium intracellulaire (ou les dynamiques calciques) que l'endothélium active des voies de signalisation impliquées dans la modulation de la relaxation et la contraction du muscle lisse vasculaire.

Plusieurs dynamiques calciques endothéliales et musculaires lisses ont été décrites dans le système artériel. Notamment, en 2008, Ledoux et coll. ont caractérisé pour la première fois les pulsars calciques (53). Le pulsar est une relâche de calcium localisée, à un endroit dans la cellule endothéliale, et est médié par les IP_3 Rs. Le mécanisme par lequel la relâche de calcium se produit est bien décrit dans la littérature (6, 56), mais les pulsars apparaissent de manière spontanée et leur régulation est méconnue.

Cependant, suite à leur découverte, certains laboratoires ont cherché à mieux comprendre leurs impacts dans le système cardiovasculaire. En 2012, Nausch et coll. ont montré que l'augmentation de la fréquence des pulsars (par stimulation du système sympathique) diminue la vasoconstriction artérielle (49). Francis et coll. ont ensuite montré en 2016, à l'aide de myographie, l'importance du récepteur à l' IP_3 et du pulsar dans le contrôle du tonus vasculaire par l'endothélium dans des artères coronaires (50).

Ainsi, les travaux de ces auteurs suggèrent un rôle physiologique important des pulsars, mais une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs des pulsars calciques demeure nécessaire. Cela pourrait aussi aider à mieux comprendre les mécanismes par lesquels, par exemple, une hypertension liée à une dysfonction endothéliale est causée chez l'humain.

Le stress oxydatif a aussi un rôle important dans le développement de plusieurs pathologies cardiovasculaires, notamment l'athérosclérose. Par exemple, avec l'âge, la balance oxydative peut se dérégler et entraîner un stress sur l'organisme. Ceci peut alors mener à une ou des pathologies. Tel que vu dans l'introduction, le stress oxydatif peut provenir de plusieurs sources cellulaires, notamment la mitochondrie et la NADPH oxydase. Par contre, des images en microscopie électronique effectuées dans le cadre de travaux dans notre laboratoire ont montré que les mitochondries dans la cellule endothéliale sont disposées en regroupement à proximité des PME (papier soumis). Leur disposition dans la cellule est stratégique pour avoir un effet régulateur sur les pulsars.

De plus, en 2018, une étude a démontré que la supplémentation orale d'un chélateur à ROS mitochondrial (le MitoQ) améliorait les fonctions endothéliales vasculaires et réduisait la rigidité artérielle chez des humains âgés et ne présentant aucune pathologie cardiovasculaire (83). Par contre, l'âge est associé à une augmentation du stress oxydatif (84, 85). Lors du dépistage clinique de l'étude, tous les patients souffraient d'altérations des fonctions endothéliales dues à l'âge. En améliorant les fonctions vasculaires de ses patients, le MitoQ aide à ramener le stress oxydatif à un niveau normal et, ainsi, aide à prévenir le développement de maladies cardiovasculaires. Cette étude montre le lien existant entre les ROS mitochondriaux et la fonction endothéliale, puisque le MitoQ améliore les fonctions vasculaires des patients.

Les travaux de ce mémoire ont été réalisés afin de mieux comprendre le rôle des ROS mitochondriaux dans la régulation des dynamiques calciques de l'endothélium.

2.1 Hypothèse du mémoire

L'hypothèse principale des travaux de ce mémoire est que le stress oxydatif provenant des mitochondries agit comme mécanisme de régulation pour la dynamique calcique endothéliale nommée « pulsar ». Nous pensons que la diminution des ROS mitochondriaux entraînera une régulation négative des pulsars et donc une diminution de leur fréquence.

2.2 Objectifs du mémoire

L'objectif principal de ce mémoire était d'évaluer l'impact des ROS mitochondriaux sur les pulsars calciques. Plusieurs objectifs secondaires y étaient associés, soit :

- Évaluer l'impact de la stimulation cellulaire sur la production de ROS mitochondriaux
- Déterminer l'effet de l'augmentation des ROS mitochondriaux sur l'endothélium natif en absence de stimulation
- Déterminer l'effet de la chélation des ROS mitochondriaux sur l'endothélium natif en absence de stimulation
- Déterminer l'effet de la variation des ROS mitochondriaux sur des cellules endothéliales humaines en absence de stimulation
- Déterminer l'impact des ROS cytosoliques sur les dynamiques calciques des cellules endothéliales humaines en absence de stimulation

Article

Titre : Mitochondrial Modulation of Calcium Pulsars through Oxidative Stress.

Cet article est prêt pour soumission dans le journal : Plos One

Auteurs: Marianne BERLATIE, Fanny TOUSSAINT, Alexandre BLANCHETTE et Jonathan LEDOUX.

Apport original et contribution des coauteurs :

Marianne Berlatie : Conception du projet, réalisation de la plupart des expériences, collecte et analyse des données, interprétation des résultats, conception des figures, rédaction du manuscrit, révision du manuscrit et approbation de la version finale du manuscrit.

Fanny Toussaint : Conception du projet, aide lors de la réalisation de certaines expériences, participation à la cueillette de données, participation à l'analyse des données, révision du manuscrit et approbation de la version finale du manuscrit.

Alexandre Blanchette : Participation à la cueillette de données, 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 Manuscrit

Title: Mitochondrial Modulation of Calcium Pulsars through Oxidative Stress

Authors: Marianne BERLATIE^{1,2}, Fanny TOUSSAINT^{1,2}, Alexandre BLANCHETTE¹ et Jonathan LEDOUX^{1,2,3*}

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

Departments of ² Pharmacology and Physiology and ³ Medicine, Université de Montréal, Montréal, Qc, 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

Ca²⁺: Calcium

ROS: Reactive oxygen species

mROS : mitochondrial ROS

SMC: Smooth muscle cell

EC: Endothelial cell

MEP: Myoendothelial projection

IP₃: Inositol 1,4,5-trisphosphate

NOX: NADHP oxidase

PET: Polyethylene terephthalate

HCASMC: Human coronary artery smooth muscle cells

HCAEC: Human coronary artery endothelial cells

PSS: Physiological salt solution

ROIs: Regions of Interest

AA: Antimycin A

ACh: Acetylcholine

CTL: Control

NO: Nitric oxide

EDHF: Endothelium-derived hyperpolarizing factors

ATP: Adenosine triphosphate

ER: Endoplasmic reticulum

IP₃R: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor

O₂⁻: Superoxide anion

H₂O₂: Hydrogen peroxide

SOD: Superoxide dismutase

Abstract

Intracellular calcium signaling is central to endothelial control of vascular tone and modulation of tissue perfusion. Local Ca^{2+} signals such as pulsars are important to endothelial function, but the regulatory mechanisms involved are poorly understood. Mitochondria, major modulators of intracellular signaling, were identified near myoendothelial projections, sites of Ca^{2+} pulsars, in native endothelium. Mitochondria produce reactive oxygen species (ROS) through respiratory chain activity. We hypothesized that oxidative stress from mitochondrial origin (mROS) might modulate intracellular Ca^{2+} dynamics in endothelium. The impact of mROS on endothelial Ca^{2+} dynamics in mesenteric arteries from mice was assessed using high speed confocal imaging. Stimulation of mROS production with antimycin A significantly increased Ca^{2+} pulsars frequency. On the other hand, chelation of mROS with the mitochondria-targeted antioxidant MitoTempo decreased pulsars frequency. An endothelium-vascular smooth muscle cells co-culture model was also used to monitor endothelial Ca^{2+} dynamics in response to mROS. Similar to native endothelial cells, exposure to Antimycin A enhanced Ca^{2+} pulsars activity whilst MitoTempo decreased pulsars frequency in endothelial cells. Application of Tempol, a cytosolic ROS chelator, did not affect calcium pulsar frequency, suggesting that the observed effect is restricted to ROS from mitochondrial origin. Therefore, mitochondria appear to modulate endothelial Ca^{2+} dynamics through production of reactive oxygen species. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular diseases could lead to impaired endothelial Ca^{2+} signaling and endothelial dysfunction.

Keywords : Endothelium, calcium, oxydative stress, pulsars, mitochondria, artery

Introduction

Contraction of arterial smooth muscle cells (SMCs) is tightly regulated to ensure appropriate tissue perfusion and maintain blood pressure. Endothelial cells (ECs) are essential partners in the control of vascular tone. ECs influence vascular diameter through several mechanisms including the generation of vasodilators such as nitric oxide, PGI₂ and EDHF (endothelium-dependent hyperpolarizing factors). These pathways are activated by an elevation of endothelial intracellular Ca²⁺ levels. Endothelial calcium homeostasis is thus critical to vascular tone. Accordingly, calcium dyshomeostasis leads to endothelial dysfunction and is associated with cardiovascular diseases.

Bi-directional communication between ECs and vascular SMCs occurs through myoendothelial projections (MEPs), a specialized structure allowing direct communication between the two cell types through the internal elastic laminae. These MEPs are also the sites of local Ca²⁺ transients in ECs called Ca²⁺ pulsars. These pulsars are spontaneous Ca²⁺ releases from IP₃ receptors within endothelial cells. Propagation of this Ca²⁺ signal is limited to the MEP vicinity. The mechanisms involved in the regulation of the spatiotemporal properties of endothelial localized Ca²⁺ dynamics are poorly understood, in spite of the significant impact they could have on endothelial function. For example, pulsars are involved in endothelium-dependent regulation of vascular tone (1, 2).

Generally considered as harmful byproducts, reactive oxygen species (ROS) are also important signaling molecules in vascular cells. A delicate balance between ROS production and elimination is important for cellular homeostasis (3, 4). Evidence suggest that ROS might modulate intracellular Ca²⁺ signaling in several cell types, including endothelial cells. The main sources of ROS in endothelial cells are NADHP oxidases (NOX) and mitochondria (5, 6). Mitochondrial ROS (mROS) are generated by the electron transport chain located at the inner membrane during the process leading to the production of ATP.

Endothelial mitochondria have been located at the cleft of MEPs and is suggested to modulate Ca²⁺ pulsars. Mitochondrial regulation of Ca²⁺ pulsars could occur through several mechanisms such as the control of endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels or local cytoplasmic Ca²⁺

levels. Proximate production and release of mROS might also have a significant impact on Ca^{2+} pulsars. Therefore, we hypothesized that mitochondrial ROS act as a regulatory mechanism for Ca^{2+} pulsars, therefore a decrease in mROS would result in a downregulation of pulsars and lead to lower Ca^{2+} pulsar frequency.

Material and methods

Tissue preparation

Animal studies were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Montreal Heart Institute Animal Care Committee. Mesenteric resistance arteries were harvested from C57Bl6 mice (3-4 months old) and cleaned from all connective and adipose tissue. Third- and fourth-order arteries were cut longitudinally and pinned on Sylgard (Dow Corning Corp., USA) blocks with the endothelium facing up (*en face* configuration) in cold HEPES solution (134 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4).

Co-culture

Endothelium and smooth muscle co-culture was performed as described (7). Briefly, polyethylene terephthalate (PET) membranes (0,4 µm pore size) from inserts (12 mm Transwell, Corning) were incubated with fibronectine (5 µg/mL) at 37°C for 30 min. Human coronary artery smooth muscle cells (HCASMC) were placed on one side of the membrane (insert were flipped upside down) ($\approx 2.5 \times 10^5$ cells/ml). A 3-hour period was allowed for cell adhesion before the inserts were flipped back in a 12 wells tissue culture plate (VWR) containing SMCs culture medium (SmGM-2, Lonza #CC-3182). SMC culture medium was changed after 24 hours. Then, the cell-free side of the membrane was coated with gelatin (0,5%, 37°C for 30 min) before human coronary artery endothelial cells (HCAEC) (2.4×10^5 cells/ml) in EC culture medium (EBM-2, Lonza #CC-3156 + EGM-2 MV, Lonza #CC-4147) were loaded on the membrane. Culture medium were changed every 24 hours. Co-culture preparations were used on Day 5 for calcium imaging. Polyester membranes were separated from their insert and pinned on Sylgard (Dow Corning Corp., USA) blocks with the HCAEC facing up in HEPES solution.

Endothelial calcium imaging

Arterial or co-culture preparations were incubated with Fluo-4 (10 μM) and pluronic acid (0,06%) in HEPES for 45 min at 37°C to preferentially load the endothelium. Incubation of Antimycin A (1 μM) was carried out by adding Antimycin A for the last 10 min of the Fluo-4 incubation period. Experiments with arterial preparations were carried out at 37°C in a physiological salt solution (PSS: 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 24 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgCl₂, 11 mM Glucose and 1,6 mM CaCl₂, 12% O₂, 5% CO₂). Experiments with co-culture preparations were performed in HEPES solution at room temperature.

Endothelial calcium dynamics from mesenteric arteries were monitored using a Revolution Andor confocal system (Andor Technology). The images were acquired at ≈ 15 frames/s (ex/em 488/510 nm) with an iXon EMCCD camera on a Nipkow-disk equipped Nikon upright microscope and a 60X, water-dipping objective (NA 1.0). Ca²⁺ dynamics analysis was performed with Sparkan software (A. Bonev, UVM) as previously described in Toussaint and al. (2015) (8). Briefly, Ca²⁺ pulsars sites were identified and Regions of Interest (ROIs) (5x5 pixels boxes) were manually positioned on pulsars initiation sites (see Fig. 1).

mROS detection

Monolayers of Telo-HCAEC were by plating cells 48 hours before the experiments on gelatin-coated lamellas (0,5%, 37°C for 30 min). Culture medium was changed every 24h. Prior to the experiments, cells were washed twice and placed in HEPES solution. They were then incubated in absence or presence of either Antimycin A (1 μM) or acetylcholine (10 μM) for 5 or 15 min at 37°C. Following the incubation period, cells were washed twice with HEPES solution. Mitochondrial Superoxide Assay Kit (abcam 228567) was used according to the manufacturer's recommendations. Cells were then washed one time with HEPES solution and fixed with fresh paraformaldehyde 4% (20 min). Finally, cells were incubated with DAPI for nucleus staining and mounting media with glycerol and dabco 4% was used. Fluorescence was recorded with a Zeiss LSM 710 system confocal microscope (63X oil objective/1.4, ex/em: 405/543 nm). All images were processed using CellProfiler 3.1.8 (9) to analyse fluorescence

intensity from superoxide staining. Fluorescence intensity measurements are for the whole field of view that is assessed.

Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 XML. Unpaired Student's T-test or ANOVA (with Tukey post-test) were done when appropriate. Values were considered significantly different when $P < 0.05$.

Results

Antimycin A increases mROS production

The impact of Antimycin A (AA) and acetylcholine (ACh) on mitochondrial ROS production was initially sought in endothelial cells (Fig. 2) with a mitochondria specific ROS indicator. The size and morphology of the fluorescent signal is similar to mitochondria shape in cultured endothelial cells (Fig. 2A) indicating that the O_2^- detected is within the organelle. Intracellular staining reporting O_2^- production within mitochondria was increased by ACh and Antimycin A. Strongest signal was detected in cells exposed for 15 min to either ACh (10 μ M) or Antimycin A (1 μ M) (Fig. 2B). Exposure to ACh for only 5 min significantly increased mROS staining (0.1489 ± 0.0006 and 0.1557 ± 0.0007 , for control (CTL) and ACh 5 min, respectively). Longer incubation with ACh or Antimycin A further increased mROS production (0.1630 ± 0.0006 and 0.1645 ± 0.0006 , respectively). This suggest that Antimycin A is an appropriate tool to stimulate mROS production and study its impact on intracellular Ca^{2+} signaling.

Mitochondrial ROS stimulates Ca^{2+} pulsars

Antimycin A was used to increase mROS production and study their impact on endothelial Ca^{2+} dynamics. Arteries were incubated with Antimycin A (1 μ M) for 10 minutes before endothelial intracellular Ca^{2+} was recorded. An increase in Ca^{2+} pulsars frequency was observed in the presence of Antimycin A ($0.042 \text{ Hz} \pm 0.005 \text{ Hz}$ and $0.09 \pm 0.01 \text{ Hz}$ in control and with Antimycin A, respectively) (Figure 3A). However, washout of Antimycin A abolished the stimulatory effect even if the tissue was preincubated with Antimycin A. This suggests that mROS stimulates Ca^{2+} pulsars but that this effect is reversible and transient. The stimulation of Ca^{2+} pulsars by mROS is not due to recruitment of de novo sites since the number of active sites was not affected by Antimycin A (Figure 3B).

Loss of mROS dampens Ca²⁺ pulsars

Since mitochondrial ROS enhanced endothelial Ca²⁺ pulsars, the impact of a reduction of spontaneous mROS production on endothelial Ca²⁺ signaling was then investigated in mesenteric arteries. MitoTempo (10 μM), a mitochondria-targeted antioxidant, was used to chelate basal mROS production. Application of MitoTempo induced a 50% reduction in Ca²⁺ pulsars frequency (Figure 4A). MitoTempo had no impact on the number of active Ca²⁺ pulsar sites (Figure 4B). These results suggest that basal production of ROS by mitochondria is a tonic stimulus for endothelial Ca²⁺ pulsars.

The impact of mROS on Ca²⁺ pulsars in co-culture

The impact of mitochondrial ROS on Ca²⁺ was also investigated in human primary microvascular endothelial cultured cells co-cultured with human vascular smooth muscle cells. The perforated membrane between the two cell types allows the formation of MEPs. The localisation within these MEPs of the apparatus for Ca²⁺ pulsars is then expected. Accordingly, transient and spatially-restricted Ca²⁺ increases were recorded in co-cultured endothelial cells. Properties of Ca²⁺ pulsars from co-cultured endothelium was similar to the one in native preparations (data not shown). However, propagation of the Ca²⁺ (spread of Ca²⁺ pulsar) was smaller in cultured endothelium (data not shown). Although laser was always kept to minimal intensity to avoid cellular damage, laser-induced phototoxicity was assessed in our preparation. In basal conditions, Ca²⁺ pulsar frequency was not altered by laser exposure for up to 10 min (Figure 5A). Antimycin A was used to stimulate mROS production in co-culture cells. Similar to native endothelium, application of Antimycin A (1 μM) increased Ca²⁺ pulsar frequency (141 ± 12% of control) (Figure 5B). However, unlike in arterial preparation, new Ca²⁺ pulsar sites were recruited (*de novo*) by exposure to Antimycin A. Moreover, these *de novo* sites had a lower frequency than the already active sites (Figure 4B insert).

Chelation of basal mROS with MitoTempo significantly reduced Ca²⁺ pulsars frequency (Fig. 5C). This suggests that basal production of ROS by mitochondria in human co-cultured cells is important to preserve Ca²⁺ pulsars activity levels in the absence of agonists. The impact

of ROS production from other sources than mitochondria was also assessed with Tempol, a cytosolic ROS scavenger. Tempol (100 μ M) had no effect on Ca^{2+} pulsars in human co-cultured cells (Figure 5D), suggesting that only ROS from mitochondria can stimulate endothelial Ca^{2+} dynamics.

Discussion

Mitochondria are important cellular organelles playing multiple roles, including providing the cell with energy through ATP. The process leading to ATP production also results in generation of ROS. In a physiological setting, ROS are important signaling molecules (4, 10). However, excessive ROS production or diminished antioxidant capacity have deleterious outcomes. Several cardiovascular pathologies have been linked to the loss of this delicate equilibrium. For example, hypertension and metabolic disease are associated with elevated oxidative stress (11, 12). In a recent clinical study, Rossman *et al.* showed that oral supplementation of a mitochondrial antioxidant (MitoQ) significantly improved endothelium function and reduce aortic stiffness in healthy elderly patients (13). Aging is associated with increased oxidative stress (14, 15). Although clinical screening did not associate a cardiovascular disease to all patients, age-associated impairments in endothelial function was common to the entire cohort. Through the reduction of mitochondrial oxidative stress to normal levels, MitoQ improved the vascular function of the patients and thus helped prevent progression of cardiovascular diseases. This study supports a potential connection between endothelial function and mitochondrial ROS.

Endothelial Ca^{2+} signaling is essential to its control on vascular tone (16). Ca^{2+} pulsars is a spontaneous Ca^{2+} release from the ER through IP_3R localized within MEPs. Intracellular calcium increase, via pulsars, can activate multiple signaling pathways to evoke the release of vasorelaxing factors such as nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) and leading to SMCs relaxation (17-19). Since IP_3R activity is sensitive to ROS (20), this channel could be the target of mROS and resulting in an altered endothelial Ca^{2+} signaling. Regulation of Ca^{2+} pulsars by mROS could be an efficient and fast approach to modulate endothelial function.

The results from this study supports the physiological link between basal ROS production by mitochondria and endothelial function through endothelial Ca^{2+} signaling. Indeed, stimulation of mROS production in resistance arteries from healthy mice enhanced endothelial Ca^{2+} pulsars. Antimycin A stimulates mROS production and induced a 2-fold increase in pulsars frequency. Interestingly, this relationship appears to require unceasing

mROS production as removal of Antimycin A from the extracellular environment rapidly returns endothelial Ca^{2+} activity to basal levels. This is consistent with the short half-life of O_2^- , approximately ≈ 5 sec (21, 22). The mitochondrial influence on endothelial Ca^{2+} through mROS production would then require be sustain, allowing a swift modulation of endothelial Ca^{2+} dynamics to match actual needs.

Basal production of ROS by mitochondria appears sufficient to stimulate Ca^{2+} pulsars. Indeed, in the absence of stimulation, scavenging of ROS within mitochondria with MitoTempo reduced by half resting Ca^{2+} pulsars frequency. This suggests that mitochondrial activity generates sufficient mROS to continuously provide stimulus for spontaneous endothelial Ca^{2+} signaling. This is an important finding as mROS could then be a key component of regulatory mechanisms involved in the spontaneous occurrence of Ca^{2+} pulsars. Therein, mitochondria activity would control the availability of IP_3R to generate Ca^{2+} pulsars in resting conditions. Moreover, mitochondria would be in a unique position to instantaneously adapt Ca^{2+} pulsars frequency to cellular needs. Indeed, a decrease in mROS production from resting condition would lower Ca^{2+} pulsars frequency and inversely, an increase in mROS would result in enhanced endothelial Ca^{2+} signaling.

The relevance or physiological meaning of *de novo* sites compared increased Ca^{2+} pulsars frequency is still unclear and requires further investigation. However, an absolute increase in pulsar frequency (increased frequency and/or *de novo* sites) is expected to hyperpolarize smooth muscle cells and promote vasodilation. The mechanisms involved in the regulation of these processes remain to be identified, but mitochondria could play be a key player. Endothelial Ca^{2+} pulsars, or similar endothelial Ca^{2+} transients, have been reported in different vascular beds and species. In this study, Ca^{2+} dynamics were monitored in endothelium from mouse resistance arteries and in human primary microvascular endothelial cells in co-culture were also used. Ca^{2+} were similar in the different preparations, in accordance with the pulsars being a well-preserved signaling pathway. Interestingly, Ca^{2+} pulsars from both human and mouse endothelium appears to be modulated by mitochondrial ROS production. Mitochondria might then be an interesting target for cardiovascular disease involving altered endothelial Ca^{2+} homeostasis.

The in-depth signaling pathway involved in the relation between mROS production and Ca^{2+} pulsars has yet to be identified. It appears unlikely that mitochondrial O_2^- diffuses to MEP and directly interacts with IP_3R . Although still matters of debates, studies reported that mitochondrial O_2^- is confined to mitochondria matrix and does not physiologically leaks out of the organelle (23). Oxidative stress can be provided by several sources within the cell, including NADPH Oxidase and mitochondria. However, in our conditions, only O_2^- from mitochondrial source appears to stimulate Ca^{2+} pulsars. The use of Tempol, a cytosolic antioxidant, did not mimic the effect of MitoTempo. This suggests that cytosolic O_2^- does not interact with IP_3R to evoke ER Ca^{2+} release and that an unidentified mediator is involved. Mitochondrial O_2^- would control intermediate signaling molecules modulating IP_3R activity within MEP. A candidate as second messenger would be hydrogen peroxide (H_2O_2). Superoxide is very unstable and rapidly dismutated in H_2O_2 by mitochondrial superoxide dismutase (SOD) (24). Unlike O_2^- , H_2O_2 can diffuse through lipid bilayers, out of mitochondria membranes and interacts with intracellular proteins. Further investigation is required to pinpoint the identity of the mitochondrial O_2^- regulated mediator involved in the control of endothelial Ca^{2+} pulsars.

Conclusion

In conclusion, mitochondrial oxidative stress is a major regulator of endothelial Ca^{2+} pulsars. However, the complex intertwined mechanisms involved in the control of Ca^{2+} pulsars activity does not rely solely on mitochondrial oxidative balance as elimination of mROS did not completely abolish Ca^{2+} pulsars. Nonetheless, mROSs are crucial to cellular homeostasis and have significant impact on vascular tone. Loss of mitochondrial oxidative equilibrium in mitochondria dysfunction would then be involved in endothelial dysfunction and cardiovascular diseases, such as hypertension.

References

1. Nausch LW, Bonev AD, Heppner TJ, Tallini Y, Kotlikoff MI, Nelson MT. Sympathetic nerve stimulation induces local endothelial Ca²⁺ signals to oppose vasoconstriction of mouse mesenteric arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(3):H594-602. Epub 2011/12/06.
2. Francis M, Waldrup JR, Qian X, Solodushko V, Meriwether J, Taylor MS. Functional Tuning of Intrinsic Endothelial Ca²⁺ Dynamics in Swine Coronary Arteries. *Circulation research*. 2016;118(7):1078-90. Epub 2016/02/04.
3. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*. 2014;24(10):R453-62. Epub 2014/05/23.
4. Taverne YJ, Bogers AJ, Duncker DJ, Merkus D. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013:862423. Epub 2013/06/06.
5. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2007;87(1):245-313. Epub 2007/01/24.
6. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology*. 2010;45(7-8):466-72. Epub 2010/01/13.
7. Biwer LA, Lechauve C, Vanhooose S, Weiss MJ, Isakson BE. A Cell Culture Model of Resistance Arteries. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2017(127). Epub 2017/09/21.
8. Toussaint F, Charbel C, Blanchette A, Ledoux J. CaMKII regulates intracellular Ca(2)(+) dynamics in native endothelial cells. *Cell calcium*. 2015;58(3):275-85. Epub 2015/06/24.
9. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques*. 2007;42(1):71-5. Epub 2007/02/03.
10. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002;82(1):47-95. Epub 2002/01/05.
11. Togliatto G, Lombardo G, Brizzi MF. The Future Challenge of Reactive Oxygen Species (ROS) in Hypertension: From Bench to Bed Side. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(9). Epub 2017/09/16.

12. Lahera V, de Las Heras N, Lopez-Farre A, Manucha W, Ferder L. Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension and Obesity. *Current hypertension reports*. 2017;19(2):11. Epub 2017/02/25.
13. Rossman MJ, Santos-Parker JR, Steward CAC, Bispham NZ, Cuevas LM, Rosenberg HL, et al. Chronic Supplementation With a Mitochondrial Antioxidant (MitoQ) Improves Vascular Function in Healthy Older Adults. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2018;71(6):1056-63. Epub 2018/04/18.
14. Baumann CW, Kwak D, Liu HM, Thompson LV. Age-induced oxidative stress: how does it influence skeletal muscle quantity and quality? *J Appl Physiol (1985)*. 2016;121(5):1047-52. Epub 2016/11/03.
15. Cui X, Xiao W, You L, Zhang F, Cao X, Feng J, et al. Age-induced oxidative stress impairs adipogenesis and thermogenesis in brown fat. *The FEBS journal*. 2019;286(14):2753-68. Epub 2019/04/10.
16. Ledoux J, Taylor MS, Bonev AD, Hannah RM, Solodushko V, Shui B, et al. Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(28):9627-32. Epub 2008/07/16.
17. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2006;21:69-78. Epub 2006/01/31.
18. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;956:511-40. Epub 2016/12/31.
19. Kerr PM, Tam R, Ondrusova K, Mittal R, Narang D, Tran CH, et al. Endothelial feedback and the myoendothelial projection. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2012;19(5):416-22. Epub 2012/04/27.
20. Zhang S, Fritz N, Ibarra C, Uhlen P. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype-specific regulation of calcium oscillations. *Neurochemical research*. 2011;36(7):1175-85. Epub 2011/04/12.
21. Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical reviews*. 2016;116(5):3029-85. Epub 2016/02/16.
22. Marklund S. Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*. 1976;251(23):7504-7. Epub 1976/12/10.

23. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox biology*. 2015;6:472-85. Epub 2015/10/04.
24. Muscoli C, Cuzzocrea S, Riley DP, Zweier JL, Thiemermann C, Wang ZQ, et al. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *British journal of pharmacology*. 2003;140(3):445-60. Epub 2003/10/03.

Figure legends

Figure 1. Analysis of calcium pulsars in mouse mesenteric arteries. **(A)** Typical field of view of endothelial cells from a mesenteric artery loaded with Fluo-4 (10 μ M). Regions of Interests (ROIs) represent active sites (location of a calcium pulsar). Scale = 10 μ m **(B)** Time course of local calcium levels in a typical experiment as in **A**, where the artery was exposed to MitoTEMPO (10 μ M), a mitochondria-targeted antioxidant, after 1 min. Traces represent fluorescence intensity from color-matched ROIs in **A**.

Figure 2. Mitochondrial ROS production by acetylcholine and Antimycin A. **(A)** Typical examples of Telo-HAEC monolayers with mROS (green) and nuclear (blue) staining. Prior fixation, cells were incubated for in absence (a; control) or in the presence of ACh (10 μ M) for 5 min (b) or 15 min (c) or with Antimycin A (1 μ M) for 15 min (d). Scale = 10 μ m. **(B)** Bar graph illustrating the impact of ACh and Antimycin A incubation in experiments as in **A**. n=4, 2, 4 and 4. ANOVA; * P <0.0001.

Figure 3. Effect of Antimycin A (10 μ M) on Ca^{2+} pulsars in mesenteric arteries. **(A)** Calcium pulsars frequency (Hz) in absence and the presence of Antimycin A (1 μ M) during the experiments. N=3 arterial preparations per condition.; n=41, 34 and 36 pulsars sites. AA: Antimycin A. ANOVA; * P < 0.0001. **(B)** Number of active sites in absence and the presence of Antimycin A (1 μ M) normalized to control condition. AA: Antimycin A. n=3 arterial preparations per conditions. ANOVA; P =0.66.

Figure 4. Effect of mROS chelation on Ca^{2+} pulsars in mesenteric arteries. **(A)** Calcium pulsar frequency in absence (CTL; black) and the presence of MitoTempo (10 μ M, blue) normalized to control condition. N=4 arterial preparations; n=74 and 55 pulsars sites. Student's T-test; * P <0.0001 **(B)** Number of active sites in absence (CTL; black) and the presence of MitoTempo (10 μ M, blue). n=4 arterial preparations. Student's T-test; P =0.37.

Figure 5. Impact of mROS production on endothelial Ca^{2+} pulsars in human primary endothelial cells. **(A)** Calcium pulsar frequency in resting condition in human primary microvascular endothelial cells in co-culture. N=3 co-culture preparations; n=43 and 52 pulsars sites. Student's T-test; P =0.72. **(B)** Calcium pulsar frequency in absence (CTL; black) and the presence of Antimycin A (1 μ M; yellow) in human primary microvascular endothelial cells in co-culture. N=4 co-culture preparations; n=60 and 69 pulsars sites. Student's T-test; # P <0.01; *insert* Calcium pulsar frequency of active and *de novo* sites in the presence of Antimycin A in human primary microvascular endothelial cells in co-culture. AA: Antimycin A. N=4 co-culture

preparations; n=54 and 15 pulsars sites. Student's T-test; # $P<0.01$. **(C)** Calcium pulsar frequency in absence (CTL; black) and the presence of MitoTempo (10 μ M; blue) in human primary microvascular endothelial cells in co-culture N=4 co-culture preparations; n=80 and 77 pulsars sites. Student's T-test; $P<0.05$. **(D)** Calcium pulsar frequency in absence (CTL; black) and the presence of Tempol, a cytosolic ROS scavenger (10 μ M; navy blue) in human primary microvascular endothelial cells in co-culture. N=4 co-culture preparation; n=54 and 61 pulsars sites. Student's T-test; $P=0.16$.

Fig. 1

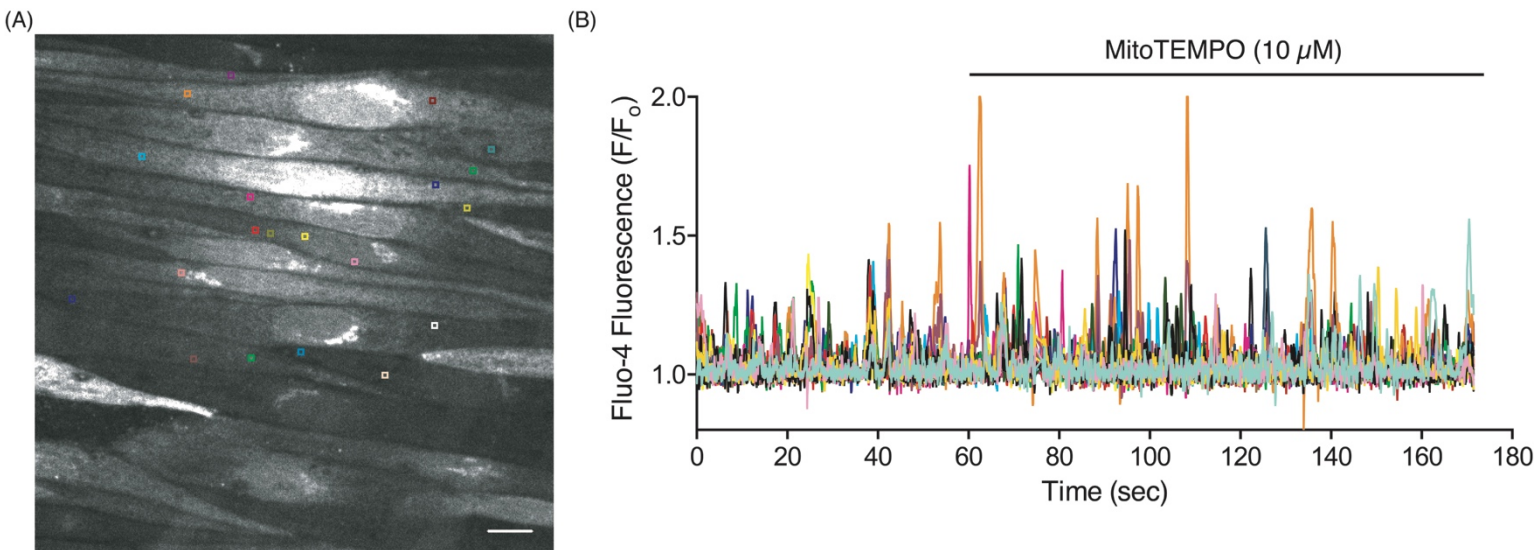


Fig. 2

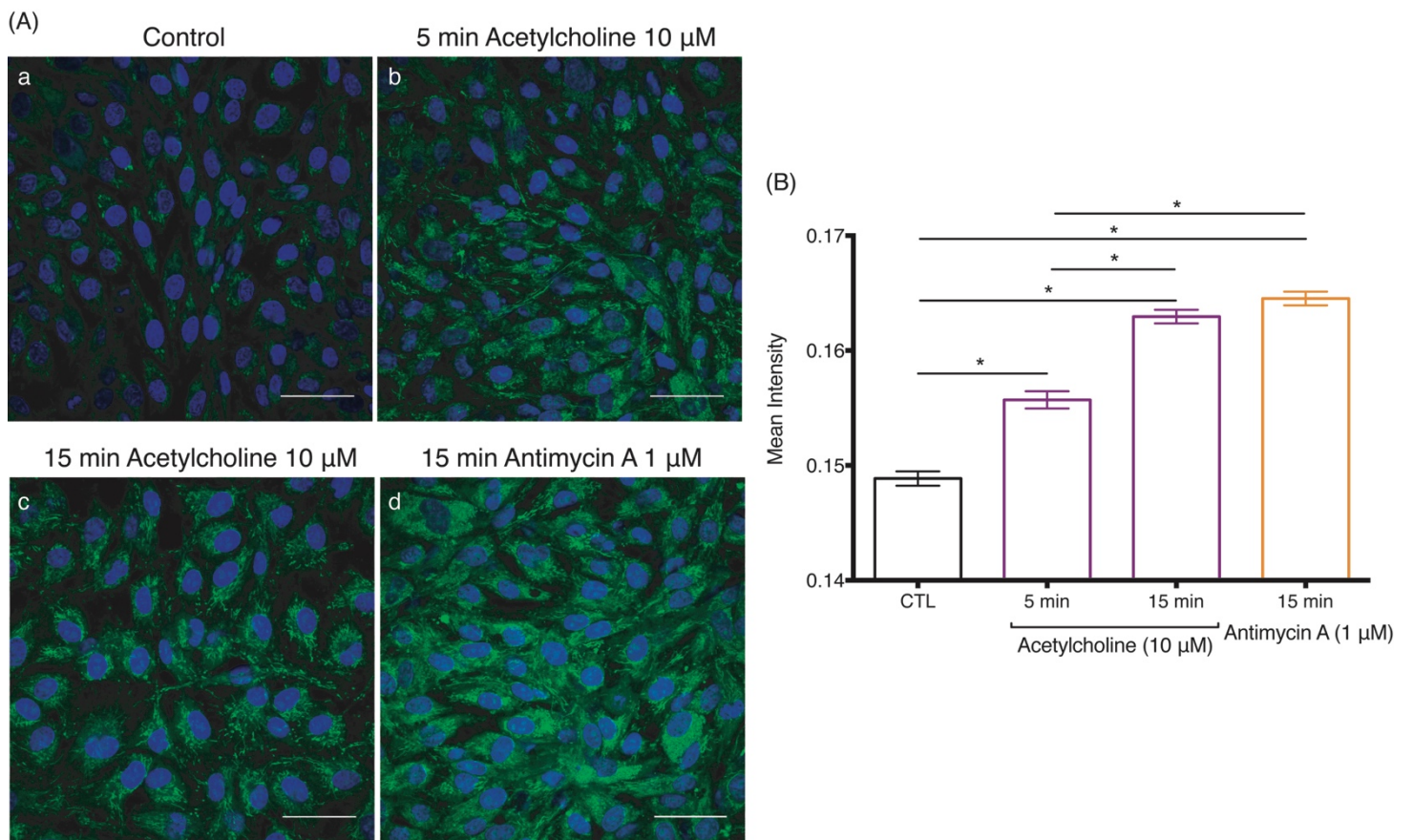
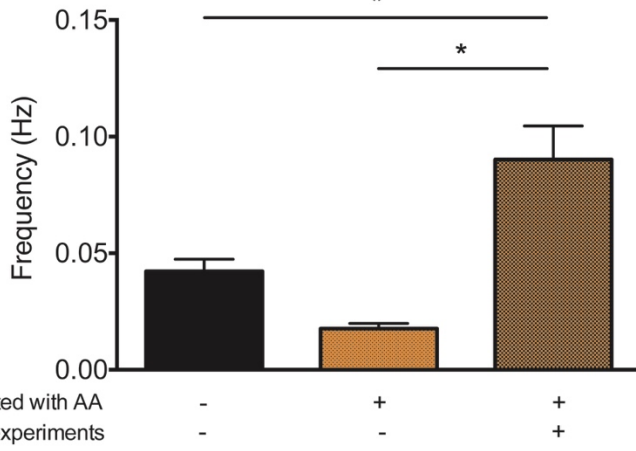


Fig. 3

(A)



(B)

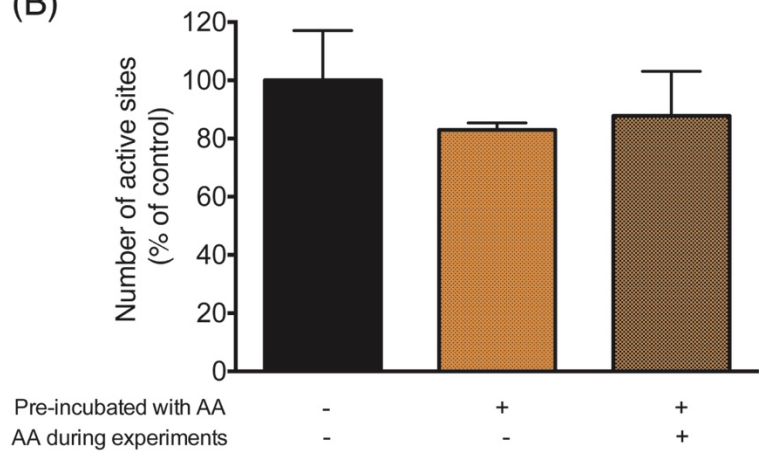
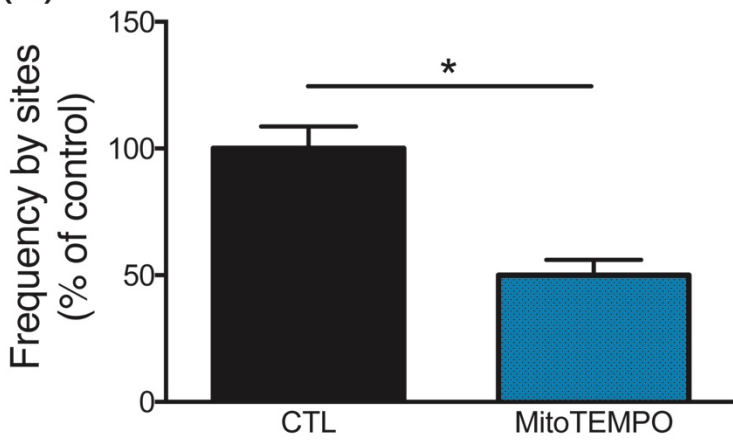


Fig. 4

(A)



(B)

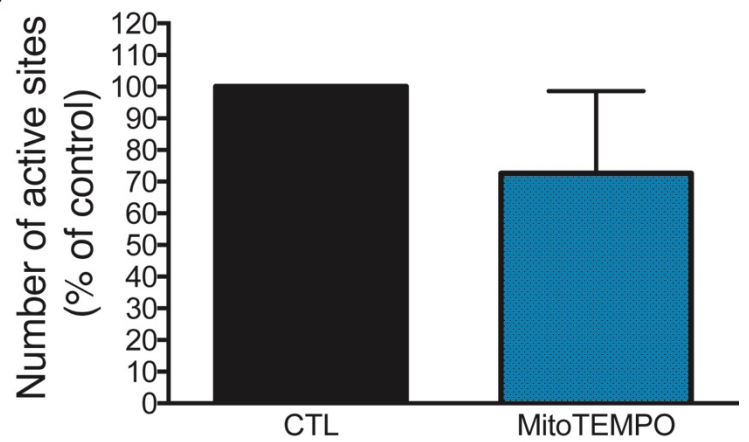
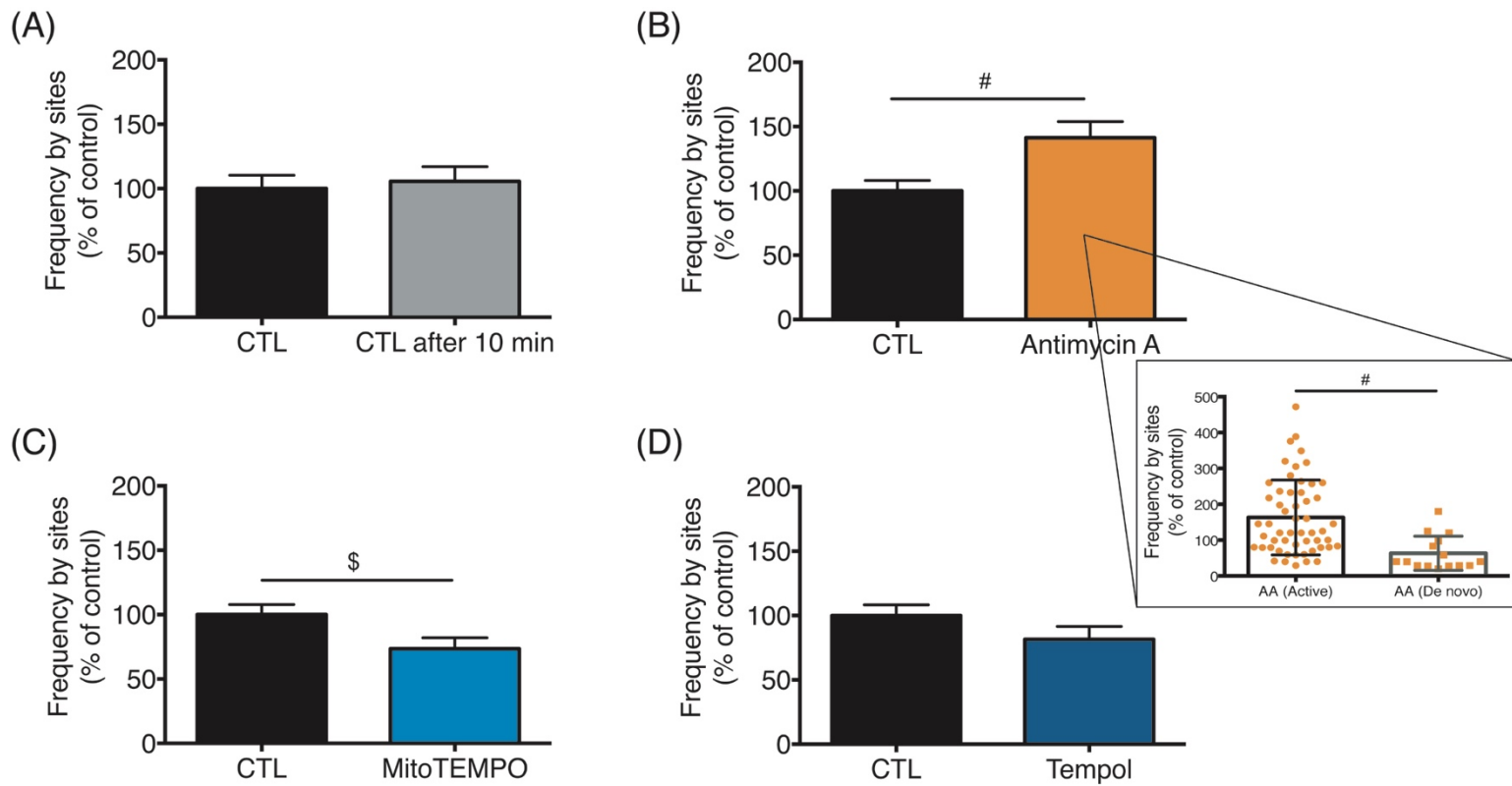


Fig. 5



Discussion

Les travaux effectués dans la cadre de cette maîtrise étaient basés sur les connaissances de la localisation de la mitochondrie proche de la PME et du rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie oxydative de la cellule.

Des recherches effectuées dans notre laboratoire montrent la localisation de grappe de mitochondries à l'embouchure de la projection myoendothéliale (résultats en cours de publication). La PME est l'endroit où se produisent les dynamiques calciques locales nommées pulsars (53). La mitochondrie est la 2^e plus grande source de ROS dans la cellule (86). Les dérivés réactifs de l'oxygène sont essentiels à l'homéostasie cellulaire et participent à plusieurs voies de signalisation cellulaire (12). Sachant ces informations, nous avons posé l'hypothèse que les ROS mitochondriaux sont un mécanisme de régulation des pulsars calciques. L'objectif de cette maîtrise était d'évaluer l'importance des ROS mitochondriaux dans la régulation des pulsars calciques.

4.1 ROS mitochondriaux et dynamiques calciques

Les expériences menées dans le cadre de ce mémoire montrent que l'augmentation de la production de mROS augmente la fréquence des pulsars. Elles montrent aussi que la chélation des mROS diminue la fréquence des pulsars et que l'application d'un chélateur de ROS cytosolique, n'affecte pas la fréquence des pulsars calcique, ce qui suggère que l'effet observé est médié par les ROS d'origine mitochondriale.

4.1.1 Augmentation de la production des mROS

L'antimycine A (AA) est un inhibiteur du complexe III de la chaîne de transport des électrons (87). En bloquant la chaîne de transport au complexe III, les électrons entrent dans la chaîne normalement, mais, lorsqu'ils arrivent au complexe III, ils ne peuvent pas être transférés au complexe suivant. Il y a alors fuite d'électrons. C'est cette fuite (ou perte)

d'électrons par la chaîne de transport qui entraîne la production de ROS par la mitochondrie (76, 88). Les molécules d'oxygène présentes dans la mitochondrie interagissent avec ces électrons libres et forment des anions superoxydes. L'antimycine A entraîne donc une production accrue d'anion superoxyde en inhibant le complexe III de la chaîne de transport mitochondriale.

L'augmentation de la production de mROS augmente significativement la fréquence des pulsars des cellules endothéliales des artères natives de souris, ainsi que la fréquence des pulsars des cellules endothéliales humaines en co-culture. Aussi, lorsque les artères natives sont remises dans une solution physiologique après une exposition de 10 min à l'AA (1 μ M), la fréquence des pulsars diminue légèrement comparativement au contrôle. Sans que cette diminution soit significative, elle pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de ROS produite par la mitochondrie est diminuée suite à l'augmentation de sa production durant 10 min et, qu'en fait, la diminution de la fréquence des pulsars soit associée une surproduction temporaire d'ATP. Plusieurs études ont montré que la stimulation de la production de ROS mitochondriaux par un bloqueur de la chaîne entraîne une diminution de la production d'ATP (64, 89). Le retrait de l'antimycine A pourrait avoir comme impact l'augmentation la production d'ATP et, par conséquent, la production de mROS serait momentanément diminuée. Une augmentation de la production d'ATP implique alors une plus faible fuite d'électrons par la chaîne de transport. L'augmentation momentanée de la production d'ATP pourrait être un « effet rebond » suite à sa diminution par le bloqueur de la chaîne des électrons lors du retrait de celui-ci.

Les IP₃Rs sont sensibles aux fluctuations d'ATP. Afin de savoir si les changements de fréquences des pulsars sont vraiment attribuables aux ROS mitochondriaux, il serait nécessaire de faire des expériences où les artères seraient préincubées avec un chélateur de mROS (comme le MitoTEMPO) et ensuite exposées à l'antimycine A. L'absence d'effet en présence de MitoTempo indiquerait alors que l'augmentation de la production de ROS mitochondriaux est responsable de l'effet observé sur la fréquence.

4.1.2 Chélation des mROS

Le MitoTempo est un chélateur de ROS spécifique à la mitochondrie. Il est composé de la molécule chélatrice (Tempo) qui lie l'anion superoxyde et bloque sa biodisponibilité, ainsi que le cation lipophile triphénylphosphine qui s'accumule à la membrane mitochondriale (61). La partie cationique du MitoTempo est attirée par la différence de potentiel de la membrane (l'intérieur de la mitochondrie étant très négatif). C'est ceci qui rend le MitoTempo spécifique à la mitochondrie. Nos expériences montrent que la chélation du superoxyde mitochondrial entraîne une diminution significative de 50% de la fréquence des pulsars dans les artères natives. Le MitoTempo, utilisé sur la co-culture, a le même effet de diminuer significativement la fréquence des pulsars. Une différence de l'effet du MitoTempo peut être expliquée par la différence entre les 2 modèles expérimentaux. En artères natives, les projections myoendothéliales demeurent intactes et constituent l'anatomie artérielle *in vivo*. En co-culture, les PME sont formées artificiellement. Elles peuvent différer des artères natives dans la densité de leurs projections, parce que les membranes commerciales ont des densités de perforations fixes qui ne sont pas forcément représentatives de la LEI physiologique. Ceci représente une limite de notre étude qui sera traitée plus en détail au chapitre 4.3. Les différences anatomiques entre les 2 modèles d'études peuvent expliquer la différence de l'effet du MitoTempo. Par contre, l'effet sur la fréquence est le même (diminution de la fréquence) confirmant l'importance des mROS dans la régulation des pulsars calciques.

4.1.3 Effets des mROS

Une des fonctions de l'endothélium est la modulation du tonus des CML dans les artères. Cette fonction est possible grâce aux dynamiques calciques endothéliales (6). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire endothéliale active des mécanismes de vasorelaxation, telle la synthèse d'oxyde nitrique (NO) par l'activation de la synthase de NO endothéliale (eNOS). Une augmentation de la fréquence des pulsars entraîne une augmentation de la vasodilatation des artères (5, 53).

Nos travaux ont été réalisés avec des artères de souris C57/BL6 saines, ne présentant aucune pathologie. Nos expériences ont montré que la production de ROS augmentée par l'antimycine A était comparable à la production engendrée par la stimulation de la cellule avec de l'acétylcholine (ACh). L'ACh était utilisée à des concentrations qui engendrent une relaxation artérielle *in vivo* (90). L'ACh stimule la cellule endothéliale et entraîne aussi une augmentation de calcium (22). Cette stimulation cellulaire engendre une production de ROS (91). L'ACh est ainsi un bon outil de comparaison pour l'antimycine A afin d'étudier son impact sur les pulsars. Nous avons pu montrer que l'augmentation des mROS, par l'antimycine A, augmente la relâche de Ca^{2+} local (pulsars) dans les cellules endothéliales. Puisque l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} entraîne la libération de facteurs vasodilatateurs, ceci implique que les mROS endothéliaux pourraient favoriser la relaxation des CML artériolaires.

En cas de rupture de la balance oxydative, le stress oxydatif peut causer une dysfonction endothéliale. La conséquence directe d'une dysfonction endothéliale est la diminution de vasodilatation médiée par l'endothélium et peut entraîner l'hypertension (14). Ceci est contraire aux travaux présentés dans le cadre de ce mémoire, mais simplement parce qu'il faut faire la distinction entre les ROS et le stress oxydatif. Le stress oxydatif se définit comme étant un état pathologique délétère où l'augmentation de la production de ROS cause une incapacité des artères de se dilater et mène à un développement de pathologies cardiovasculaires (71). Quant à eux, les ROS sont, par définition, des molécules qui proviennent de réactions utilisant l'oxygène. Les ROS ne causent pas systématiquement un stress oxydatif sur l'organisme (92). Au contraire, nos travaux montrent qu'à l'état physiologique, les ROS provenant de la mitochondrie participent à la régulation des dynamiques calciques en augmentant la fréquence des pulsars. Puisqu'il a été démontré que les pulsars entraînent une relaxation des CMLs, les résultats de ces travaux suggèrent que les mROS favorisent la dilatation artériolaire.

Tel que présenté dans la mise en contexte du mémoire, Rossman et coll. ont publié un article en 2018 montrant que la supplémentation orale d'un antioxydant mitochondriale (MitoQ) améliorait les fonctions endothéliales et diminuait la rigidité artérielle chez les patients en diminuant les effets du stress oxydant lié à l'âge (83). Malgré que les patients ne

souffraient d'aucune maladie cardiovasculaire, ils souffraient tous d'altérations des fonctions endothéliales liées à l'âge (découvert lors du dépistage préclinique) dû à un déséquilibre de leur balance oxydative. L'âge est associé à une augmentation du stress oxydatif (84, 85). Ainsi, la supplémentation de MitoQ a permis de diminuer les effets du stress oxydatif lié à l'âge et de restaurer la fonction physiologique endothéliale.

4.2 Mécanismes d'action potentiels

La mitochondrie produit des anions superoxydes par l'entremise de sa chaîne de transport des électrons. Le O_2^- est une molécule incapable de passer à travers les membranes cellulaires (74). La portée de son action est alors localisée à la mitochondrie. Par contre, le superoxyde est transformé en H_2O_2 qui lui peut traverser les membranes et interagir avec des cibles intracellulaires (70). L'effet des mROS peut être médié par le superoxyde lui-même ou par ses sous-produits comme le peroxyde d'hydrogène. Dans nos expériences, il est possible qu'en tamponnant l'anion superoxyde mitochondrial ce soit les effets de ses sous-produits (tel le H_2O_2) qui soient réellement bloqués.

Les pulsars sont causés par une relâche de Ca^{2+} par les récepteurs à l' IP_3 situés à la membrane du RE. Tel que déjà abordé, les IP_3 Rs sont sensibles à l' IP_3 , au Ca^{2+} , à l'ATP et plusieurs autres molécules (29). Une étude a montré que l' H_2O_2 augmentait la sensibilité des IP_3 Rs à l' IP_3 (93). D'après nos travaux, le mécanisme, par lequel les mROS modulent les pulsars, peut impliquer le peroxyde d'hydrogène et que cet H_2O_2 agit en modulant l'activité des IP_3 Rs. En effet, le superoxyde mitochondrial serait transformé par la SOD en peroxyde d'hydrogène. Le H_2O_2 diffuserait hors de la mitochondrie vers le cytosol où il pourrait augmenter la sensibilité du récepteur à l' IP_3 et indirectement augmenter la fréquence des pulsars.

Ce mécanisme peut aussi expliquer la raison pour laquelle une diminution de la fréquence était attendue lorsque l'application de Tempol. Le Tempol est un chélateur de l'anion superoxyde cytosolique. Il diminue la biodisponibilité de l'anion superoxyde intracellulaire (94). Le mécanisme d'action pourrait être le même pour les ROS cytosoliques,

puisque'il s'agit de la même molécule provenant de différents endroits. Simplement, leurs effets sont moins importants que les ROS mitochondriaux, possiblement à cause de la localisation des mitochondries à la PME. Étant une dynamique calcique très locale, les mécanismes de régulation des pulsars qui sont localisés près de la PME auront un effet optimal.

4.3 Limitations

Notre étude utilisait principalement des artères mésentériques murines de 3^e et 4^e ordre comme modèle expérimental. L'avantage d'utiliser des artères de souris *ex vivo* est que l'intégrité des projections myoendothéliales est conservée. Par contre, ce modèle a certaines limites. Afin d'imager l'endothélium en microscopie confocale, les artères sont coupées longitudinalement et épinglées sur un bloc de polymère afin de pouvoir exposer les cellules endothéliales (configuration *en face*). Cette technique implique que les artères ne sont plus pressurisées. Les cellules endothéliales sont sensibles aux forces de cisaillement (54, 95) et, de manière physiologique, elles sont aussi exposées à une pression intraluminale. Ces différences constituent une limite à notre modèle d'étude avec des artères ouvertes. Aussi, les artères sont dans un bain où il y a une circulation de liquide. Par contre, la circulation possède une limite technique, puisqu'il nous est impossible de contrôler les forces de cisaillement auxquelles les artères sont soumises par cette circulation. Nous ne pouvons affirmer que les artères sont soumises exactement au même débit de circulation qu'*in vivo*.

Pour notre 2^e modèle expérimental, la co-culture a l'avantage de diminuer l'utilisation d'animaux et d'assurer une plus grande reproductibilité. Par contre, dans ce modèle, les PME sont recrées grâce à des membranes artificielles remplaçant la LEI et leurs densités peuvent être différentes de celles présentes dans les artères natives. Commercialement, les membranes utilisées pour la co-culture ont des densités et des tailles de perforations fixes qui ne sont pas nécessairement représentatives de la lame élastique interne physiologique. L'interprétation des résultats en co-culture doit être faite en prenant compte de ces différences anatomiques. Par contre, un avantage de la co-culture est qu'elle est réalisée avec des cellules humaines provenant d'artères de résistance. Les dynamiques calciques dans les cellules humaines en co-

culture pourraient différer (dans leur fréquence basale, par exemple) des dynamiques calciques des artères murines *ex vivo* pour cette raison.

4.4 Perspectives

Bien que ce mémoire ait permis de mettre en lumière le lien entre les mROS et les pulsars calciques, l'ensemble des dynamiques calciques enregistrées durant l'étude étaient obtenues de manière basale (c'est-à-dire, sans stimulation des cellules endothéliales). Il serait intéressant de voir si le mécanisme de régulation de mROS est conservé sous stimulation (par exemple, avec de la phényléphrine ou de l'ACh). En effet, l'ACh stimule l'endothélium et entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (22). La stimulation a aussi pour conséquence d'augmenter la production de ROS par l'augmentation de l'activité cellulaire (91). La stimulation de l'activité de la cellule pourrait peut-être avoir un impact sur le mécanisme de régulation des pulsars par les mROS.

Aussi, l'utilisation de MitoTempo combiné à l'antimycine A permettrait de savoir si les variations de fréquence des pulsars sont vraiment attribuables aux mROS. L'absence d'effet de l'antimycine A en présence de MitoTempo indiquerait que l'augmentation de la production de mROS est responsable de l'effet observé sur la fréquence.

De plus, en ce qui a trait au mécanisme d'action, l'ajout de catalase avant l'antimycine A permettrait d'élucider si les effets des mROS sont médiés par l'anion superoxyde lui-même ou par l'action du peroxyde d'hydrogène. La catalase diminuerait l'impact du H_2O_2 , ainsi, si les effets de l'antimycine A sont conservés avec l'ajout de catalase, cela suggérerait que les effets sont médiés par l'anion superoxyde. Au contraire, si la catalase bloque les effets de l'antimycine A, cela suggérerait que les effets sont médiés par l' H_2O_2 qui peut traverser les membranes et aller avoir un effet ailleurs dans la cellule.

Conclusions et perspectives

Dans l'ensemble, les travaux présentés dans ce mémoire ont permis de mettre en lumière une fonction des ROS provenant de la mitochondrie; ils contribuent à la régulation des pulsars calciques de l'endothélium vasculaire. D'une part, l'augmentation de la production de mROS augmente la fréquence des dynamiques calciques de l'endothélium. D'autre part, la chélation des mROS entraîne une diminution significative de la fréquence des dynamiques calciques. La sensibilité des récepteurs à l'IP₃ aux dérivés réactifs de l'oxygène suggère que l'effet des mROS passe par la modulation de l'activité des IP₃Rs. La connaissance des mécanismes régulateurs des pulsars permet de mieux comprendre la façon dont les cellules endothéliales modulent la contractilité du muscle lisse vasculaire.

Bibliographie

1. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of medical physiology. 13th ed. Guyton AC, editor. Philadelphia: Elsevier; 2016. 1168 p.
2. Young D. Control of Cardiac Output. San Rafael (CA): Biota Publishing; 2010. 97 p.
3. Marieb E, Hoehn K. Anatomie et physiologie humaines. 5e ed. Londres: Pearson Education; 2015. 1504 p.
4. Martinez-Lemus LA. The dynamic structure of arterioles. Basic & clinical pharmacology & toxicology. 2012;110(1):5-11.
5. Straub AC, Zeigler AC, Isakson BE. The myoendothelial junction: connections that deliver the message. Physiology (Bethesda, Md). 2014;29(4):242-9.
6. Kerr PM, Tam R, Ondrusova K, Mittal R, Narang D, Tran CH, et al. Endothelial feedback and the myoendothelial projection. Microcirculation (New York, NY : 1994). 2012;19(5):416-22.
7. Thurston GB. The viscosity and viscoelasticity of blood in small diameter tubes. Microvascular research. 1976;11(2):133-46.
8. OpenStaxCollege. Viscosity and Laminar Flow; Poiseuille's Law. In: Fluid Dynamics and Its Biological and Medical Applications [Internet]. Houston, TX.: OpenStax CNX. Available from: <https://opentextbc.ca/physicstestbook2/chapter/viscosity-and-laminar-flow-poiseuilles-law/>.
9. Tran CH, Taylor MS, Plane F, Nagaraja S, Tsoukias NM, Solodushko V, et al. Endothelial Ca²⁺ wavelets and the induction of myoendothelial feedback. American journal of physiology Cell physiology. 2012;302(8):C1226-42.
10. Lee RM. Morphology of cerebral arteries. Pharmacology & therapeutics. 1995;66(1):149-73.
11. Baumbach GL, Walmsley JG, Hart MN. Composition and mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. The American journal of pathology. 1988;133(3):464-71.
12. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2017;37(9):e108-e14.

13. McCarron JG, Lee MD, Wilson C. The Endothelium Solves Problems That Endothelial Cells Do Not Know Exist. *Trends in pharmacological sciences*. 2017;38(4):322-38.
14. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2017;219(1):22-96.
15. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;956:511-40.
16. Feletou M. *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences Copyright (c) 2011 by Morgan & Claypool Life Sciences Publishers.; 2011.
17. Lijnen HR, Collen D. Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Progress in cardiovascular diseases*. 1997;39(4):343-50.
18. Kirby BS, Bruhl A, Sullivan MN, Francis M, Dinunno FA, Earley S. Robust internal elastic lamina fenestration in skeletal muscle arteries. *PloS one*. 2013;8(1):e54849.
19. OpenStaxCollege. Chapter 10. Muscle Tissue. 2013. In: *Anatomy & physiology* [Internet]. Houston, TX.: OpenStax CNX. Available from: <http://cnx.org/content/col11496/latest/>.
20. Brasen JC, Jacobsen JC, Holstein-Rathlou NH. The nanostructure of myoendothelial junctions contributes to signal rectification between endothelial and vascular smooth muscle cells. *PloS one*. 2012;7(4):e33632.
21. Zhang Z, Chen Y, Zhang T, Guo L, Yang W, Zhang J, et al. Role of Myoendothelial Gap Junctions in the Regulation of Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell Differentiation by Laminar Shear Stress. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2016;39(2):423-37.
22. Busse R, Fichtner H, Luckhoff A, Kohlhardt M. Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1988;255(4 Pt 2):H965-9.
23. Sonkusare SK, Bonev AD, Ledoux J, Liedtke W, Kotlikoff MI, Heppner TJ, et al. Elementary Ca²⁺ signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. *Science (New York, NY)*. 2012;336(6081):597-601.

24. Muallem S, Wilkie TM. G protein-dependent Ca²⁺ signaling complexes in polarized cells. *Cell calcium*. 1999;26(5):173-80.
25. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2006;21:69-78.
26. Alevriadou BR, Shanmughapriya S, Patel A, Stathopoulos PB, Madesh M. Mitochondrial Ca(2+) transport in the endothelium: regulation by ions, redox signalling and mechanical forces. *Journal of the Royal Society, Interface*. 2017;14(137).
27. Narayanan D, Adebisi A, Jaggar JH. Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(11):H2190-210.
28. Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Rimessi A, Wieckowski MR, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell calcium*. 2018;69:62-72.
29. Zhang S, Fritz N, Ibarra C, Uhlen P. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype-specific regulation of calcium oscillations. *Neurochemical research*. 2011;36(7):1175-85.
30. Yu R, Hinkle PM. Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies with cameleon calcium indicators. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(31):23648-53.
31. Bertero E, Maack C. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circulation research*. 2018;122(10):1460-78.
32. Drumm BT, Sung TS, Zheng H, Baker SA, Koh SD, Sanders KM. The effects of mitochondrial inhibitors on Ca(2+) signalling and electrical conductances required for pacemaking in interstitial cells of Cajal in the mouse small intestine. *Cell calcium*. 2018;72:1-17.
33. Liao Y, Dong Y, Cheng J. The Function of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Neurodegenerative Disorders. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(2).
34. Bondarenko A. Sodium-calcium exchanger contributes to membrane hyperpolarization of intact endothelial cells from rat aorta during acetylcholine stimulation. *British journal of pharmacology*. 2004;143(1):9-18.

35. Palty R, Ohana E, Hershinkel M, Volokita M, Elgazar V, Beharier O, et al. Lithium-calcium exchange is mediated by a distinct potassium-independent sodium-calcium exchanger. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(24):25234-40.
36. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;78:129-41.
37. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;78:100-6.
38. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;46(6):821-31.
39. Wood-Kaczmar A, Deas E, Wood NW, Abramov AY. The role of the mitochondrial NCX in the mechanism of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;961:241-9.
40. Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, et al. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Molecular cell*. 2009;33(5):627-38.
41. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476(7360):341-5.
42. Oxenoid K, Dong Y, Cao C, Cui T, Sancak Y, Markhard AL, et al. Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2016;533(7602):269-73.
43. Bronner F. Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *TheScientificWorldJournal*. 2001;1:919-25.
44. Inoue R, Jensen LJ, Shi J, Morita H, Nishida M, Honda A, et al. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circulation research*. 2006;99(2):119-31.
45. Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacological reviews*. 2014;66(3):676-814.

46. Bruce JIE. Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell calcium*. 2018;69:28-36.
47. Altimimi HF, Szerencsei RT, Schnetkamp PP. Functional and structural properties of the NCKX2 Na(+)-Ca (2+)/K (+) exchanger: a comparison with the NCX1 Na (+)/Ca (2+) exchanger. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;961:81-94.
48. Sullivan MN, Earley S. TRP channel Ca(2+) sparklets: fundamental signals underlying endothelium-dependent hyperpolarization. *American journal of physiology Cell physiology*. 2013;305(10):C999-c1008.
49. Nausch LW, Bonev AD, Heppner TJ, Tallini Y, Kotlikoff MI, Nelson MT. Sympathetic nerve stimulation induces local endothelial Ca²⁺ signals to oppose vasoconstriction of mouse mesenteric arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(3):H594-602.
50. Francis M, Waldrup JR, Qian X, Solodushko V, Meriwether J, Taylor MS. Functional Tuning of Intrinsic Endothelial Ca²⁺ Dynamics in Swine Coronary Arteries. *Circulation research*. 2016;118(7):1078-90.
51. Huser J, Blatter LA. Elementary events of agonist-induced Ca²⁺ release in vascular endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1997;273(5):C1775-82.
52. Sun MY, Geyer M, Komarova YA. IP₃ receptor signaling and endothelial barrier function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2017;74(22):4189-207.
53. Ledoux J, Taylor MS, Bonev AD, Hannah RM, Solodushko V, Shui B, et al. Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(28):9627-32.
54. Shen J, Lusinskas FW, Connolly A, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1992;262(2 Pt 1):C384-90.
55. Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium*. 2010;47(2):122-9.
56. Toussaint F, Charbel C, Blanchette A, Ledoux J. CaMKII regulates intracellular Ca(2)(+) dynamics in native endothelial cells. *Cell calcium*. 2015;58(3):275-85.

57. Martin W, Muller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*. 1998;392(6671):37-41.
58. Kramer P, Bressan P. Our (Mother's) Mitochondria and Our Mind. *Perspectives on psychological science : a journal of the Association for Psychological Science*. 2018;13(1):88-100.
59. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences*. 2000;25(7):319-24.
60. Gerencser AA, Brand MD. Exploiting Mitochondria In Vivo as Chemical Reaction Chambers Dependent on Membrane Potential. *Molecular cell*. 2016;61(5):642-3.
61. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang XF. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6:19.
62. Letts JA, Sazanov LA. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature structural & molecular biology*. 2017;24(10):800-8.
63. Granatiero V, De Stefani D, Rizzuto R. Mitochondrial Calcium Handling in Physiology and Disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;982:25-47.
64. Fink BD, Bai F, Yu L, Sivitz WI. Regulation of ATP production: dependence on calcium concentration and respiratory state. *American journal of physiology Cell physiology*. 2017;313(2):C146-c53.
65. Dryden M. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. *International journal of antimicrobial agents*. 2018;51(3):299-303.
66. Taverne YJ, Bogers AJ, Duncker DJ, Merkus D. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013:862423.
67. Zou AP, Li N, Cowley AW, Jr. Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2001;37(2 Pt 2):547-53.
68. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*. 2012;142:w13659.
69. Lee B, Lee DG. Depletion of reactive oxygen species induced by chlorogenic acid triggers apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *Free radical research*. 2018;52(5):605-15.

70. Landry WD, Cotter TG. ROS signalling, NADPH oxidases and cancer. *Biochemical Society transactions*. 2014;42(4):934-8.
71. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*. 2014;24(10):R453-62.
72. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(17):2794-814.
73. Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2014;25(9):452-63.
74. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology*. 2010;45(7-8):466-72.
75. Holzerova E, Prokisch H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2015;63:16-20.
76. Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(8):1282-94.
77. Monsalve M, Borniquel S, Valle I, Lamas S. Mitochondrial dysfunction in human pathologies. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:1131-53.
78. Accardi MV, Daniels BA, Brown PM, Fritschy JM, Tyagarajan SK, Bowie D. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the strength of inhibitory GABA-mediated synaptic transmission. *Nature communications*. 2014;5:3168.
79. O'Malley Y, Fink BD, Ross NC, Prisinzano TE, Sivitz WI. Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(52):39766-75.
80. Bielli A, Scioli MG, Mazzaglia D, Doldo E, Orlandi A. Antioxidants and vascular health. *Life sciences*. 2015;143:209-16.
81. Muscoli C, Cuzzocrea S, Riley DP, Zweier JL, Thiemermann C, Wang ZQ, et al. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *British journal of pharmacology*. 2003;140(3):445-60.

82. Thimraj TA, George L, Asrafuzzaman S, Upadhyay S, Ganguly K. Chapter 7 - Oxidative Signaling in Chronic Obstructive Airway Diseases. *Immunity and Inflammation in Health and Disease. Emerging Roles of Nutraceuticals and Functional Foods in Immune Support*. Elsevier ed2018. p. Pages 79-98.
83. Rossman MJ, Santos-Parker JR, Steward CAC, Bispham NZ, Cuevas LM, Rosenberg HL, et al. Chronic Supplementation With a Mitochondrial Antioxidant (MitoQ) Improves Vascular Function in Healthy Older Adults. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2018;71(6):1056-63.
84. Baumann CW, Kwak D, Liu HM, Thompson LV. Age-induced oxidative stress: how does it influence skeletal muscle quantity and quality? *J Appl Physiol (1985)*. 2016;121(5):1047-52.
85. Cui X, Xiao W, You L, Zhang F, Cao X, Feng J, et al. Age-induced oxidative stress impairs adipogenesis and thermogenesis in brown fat. *The FEBS journal*. 2019;286(14):2753-68.
86. Morimoto H, Iwata K, Ogonuki N, Inoue K, Atsuo O, Kanatsu-Shinohara M, et al. ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell stem cell*. 2013;12(6):774-86.
87. Braet F, Muller M, Vekemans K, Wisse E, Le Couteur DG. Antimycin A-induced defenestration in rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2003;38(2):394-402.
88. Lindsay DP, Camara AK, Stowe DF, Lubbe R, Aldakkak M. Differential effects of buffer pH on Ca(2+)-induced ROS emission with inhibited mitochondrial complexes I and III. *Frontiers in physiology*. 2015;6:58.
89. Milakovic T, Johnson GV. Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(35):30773-82.
90. Rand VE, Garland CJ. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the rabbit basilar artery: importance of membrane hyperpolarization. *British journal of pharmacology*. 1992;106(1):143-50.
91. Krieg T, Philipp S, Cui L, Dostmann WR, Downey JM, Cohen MV. Peptide blockers of PKG inhibit ROS generation by acetylcholine and bradykinin in cardiomyocytes but fail to block protection in the whole heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;288(4):H1976-81.

92. Mittler R. ROS Are Good. Trends in plant science. 2017;22(1):11-9.
93. Hu Q, Zheng G, Zweier JL, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC. NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. The Journal of biological chemistry. 2000;275(21):15749-57.
94. Bernardy CCF, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Calixto-Campos C, Carvalho TT, Fattori V, et al. Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain in Mice. BioMed research international. 2017;2017:9584819.
95. Scheitlin CG, Julian JA, Shanmughapriya S, Madesh M, Tsoukias NM, Alevriadou BR. Endothelial mitochondria regulate the intracellular Ca²⁺ response to fluid shear stress. American journal of physiology Cell physiology. 2016;310(6):C479-90.