

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DE MEDECINE PARIS DESCARTES

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

en Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole Doctorale GC2ID

Spécialité: Physiopathologie

présentée et soutenue par

Yihua BEI

Le 11 juin 2013

**Implications de la voie RhoA/Rho-kinases dans la
physiopathologie des atteintes vasculaires et interstitielles
pulmonaires des maladies respiratoires chroniques :
études humaines et expérimentales chez la souris**

Jury

Président : Mr le Pr Frédéric BATTEUX

Directeur de thèse : Mr le Pr Anh Tuan DINH-XUAN

Rapporteur : Mr le Dr Jorge BOCZKOWSKI

Rapporteur : Mr le Dr Christophe GUIGNABERT

Examineur : Mr le Pr Zhongmin LIU

Examineur : Mr le Dr Kiet Phong TIEV

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Anh Tuan Dinh-Xuan,

Qui m'a fait l'honneur de diriger mon travail au laboratoire au cours de ces 5 années. Qui m'a soutenue tout au long de mes études en France. Ses connaissances et son accessibilité sont exemplaires. Qu'il reçoive ici ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Frédéric Batteux,

Qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'il soit assuré de l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur Jorge Boczkowski,

Qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Christophe Guignabert,

Qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Qu'il soit assuré de l'expression de ma grande considération.

A Monsieur le Professeur Zhongmin Liu,

Qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail. Qu'il reçoive ici ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur Kiet Phong Tiev,

Qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Sy Duong-Quy, qui m'a guidée dans mes premières expériences au laboratoire. Ses connaissances sur la voie RhoA/Rho-kinase m'ont ouvert des perspectives qui ont donné la naissance de ce travail. Je lui suis infiniment reconnaissante.

A Monsieur le Docteur Thong Hua-Huy, qui m'a aidée tout au long de mon travail au laboratoire. Pour ses précieux conseils, sa rigueur scientifique, sa grande disponibilité et ses encouragements, qui ont permis à ce travail d'aboutir. Je lui suis infiniment reconnaissante.

A Madame Christiane Chéreau, pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses précieux conseils pour la culture cellulaire, qui m'a fait grand plaisir d'apprendre de nouvelles techniques au laboratoire. Je lui suis infiniment reconnaissante.

A Madame le Docteur Carole Nicco, pour sa gentillesse, son accessibilité et ses précieux conseils pour l'expérimentation animale, qui m'a appris à maîtriser les différentes expériences sur les souris. Je lui suis infiniment reconnaissante.

Aux membres du laboratoire : Pr Isabelle Fajac, Dr Clémence Martin, Dr Justine Frija-Masson, Dr Weihua Chen, Muriel Dambo, Guiti Thevenot, Mélanie Bigeat, Thi Viet-Ha Nguyen, Sébastien Rivière et Duong Tung-Anh Dinh, qui m'ont accompagné durant 5 ans, partageant des bureaux plus ou moins bien rangés, des discussions "scientifiques" ou "intéressantes" dans une ambiance agréable ; et particulièrement à Justine et Mélanie, pour leurs conseils linguistiques et orthographiques pendant l'écriture de ma thèse.

A Monsieur le Docteur Kaili Mao, qui m'a aidée à venir en France pour commencer mes études en recherche scientifique. Pour ses précieux conseils pour mon travail et ma vie à Paris depuis mon arrivée en France.

A ma chère amie Fei Teng, avec qui j'ai fait 7 ans d'études en médecine en Chine et ensuite 5 ans d'études en recherche scientifique en France. Pour tous les moments de joie, de doute, de réussite et de difficulté que nous avons passés ensemble.

A Huguette Maudieu et Jean-Michel, pour leur gentillesse, leur attention, leur amitié et leur précieux soutien, qui m'ont fait ressentir une relation de famille pendant ma vie en France.

A mes parents, qui m'ont fait grandir dans leur amour. Pour tous leurs sacrifices, leur confiance et leur soutien durant toutes ces années.

A mon futur mari Chenlin Zhang, pour son amour, sa fidélité et son infinie patience en dépit des distances géographiques qui nous séparent.

Avec toute ma reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	8
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	11
A. INTRODUCTION.....	13
I. La famille des Rho GTPases.....	14
I.1 Généralités.....	14
I.2 Régulation des Rho GTPases.....	14
I.2.1 Rôles des nucléotides GDP/GTP.....	14
I.2.2 Modification post-traductionnelle (isoprénylation).....	15
I.2.3 Inhibiteurs de la dissociation des nucléotides guanidiniques (GDI).....	15
II. La voie RhoA/Rho-kinase (ROCK).....	17
II.1 La RhoA GTPase.....	17
II.2 Les Rho-kinases (ROCK).....	17
II.2.1 Isoformes et structures des ROCK.....	17
II.2.2 Régulation de l'activité des ROCK.....	18
II.2.3 Substrats des ROCK.....	20
III. Rôle des ROCK dans les fonctions cellulaires.....	22
III.1 ROCK et cellules musculaires lisses (CML) vasculaires.....	22
III.1.1 ROCK et contraction des CML.....	22
III.1.2 ROCK et différenciation des CML.....	24
III.1.3 ROCK et migration des CML.....	26
III.1.4 ROCK et prolifération des CML.....	26
III.2 ROCK et cellules endothéliales (CE).....	27
III.2.1 ROCK et perméabilité endothéliale vasculaire.....	27
III.2.2 ROCK et migration des CE.....	28
III.2.3 ROCK et expressions géniques des CE.....	28
III.3 ROCK et cellules inflammatoires.....	29
III.4 ROCK et fibroblastes et myofibroblastes.....	30
III.4.1 ROCK et prolifération des (myo)fibroblastes.....	30
III.4.2 ROCK et migration des (myo)fibroblastes.....	31
III.4.3 ROCK et différenciation des fibroblastes.....	31
III.4.4 ROCK et contraction des myofibroblastes.....	32
IV. La voie RhoA/ROCK et l'hypertension pulmonaire (HTP).....	33
IV.1 Définition et classification clinique des HTP.....	33
IV.2 Physiopathologie de l'HTP.....	36

IV.2.1	La vasoconstriction pulmonaire hypoxique.....	36
IV.2.2	Le remodelage vasculaire pulmonaire.....	37
IV.2.3	Les plaquettes et la thrombose.....	38
IV.3	Rôle de la voie RhoA/ROCK dans l'HTP.....	38
IV.3.1	La voie RhoA/ROCK dans la vasoconstriction pulmonaire.....	39
IV.3.2	La voie RhoA/ROCK et les modèles animaux d'HTP.....	40
IV.3.3	La voie RhoA/ROCK et les malades porteurs d'HTP.....	46
IV.3.4	Mécanismes responsables de l'amélioration de l'HTP par les inhibiteurs des ROCK.....	48
V.	Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) avec ou sans HTP.....	51
V.1	Définition et épidémiologie de la BPCO.....	51
V.2	HTP associée à la BPCO.....	51
V.2.1	Définition et épidémiologie de l'HTP associée à la BPCO.....	51
V.2.2	Physiopathologie de l'HTP associée à la BPCO.....	52
V.2.2.1	Vasoconstriction pulmonaire hypoxique.....	53
V.2.2.2	Remodelage vasculaire pulmonaire.....	55
V.2.2.3	Dysfonctionnement endothélial.....	55
V.3	Monoxyde d'azote (NO) et BPCO.....	56
V.3.1	Biosynthèse et métabolisme du NO.....	56
V.3.2	Rôle du NO dans la relaxation des CML et la prolifération cellulaire.....	58
V.3.3	Rôle du NO dans le dysfonctionnement endothélial de la BPCO.....	59
V.4	Endothéline-1 (ET-1) et BPCO.....	61
V.4.1	Biosynthèse de l'ET-1.....	61
V.4.2	Récepteurs de l'ET-1.....	62
V.4.3	Rôle de l'ET-1 dans la contraction des CML et la prolifération cellulaire.....	64
V.4.4	Rôle de l'ET-1 dans le dysfonctionnement endothélial de la BPCO.....	65
V.5	Rôle de la voie RhoA/ROCK dans le dysfonctionnement endothélial de la BPCO.....	66
VI.	Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la fibrose pulmonaire (FP) avec ou sans HTP.....	69
VI.1	Définition et épidémiologie de l'HTP associée à la pneumopathie infiltrante diffuse (HTP-PID).....	69
VI.1.1	HTP associée à la FP idiopathique (HTP-FPI).....	69
VI.1.2	HTP associée à la sclérodémie systémique (HTP-ScS).....	70
VI.2	Physiopathologie de l'HTP-PID.....	71
VI.2.1	Physiopathologie et spécificité de l'HTP-FPI.....	72
VI.2.2	Physiopathologie et spécificité de l'HTP-ScS.....	75

VI.3	Modèles animaux de FP avec ou sans HTP.....	77
VI.3.1	Modèle animal de FPI induite par la bléomycine.....	77
VI.3.1.1	Introduction du modèle.....	77
VI.3.1.2	Mécanismes physiopathologiques de l'agression pulmonaire par la bléomycine.....	78
VI.3.2	Modèle animal de ScS induite par l'acide hypochloreux (HOCl).....	84
VI.3.2.1	Rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la ScS.....	84
VI.3.2.2	Caractéristiques biochimiques d'HOCl.....	85
VI.3.2.3	Phénotypes de la ScS diffuse induite par l'HOCl chez les souris.....	87
VI.3.2.4	Mécanismes physiopathologiques et toxiques d'HOCl.....	88
VI.3.3	Comparaison entre les deux modèles animaux (bléomycine vs. HOCl).....	90
VI.4	Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la FP avec ou sans HTP.....	91
B.	OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	93
C.	TRAVAUX DE RECHERCHE.....	95
I.	Première étude :	
	Activation de la voie RhoA/ROCK et dysfonctionnement endothélial des artères pulmonaires chez les patients atteints de BPCO.....	96
II.	Deuxième étude :	
	Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la FP et l'HTP dans un modèle murin de PID induite par instillation intratrachéale de bléomycine.....	128
III.	Troisième étude :	
	Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la fibrose cutanée et l'atteinte pulmonaire (FP et/ou HTP) dans un modèle murin de ScS induite par injection intradermique d'HOCl.....	160
D.	DISCUSSION.....	189
I.	Première étude.....	190
II.	Deuxième étude.....	195
III.	Troisième étude.....	205
E.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	212
F.	BIBLIOGRAPHIE.....	215

ABREVIATIONS

5-HT	histamine
5-HTT	transporteur de 5-HT
Ang II	angiotensine II
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor 2
BPCO	bronchopneumopathie obstructive chronique
CCL2	chemokine ligand 2
CDK	cyclin-dependent kinase
CE	cellule endothéliale
CML	cellule musculaire lisse
CPT	capacité pulmonaire totale
CRD	cysteine-rich domain
CTGF	connective tissue growth factor
CVF	capacité vitale forcée
DAG	diacylglycérol
DL _{CO}	capacité de diffusion du monoxyde de carbone
ECE-1	endothelin converting enzyme-1
EFC	extrait de fumée de cigarette
EGF	epidermal growth factor
EMT	epithelial to mesenchymal transition
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
ERO	espèces réactifs de l'oxygène
ET-1	endothelin-1
FGF	fibroblast growth factor
FMD	flow-mediated dilation
FP	fibrose pulmonaire
FPI	fibrose pulmonaire idiopathique
FPI	fibrose pulmonaire idiopathique
GAP	GTPase activating protein

GCs	guanylate cyclase soluble
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HOCl	acide hypochloreux
HTAP	hypertension artérielle pulmonaire
HTP	hypertension pulmonaire
HTP-FPI	hypertension pulmonaire associée à la fibrose pulmonaire idiopathique
HTP-PID	hypertension pulmonaire associée à la pneumopathie infiltrante diffuse
HTP-ScS	hypertension pulmonaire associée à la sclérodémie systémique
IC	index cardiaque
IP3	inositol triphosphate
LAP	latency-associated peptide
LBA	lavage broncho-alvéolaire
LIMK	LIM kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocytes chemotactic protein-1
MCT	monocrotaline
MEC	matrice extracellulaire
MLC	myosin light chain
MLCK	myosin light chain kinase
MLC-P	MLC phosphorylée
MLCP	myosin light chain phosphatase
MMP	métalloprotéinases de matrice
MPO	myélo-peroxydase
NO	monoxyde d'azote
NOS	nitric oxide synthase
PaO ₂	pression partielle de l'oxygène artériel
PAPm	pression artérielle pulmonaire moyenne

PDE-5	phosphodiesterase de type 5
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule
PEDF	pigment epithelium-derived factor
PH	pleckstrin-homology domain
PI3-kinase/Akt	phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt
PID	pneumopathie infiltrante diffuse
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PTEN	phosphatase and tensin homologue
RBD	Rho-binding domain
RVP	résistance vasculaire pulmonaire
ScS	sclérodémie systémique
SMA	smooth muscle actin
sVCAM-1	soluble vascular cellular adhesion molecule 1
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TXA ₂	thromboxane-A ₂
T β R	récepteur du TGF- β
V _A /Q	rapport ventilation / perfusion
VD	ventricule droit
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEMS	volume expiré maximal à la première seconde

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure. 1	Régulation des Rho GTPases.....	16
Figure. 2	Structure moléculaire des ROCK (Duong-Quy et al., 2012a).....	18
Figure. 3	Régulation de l'activité des ROCK (Duong-Quy et al., 2012a).....	19
Figure. 4	Rôles des ROCK dans les CML vasculaires (Loirand et al., 2006).....	22
Figure. 5	La voie RhoA/ROCK dans la contraction des CML (Loirand et al., 2006).....	24
Figure. 6	La voie RhoA/ROCK dans la différenciation des CML (Schaafsma et al., 2008).....	25
Figure. 7	Physiopathologie de l'HTP (Mandegar et al., 2004).....	36
Figure. 8	Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de l'HTP (Oka et al., 2008).....	39
Figure. 9	Mécanismes physiopathologiques de l'augmentation de la RVP dans l'HTP associée à la BPCO (Shujaat et al., 2012).....	53
Figure. 10	Biosynthèse et métabolisme principal du NO.....	57
Figure. 11	Mécanisme d'action du NO dans la relaxation des CML vasculaires (Griffiths and Evans, 2005).....	59
Figure. 12	Biosynthèse de l'ET-1 (Levin, 1995).....	62
Figure. 13	Récepteurs de l'ET-1 et leurs effets dans la vasoconstriction (Duong-Quy et al., 2012b).....	63
Figure. 14	Rôle de l'ET-1 dans la contraction et la prolifération des CML.....	64
Figure. 15	Physiopathologie de l'HTP associée à la FPI (Farkas et al., 2011).....	74
Figure. 16.	Physiopathologie de l'HTP associée à la ScS, incluant les atteintes vasculaires, les auto-anticorps circulants et les gènes candidats dans la ScS (Le Pavec et al., 2010).....	77
Figure. 17	Voies de signalisation intracellualires du TGF- β dépendantes et indépendantes des molécules Smad (Biernacka et al., 2011).....	81
Figure. 18	Principaux effets du TGF- β sur le phénotype et la fonction des fibroblastes (Biernacka et al., 2011).....	83

Figure. 19	Formation des ERO : HOCl, NO ₂ ⁻ et NO ₂ Cl.....	86
Figure. 20	Phénotypes et mécanismes physiopathologiques de la ScS diffuse induite par l'HOCl chez les souris (Batteux et al., 2011).....	88
Figure. 21	Effet anti-fibrosant du fasudil dans la physiopathologie de la FP induite par la bléomycine: interaction entre la voie RhoA/ROCK et la voie TGF-β1/Smad.....	200
Figure. 22	Physiopathologie de l'HTP associée à la FP induite par l'instillation intratrachéale de bléomycine chez la souris.....	204
Tableau 1	Substrats des ROCK (Loirand et al., 2006).....	21
Tableau 2	Classification des hypertensions pulmonaires (Dana Point, Etats-Unis, 2008) (Simonneau et al., 2009).....	35
Tableau 3	Rôle de la voie RhoA/ROCK dans les modèles animaux d'HTP (Duong-Quy et al., 2012a).....	41
Tableau 4	Effets des inhibiteurs des ROCK dans les modèles animaux d'HTP (Duong-Quy et al., 2012a).....	42
Tableau 5	Effets des inhibiteurs des ROCK chez les patients atteints d'HTP (Duong-Quy et al., 2012a).....	47
Tableau 6	Les trois principales isoformes des NO synthases (NOS).....	57

INTRODUCTION

A. INTRODUCTION

I. La famille des Rho GTPases

I.1 Généralités

Les Rho GTPases sont des petites protéines G (monomériques) appartenant à la superfamille des protéines Ras et comptant une vingtaine de membres, dont les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 sont les mieux connues (Wennerberg and Der, 2004). Toutes les protéines dans la famille des Rho GTPases présentent près de 30% d'homologie avec Ras, et entre 80% et 90% d'homologie entre elles-mêmes. Les Rho GTPases sont des protéines monomériques liées aux récepteurs membranaires. Elles ont été initialement identifiées comme des molécules régulatrices de l'organisation du cytosquelette d'actine (Ridley and Hall, 1992). Aujourd'hui, il est établi que la famille des Rho GTPases joue aussi un rôle important dans diverses fonctions cellulaires, comme la motilité cellulaire (Aepfelbacher et al., 1997; Johnson, 1999), la survie et le cycle cellulaire (Esteve et al., 1998; Ghosh et al., 1997; Olson et al., 1995), ainsi que dans la régulation de la transcription des gènes (Hill et al., 1995; Murai and Treisman, 2002). Au niveau des vaisseaux, la RhoA est impliquée non seulement dans la contraction, la migration, la prolifération et la différenciation (Hirata et al., 1992; Mack et al., 2001), mais aussi dans la modification du phénotype des cellules musculaires lisses (CML) (Worth et al., 2001, 2004). De plus, la RhoA et la Rac sont impliquées dans le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale, la migration des cellules endothéliales (CE) et la restauration tissulaire (Aepfelbacher et al., 1997).

I.2 Régulation des Rho GTPases

I.2.1 Rôles des nucléotides GDP/GTP

A l'état basal, les Rho GTPases restent inactivées dans le cytosol lorsqu'elles sont couplées à du GDP. Après stimulation des récepteurs transmembranaires (récepteurs couplés à des protéines G ou récepteurs de facteurs de croissance) par des médiateurs chimiques (phospholipides, cytokines, facteurs de

croissance) ou des facteurs physiques (hypoxie, contraintes de cisaillement ou *shear stress*), les Rho GTPases sont transportées vers la membrane cellulaire où elles vont passer de la forme inactive (Rho-GDP) à la forme active (Rho-GTP) sous l'effet des facteurs d'échanges nucléotidiques GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Schmidt and Hall, 2002). A l'inverse, la forme active Rho-GTP peut être inactivée sous l'effet des protéines activatrices de la GTPase ou GAPs (*GTPase activating proteins*) qui accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP (Bernards, 2003) (**Fig. 1**).

I.2.2 Modification post-traductionnelle (isoprénylation)

Les Rho GTPases sont également activées par des modifications post-traductionnelles (isoprénylation) sous l'effet de geranylgeranyltransférase (GGTase). Ce processus permet la translocation de la Rho GTPase et son ancrage à la membrane cellulaire, où elle sera activée en réponse à l'interaction entre les ligands extracellulaires et leurs récepteurs membranaires (Casey, 1995). Les statines peuvent atténuer l'isoprénylation post-traductionnelle de la RhoA et de ce fait inhiber de nombreux effets biologiques de la RhoA (Rikitake and Liao, 2005).

I.2.3 Inhibiteurs de la dissociation des nucléotides guanidiniques (GDI)

Un groupe de protéines appelées GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) peuvent inhiber l'activation des Rho GTPases en empêchant l'échange GDP/GTP sur leurs sites de liaison aux Rho-GTPases. De plus, GDIs peuvent aussi former un complexe stable avec la Rho-GDP dans le cytosol ainsi donc empêcher sa translocation et son ancrage à la membrane cellulaire (Olofsson, 1999) (**Fig. 1**).

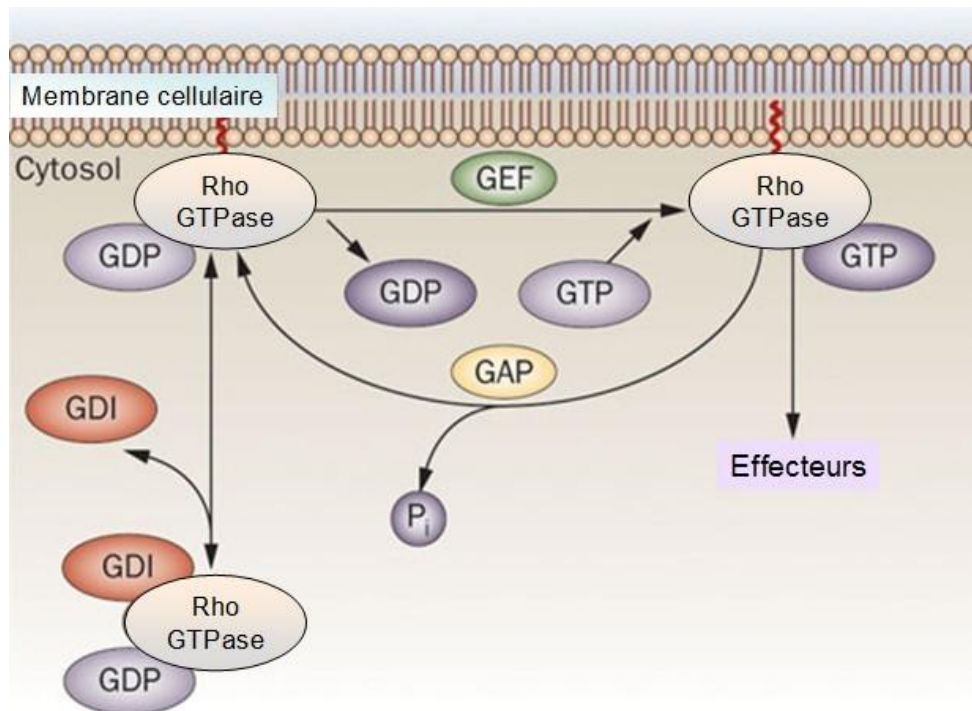


Fig. 1. Régulation des Rho GTPases. L'activation des Rho GTPases est régulée par les facteurs GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), qui catalysent les échanges GDP/GTP sur leurs sites de liaison aux Rho GTPases. A l'inverse, la Rho-GTP est inactivée suite à l'hydrolyse du GTP en GDP, sous l'effet des protéines GAPs (*GTPase activating proteins*). Par ailleurs, les protéines inhibitrices GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) inhibent l'activation des Rho GTPases en formant un complexe avec la Rho-GDP dans le cytosol, ce qui empêche la translocation des Rho GTPases et leur ancrage à la membrane cellulaire.

II. La voie RhoA/Rho-kinase (ROCK)

II.1 La RhoA GTPase

Parmi les membres de la famille Rho GTPases, la RhoA (poids moléculaire ≈ 24 kDa) est l'une des mieux caractérisées. En plus de son effet dans l'organisation du cytosquelette d'actine, la RhoA est également impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la contraction, la motilité, la prolifération, l'apoptose, etc. (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

La RhoA est une petite protéine G dont l'activité est régulée par le cycle RhoA-GDP/RhoA-GTP sous l'effet de GEFs et GAPs (Bernards, 2003; Schmidt and Hall, 2002). L'activité de la RhoA dépend également des protéines inhibitrices GDIs et des mécanismes de modification post-traductionnelle comme la réaction d'isoprénylation (Casey, 1995; Olofsson, 1999).

II.2 Les Rho-kinases (ROCK)

II.2.1 Isoformes et structures des ROCK

Les Rho-kinases (ROCK) ont été les premières (et sont probablement les mieux) caractérisées parmi tous les effecteurs de la RhoA (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996). Depuis leurs identifications en 1996, le rôle des ROCK a été largement étudié, notamment dans la physiologie et la physiopathologie cardiovasculaire (Loirand et al., 2006). Les ROCK sont des protéines kinases (poids moléculaire ≈ 160 kDa) ciblant spécifiquement les résidus sérine/thréonine. Deux isoformes de ROCK (ROCK-1 ou $ROK\beta$, et ROCK-2 ou $ROK\alpha$) sont encodées par deux différents gènes respectivement localisés sur les chromosomes 18 (18q11.1) et 2 (2p24) (Matsui et al., 1996; Nakagawa et al., 1996).

La structure moléculaire des ROCK comprend le domaine kinase (domaine catalytique) localisé vers l'extrémité N-terminale, suivi par le domaine appelé "*coiled-coil domain*" (domaine auto-inhibiteur) localisé vers l'extrémité C-terminale.

Ce “*coiled-coil domain*” est composé d’une région RBD (*Rho-binding domain*) ainsi qu’une région PH (*pleckstrin-homology domain*) avec un domaine CRD (*cysteine-rich domain*) localisée vers l’extrémité C-terminale (Fig. 2). ROCK-1 et ROCK-2 partagent 65% d’homologie selon la séquence globale en acides aminés, dont 58% dans la région RBD et 92% dans le domaine kinase (Nakagawa et al., 1996).

ROCK-1 et ROCK-2 sont exprimés de façon ubiquitaire chez les invertébrés et les vertébrés, avec une expression prioritaire de ROCK-2 au niveau du cerveau et du muscle squelettique, et une expression prioritaire de ROCK-1 au niveau des cellules inflammatoires circulantes (Nakagawa et al., 1996). ROCK-1 et ROCK-2 sont toutes les deux exprimées au niveau des CML et des CE vasculaires et du cœur (Loirand et al., 2006). Au niveau cellulaire, elles se trouvent essentiellement dans le cytosol, mais elles peuvent aussi transloquer à la membrane cellulaire lors de l’activation de la RhoA (Leung et al., 1995).

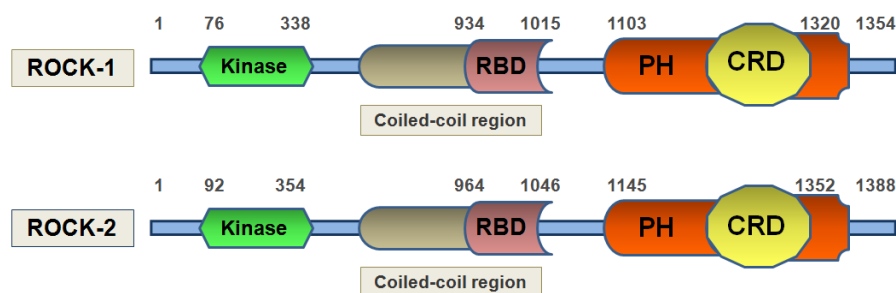


Fig. 2. Structure moléculaire des ROCK (Duong-Quy et al., 2012a). La structure moléculaire des ROCK est composée d’un domaine kinase vers l’extrémité N-terminale et un domaine “*coiled-coil domain*” qui comprend une région RBD ainsi qu’une région PH avec un domaine CRD vers l’extrémité C-terminale.

II.2.2 Régulation de l’activité des ROCK

Dans la structure moléculaire des ROCK, le coiled-coil domain vers l’extrémité C-terminale (la région RBD et la région PH) est impliqué dans

l'auto-inhibition de l'activité des ROCK, en interférant avec le domaine kinase localisé à l'extrémité N-terminale des ROCK (Amano et al., 2000) (**Fig. 3A**).

La liaison de la RhoA-GTP à la région RBD peut stimuler l'activité de la phosphotransférase des ROCK en dissociant le domaine kinase de la région auto-inhibitrice de l'extrémité C-terminale (**Fig. 3B**). Avec la RhoA-GTP, l'acide arachidonique (AA) ainsi que la sphingosine phosphorylcholine (SPC) sont également capables de stimuler l'activité des ROCK, en interférant avec la région auto-inhibitrice de l'extrémité C-terminale, surtout la région PH, et empêchant l'effet inhibiteur de cette dernière sur le domaine kinase des ROCK (Feng et al., 1999; Shirao et al., 2002) (**Fig. 3B**). De plus, les ROCK peuvent être activés par un clivage de la région auto-inhibitrice de l'extrémité C-terminale sous l'effet de la caspase-3 ou du granzyme B (Sebbagh et al., 2001, 2005) (**Fig. 3C**).

L'activité de ROCK-1 peut être négativement régulée par la petite protéine G RhoE (**Fig. 3D**). La liaison de la RhoE au domaine kinase de ROCK-1 entraîne une inhibition de l'activité de ROCK-1, en empêchant la liaison de la RhoA-GTP à la région RBD (Riento et al., 2003). Il existe deux autres petites protéines G, Gem et Rad, qui sont également capables d'inhiber l'activité des ROCK, dont le mécanisme n'est pas encore clarifié (Ward et al., 2002).

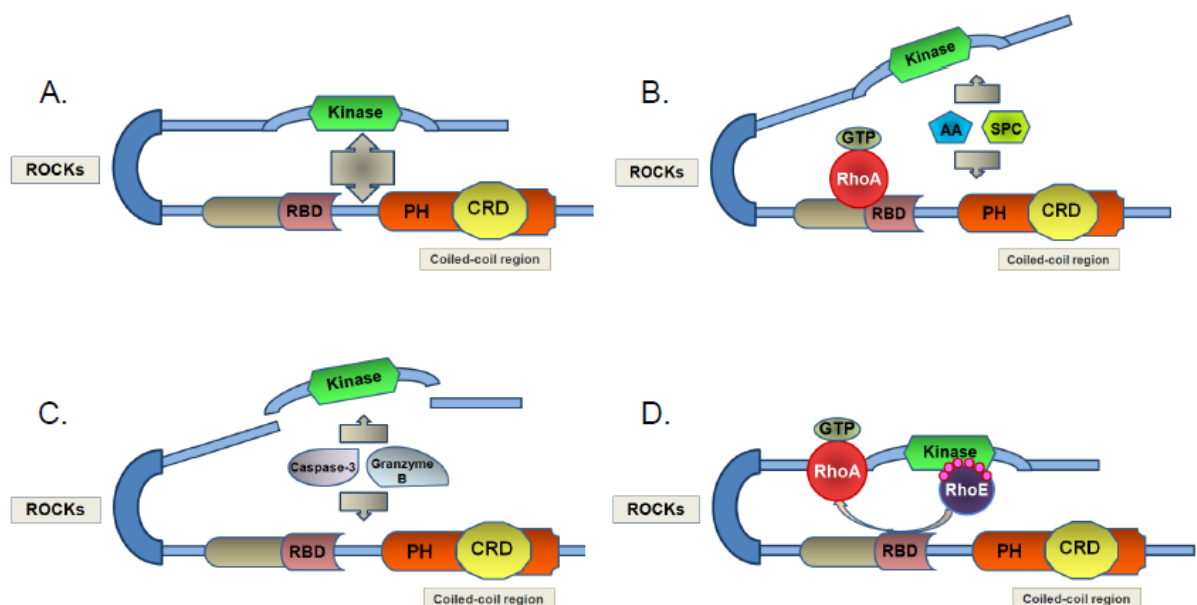


Fig. 3. Régulation de l'activité des ROCK (Duong-Quy et al., 2012a). (A) auto-inhibition de l'activité des ROCK. (B) régulation positive de l'activité des ROCK par la RhoA-GTP, l'acide arachidonique (AA) ou la sphingosine phosphorylcholine (SPC). (C) régulation positive de l'activité des ROCK par le clivage de la région inhibitrice C-terminale sous l'effet de la caspase-3 ou du granzyme B. (D) régulation négative de l'activité de ROCK-1 par la RhoE.

II.2.3 Substrats des ROCK

Jusqu'à aujourd'hui, plus de 15 substrats des ROCK ont été identifiés (**Tableau 1**), dont une majeure partie est impliquée dans la formation et l'organisation du cytosquelette (Riento and Ridley, 2003).

Un autre groupe de substrats des ROCK, qui participent à la contraction cellulaire, ont été largement étudiés, tels que la MYPT-1 (Kimura et al., 1996), la CPI-17 (Kitazawa et al., 2000), la MLC (*myosin light chain*) (Amano et al., 1996) et la calponine (Kaneko et al., 2000). La MYPT-1, un substrat majeur des ROCK, est une sous-unité de l'enzyme MLCP (*myosin light chain phosphatase*). La MLCP, qui déphosphoryle la MLC phosphorylé (MLC-P), favorise la relaxation des CML. La phosphorylation de la MYPT-1 par les ROCK, inhibe l'activité de la MLCP et favorise la contraction des CML (Uehata et al., 1997). A l'état basal, la CPI-17 inhibe l'activité de la MLCP dans les CML. Tandis que la phosphorylation de la CPI-17 par les ROCK augmente l'effet inhibiteur de la CPI-17 sur la MLCP et favorise ainsi la contraction des CML par un mécanisme indépendant de la concentration intracellulaire du calcium (Kitazawa et al., 2000).

La troponine cardiaque est identifiée comme un substrat des ROCK dont la phosphorylation par les ROCK impacte sur la génération de la tension des myocytes cardiaques (Vahebi et al., 2005).

Récemment identifié comme un substrat des ROCK, la PTEN (*phosphatase*

and tensin homologue) joue un rôle important dans la régulation de la signalisation intracellulaire, particulièrement dans la voie PI3-kinase/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt), qui est impliqué dans la croissance cellulaire, la synthèse protéique, la régulation transcriptionnelle et la survie cellulaire (Li et al., 2005). L'inhibition des ROCK par le fasudil contribue à la protection cardiovasculaire en favorisant l'activation de la voie PI3-kinase/Akt au niveau des CE (Wolfrum et al., 2004).

Tableau 1. Substrats des ROCK (Loirand et al., 2006)

Targets	Effect	Function
Cytoskeleton regulating proteins		
Adducin	Increased adducin/F-actin interaction	Assembly of spectrin/F-actin network; Increase of cell motility
ERM	Decrease of intra- or intermolecular head-to-tail association of ERM	Actin filament/membrane interaction; microvilli formation
MARCKS	?	Cytoskeletal rearrangement
NHE1	Stimulation of its Na ⁺ -H ⁺ exchanger activity	Actin stress fiber formation
EF-1 alpha	Inhibition of its binding to F-actin	Increase of actin stress fiber formation?
LIM-kinases 1 and 2	Stimulation of kinase activity	Actin polymerization (through phosphorylation and inactivation of cofilin); Coordination of microtubule destabilization and actin formation
RhoE	Increase RhoE stability	Potentialization of the inhibitory effect of RhoE on actin stress fiber formation and Ras-induced transformation
Intermediate filaments		
GFAP	Inhibition of its filament formation	Regulation of cytokinesis
NF-L	Inhibition of its filament formation	?
Desmin	Inhibition of its filament formation	?
Vimentin	Inhibition of its filament formation	Regulation of cytokinesis
Contraction regulating proteins		
MYPT-1	Inhibition of MLCP activity	Ca ²⁺ sensitization of smooth muscle contraction/ stress fiber formation
CPI-17	Inhibition of MLCP activity	Ca ²⁺ sensitization of smooth muscle contraction
MLC	Stimulation of actomyosin ATPase activity	Ca ²⁺ sensitization of smooth muscle contraction/ stress fiber formation
Calponin	Inhibition of calponin binding to actin	Ca ²⁺ sensitization of smooth muscle contraction
Troponin	Inhibition of actomyosin ATPase activity	Inhibition of tension generation of cardiac myocytes
Microtubule regulating proteins		
Tau	Reduction of its activity	Regulation of microtubule dynamics
MAP 2	?	?
Neuronal proteins		
CRMP-2	?	Growth cone collapse
Signaling proteins		
PTEN	Stimulation of phosphatase activity	Decrease of intracellular PtdIns(3,4,5)P ₃ level; tumor suppression

ERM indicates ezrin, radixin, moesin; MARCKS, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate; NHE1, Na⁺-H⁺ exchanger; EF-1 α , elongation factor 1- α ; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NF-L, neurofilaments; MAP 2, microtubule-associated protein 2; CRMP-2, collapsin response mediator protein 2.

III. Rôle des ROCK dans les fonctions cellulaires

III.1 ROCK et cellules musculaires lisses (CML) vasculaires

De nombreuses études ont montré le rôle important des ROCK dans les fonctions des CML vasculaires. La plupart des données ont été obtenues avec l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques des ROCK, tels que le fasudil (AT877 et HA-1077), l'hydroxyfasudil et le Y-27632, *in vitro* et *in vivo*. Les ROCK sont impliqués non seulement dans la contraction, la migration, la prolifération, l'apoptose et la différenciation des CML, mais aussi dans la transcription des gènes (Fig. 4).

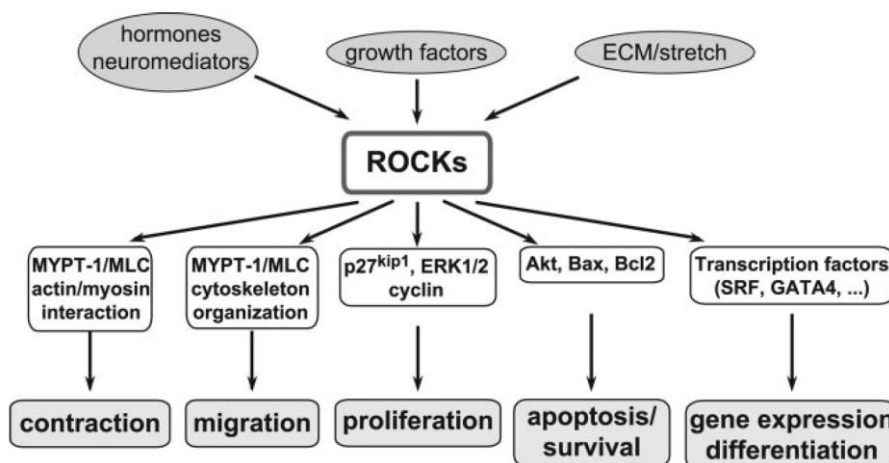


Fig.4. Rôles des ROCK dans les CML vasculaires (Loirand et al., 2006).

III.1.1 ROCK et contraction des CML

Le principal mécanisme responsable de la contraction des CML est la phosphorylation/déphosphorylation de la MLC. La MLC est phosphorylée par la protéine kinase MLCK (*myosin light chain kinase*) dont l'activation est dépendante de la formation du complexe Ca^{2+} -calmoduline (Ca^{2+} -CAM). À l'inverse, la MLC-P (MLC phosphorylée) est déphosphorylée par la MLCP (*myosin light chain phosphatase*), de façon indépendante de la concentration intracellulaire du calcium

(Somlyo and Somlyo, 2003). La contraction des CML est donc d'une part associée à une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium qui favorise l'activation de la MLCK, et d'autre part associée à un mécanisme indépendant de la concentration intracellulaire du calcium. Au niveau des CML, l'augmentation de la sensibilité du calcium est liée à une inhibition de l'activité de la MLCP qui donc entraîne un niveau élevé de la MLC-P dans la CML et la maintient dans un état contractile persistant. La sensibilité du calcium est principalement due à une activation de la voie RhoA/ROCK, qui induit la phosphorylation de la MYPT-1 et l'inhibition résultante de la MLCP (Somlyo and Somlyo, 2003) (**Fig. 5**). La voie RhoA/ROCK phosphoryle en plus la MLC, la CPI-17 et la calponine, ce qui est également impliqué dans la contraction des CML (Pfitzer, 2001). Au niveau des CML, la CPI-17 inhibe l'activité de la MLCP. La phosphorylation de la CPI-17 par les ROCK augmente son effet inhibiteur sur l'activité de la MLCP et de ce fait favorise la contraction des CML de façon indépendante de la concentration intracellulaire du calcium (Kitazawa et al., 2000).

De nombreuses études ont montré que l'activation anormale de la voie RhoA/ROCK est responsable de la vasoconstriction dans diverses maladies cardiovasculaires (Barman et al., 2009). Les ROCK sont également impliqués dans le contrôle du tonus myogénique des différents vaisseaux, notamment les artères mésoencéphaliques et cérébrales (Lagaud et al., 2002; VanBavel et al., 2001).

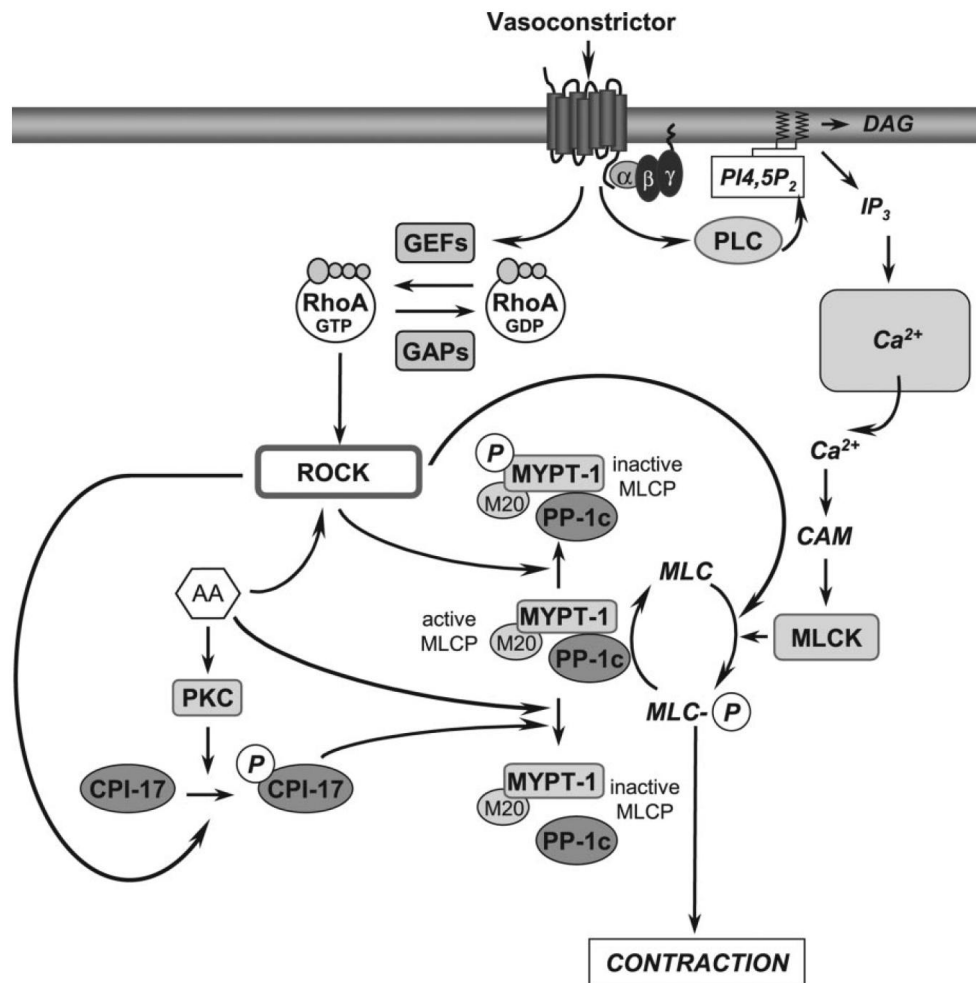


Fig.5. La voie RhoA/ROCK dans la contraction des CML (Loirand et al., 2006).

III.1.2 ROCK et différenciation des CML

Contrairement à la majorité des cellules différenciées, les CML gardent leur capacité à modifier leurs propres phénotypes et à proliférer en réponse à de nombreux stimulus, comme les cytokines, les facteurs de croissance, la matrice extracellulaire (MEC), les neurotransmetteurs et les médiateurs de l'inflammation (Owens, 1995). La voie RhoA/ROCK est impliquée dans la régulation de la différenciation des CML entre un phénotype contractile et un phénotype prolifératif/synthétique par l'intermédiaire du facteur de réponse au sérum (SRF, *serum response factor*) (Miano,

2003; Owens, 1995) (Fig. 6). Au niveau des CML, l'activation de la voie RhoA/ROCK joue un rôle essentiel dans la transcription des gènes codant de nombreuses protéines contractiles (Albinsson et al., 2004; Mack et al., 2001). La voie RhoA/ROCK est également impliquée dans le maintien de l'équilibre entre la plasticité phénotypique (surtout le phénotype contractile) et la plasticité mécanique, par la réorganisation du cytosquelette des CML (Halayko and Solway, 2001). Enfin, l'état de la différenciation des CML est un élément important pouvant ensuite influencer les autres fonctions cellulaires, comme la contraction, la migration et la prolifération des CML (Halayko and Solway, 2001).

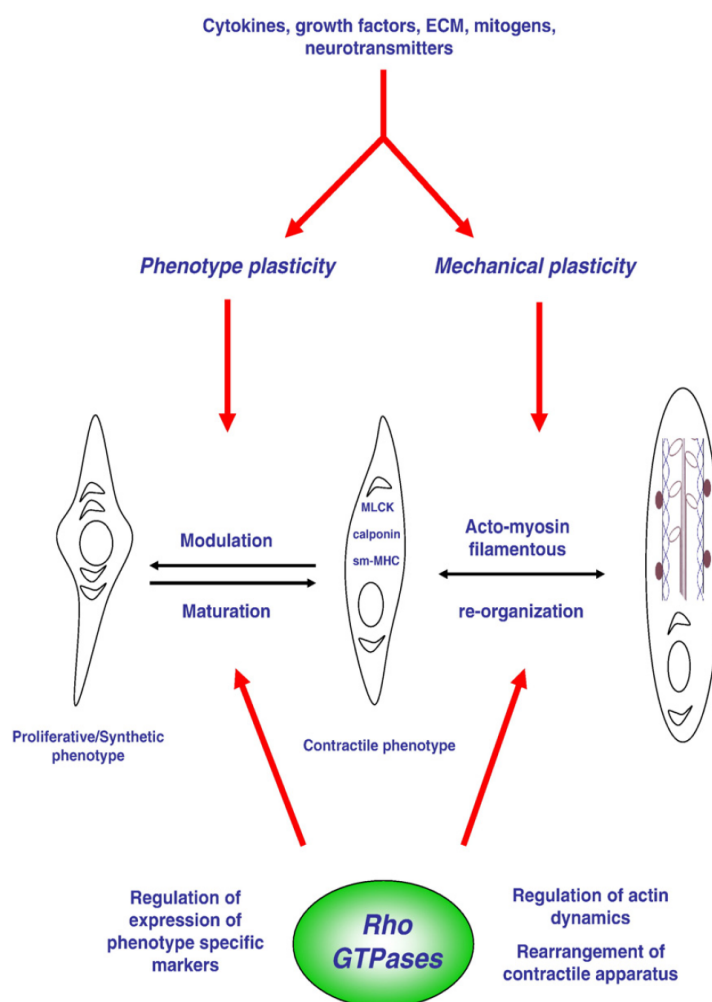


Fig.6. La voie RhoA/ROCK dans la différenciation des CML (Schaafsma et al., 2008).

III.1.3 ROCK et migration des CML

Le blocage pharmacologique de l'activité des ROCK inhibe la migration des CML induite par le PDGF (*platelet derived growth factor*) ou l'acide lysophosphatidique (LPA) dépendante ou indépendante de la phosphorylation de la MLC (Ai et al., 2001; Sawada et al., 2000). La migration des CML induite par l'UTP ou la thrombine est également réduite en inhibant l'activité des ROCK (Chaulet et al., 2001; Seasholtz et al., 2001). Par ailleurs, la formation du néointima au cours du remodelage vasculaire est principalement associée à la migration des CML due à l'activation de la voie RhoA/ROCK (Negoro et al., 1999; Shibata et al., 2001). La voie RhoA/ROCK pourrait influencer la migration des CML vasculaires par la phosphorylation de la MLC et la réorganisation du cytosquelette (Gerthoffer, 2007). L'inhibition de la migration des CML pourrait également prévenir ou améliorer l'angiogenèse et réduire les séquelles lors des atteintes vasculaires (Gerthoffer, 2007).

III.1.4 ROCK et prolifération des CML

Le rôle des ROCK dans la prolifération des CML a été montré dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* par l'utilisation de différents inhibiteurs pharmacologiques des ROCK. L'inhibition des ROCK par le Y-27632 diminue l'activation de l'ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) associée à la stimulation du PDGF-BB, suggérant la participation des ROCK dans la prolifération des CML induite par le PDGF-BB (Kamiyama et al., 2003). La prolifération des CML induite par la thrombine ou par l'urotensine-II est aussi diminuée par l'inhibition des ROCK (Sauzeau et al., 2001; Seasholtz et al., 1999). Par ailleurs, l'activation des ROCK est impliquée dans la prolifération des CML, ce qui contribue à l'hypertrophie vasculaire induite par l'angiotensine II (Ang II) (Yamakawa et al., 2000). L'expression de p27^{kip1}, un inhibiteur des protéines kinases dépendantes de la cycline (CDK, *cyclin-dependent kinase*) empêchant la prolifération cellulaire excessive, est inhibé par les ROCK, ce qui aboutit à une accélération de la progression du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire qui en résulte (Kanda et al., 2005; Laufs et al.,

1999a; Sawada et al., 2000). Il existe cependant des données contradictoires suggérant que l'activation de la voie RhoA/ROCK ne soit pas nécessairement impliquée dans la prolifération cellulaire (Liu et al., 2002). La voie RhoA/ROCK étant à la fois impliquée dans la différenciation et la prolifération cellulaire, le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la prolifération cellulaire pourrait essentiellement dépendre de l'état de différenciation cellulaire (Halayko and Solway, 2001).

III.2 ROCK et cellules endothéliales (CE)

III.2.1 ROCK et perméabilité endothéliale vasculaire

L'endothélium est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, qui forme une barrière semi-perméable entre le sang et l'interstitium, en régulant l'exsudation du fluide, des protéines plasmatiques et des leucocytes. La dysfonction de la barrière endothéliale, autrement dit une altération de la perméabilité endothéliale, est impliquée de façon importante dans certaines conditions pathologiques, comme la réponse inflammatoire, l'œdème, l'athérosclérose, l'hypertension et le cancer (Mehta and Malik, 2006). La perméabilité endothéliale, influencée par divers stimulus chimiques et mécaniques, dépend d'un équilibre ténu entre la contractilité de la cellule endothéliale dépendante de l'actomyosine, qui génère une tension centripète, et les forces d'adhésion cellule-cellule ou cellule-MEC, qui modifie la forme de la CE (Michel and Curry, 1999). Dans les CE, la contractilité liée à l'actomyosine est régulée par la phosphorylation de la MLC, associée d'une part à l'activation de la MLCK par l'interaction Ca^{2+} -calmoduline, et d'autre part à l'activation de la voie RhoA/ROCK qui inhibe l'activité de la MLCP (Birukova et al., 2004; Essler et al., 1998; Gorovoy et al., 2005). De nombreux médiateurs vasoactifs, tels que la thrombine, la LPA, l'histamine (5-HT), le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et l'ET-1 (*endothelin-1*), sont impliqués dans la régulation de la perméabilité endothéliale associée à l'activation de la voie RhoA/ROCK (Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Aujourd'hui, la plupart des données ont été obtenues à partir des CE cultivées *in vitro*. L'inhibition de la voie RhoA/ROCK est considérée comme une

nouvelle cible thérapeutique dans certaines maladies associées à une anomalie de la fonction de barrière des cellules endothéliales.

III.2.2 ROCK et migration des CE

La migration des CE est régulée par la voie RhoA/ROCK, particulièrement dans la régénération tissulaire et l'angiogenèse (Aepfelbacher et al., 1997; Yano et al., 1996). L'activation de la voie RhoA/ROCK participe à la migration endothéliale et l'angiogenèse par la stimulation du VEGF, de la sphingosine-1-phosphate et de la contrainte de cisaillement (Lee et al., 1999; van Nieuw Amerongen et al., 2003; Shiu et al., 2004). Il a été récemment montré que la molécule d'adhésion des cellules endothéliales et des plaquettes (PECAM-1, *platelet endothelial cell adhesion molecule*) favorise la migration des CE par l'intermédiaire de la voie RhoA/ROCK (Gratzinger et al., 2003).

III.2.3 ROCK et expressions géniques des CE

Dans les CE, l'activation de la voie RhoA/ROCK participe aussi à la régulation de l'expression des gènes. Les ROCK entraînent une surexpression génique du facteur tissulaire endothélial, de la molécule d'adhésion intracellulaire ou de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) (Anwar et al., 2004; Eto et al., 2002; Nakakuki et al., 2005).

L'activation des ROCK peut entraîner une inhibition de la production du monoxyde d'azote (NO) par plusieurs mécanismes. La voie RhoA/ROCK diminue la stabilité des ARN messagers et l'expression protéique de la NO synthase endothéliale (NOS_e ou NOS-3) (Laufs and Liao, 1998). A l'inverse, la NOS-3 peut être surexprimée en utilisant les inhibiteurs des ROCK ou les inhibiteurs de l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl (HMG)-CoA réductase, plus connus sous le nom de statines (Eto et al., 2001; Laufs et al., 1998). De plus, les inhibiteurs des ROCK peuvent activer la voie PI3-kinase/Akt, stimuler l'activité de la NOS-3 et aboutir à une augmentation de la production du NO (Wolfrum et al., 2004).

La voie RhoA/ROCK est également impliquée dans l'activation de la transcription du gène codant la préproET-1 au niveau des CE (Hernández-Perera et al., 2000). L'utilisation des statines diminue l'expression du gène codant la préproET-1 (Hernández-Perera et al., 1998).

III.3 ROCK et cellules inflammatoires

La réponse inflammatoire est associée à une augmentation de l'infiltration et de l'activation des cellules inflammatoires, qui dépend de multiples fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la polarisation morphologique, la migration des cellules inflammatoires et la perméabilité endothéliale vasculaire. Jusqu'à présent, l'effet de la voie RhoA/ROCK dans la réponse inflammatoire a été surtout étudié dans des cellules inflammatoires comme les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, et les lymphocytes (Rolfe et al., 2005; Rougerie and Delon, 2012; Schaafsma et al., 2008). L'implication de la voie RhoA/ROCK dans la réponse inflammatoire a été mise en évidence dans plusieurs maladies cardiovasculaires et pulmonaires, comme l'athérosclérose, l'asthme, la bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO) et l'hypertension pulmonaire (HTP) associées au tabac ou à la fibrose interstitielle pulmonaire (Lee et al., 2005; Rolfe et al., 2005; Schaafsma et al., 2008; Jiang et al., 2012).

La RhoA GTPase est impliqué dans la régulation de l'adhésion des cellules inflammatoires par l'intermédiaire d'intégrine (Alblas et al., 2001; Rougerie and Delon, 2012; Wójciak-Stothard et al., 1999). Les rôles de la voie RhoA/ROCK dans la régulation de la contractilité cellulaire et la réorganisation du cytosquelette sont déjà connus. La contractilité cellulaire joue un rôle important dans les modifications morphologiques et la polarisation cellulaire (Jaffe and Hall, 2005; Worthylake et al., 2001), tandis que la réorganisation du cytosquelette est responsable de la maintenance de la polarité cellulaire (Takesono et al., 2010). Grâce à ses effets sur la réorganisation du cytosquelette et la polarité cellulaire, la voie RhoA/ROCK peut directement influencer la migration des cellules inflammatoires (Jaffe and Hall, 2005). La

migration trans-endothéliale est un des processus clés pendant l'infiltration inflammatoire, y compris l'adhésion, la polarité, la contraction et la migration des cellules inflammatoires. L'inhibition de la voie RhoA/ROCK altère la migration trans-endothéliale des cellules inflammatoires (Heasman et al., 2010; Worthylake et al., 2001). L'activation des cellules inflammatoires est également associée à la voie RhoA/ROCK (Rougerie and Delon, 2012). De plus, l'effet de la voie RhoA/ROCK dans la production de certaines chimiokines et cytokines a déjà été rapporté, bien que la source des médiateurs inflammatoires reste toujours débattue (Taki et al., 2007).

III.4 ROCK et fibroblastes et myofibroblastes

Les fibroblastes et les myofibroblastes sont les principales cellules synthétisant et sécrétant la MEC dans les parois des bronchioles ou des alvéoles ainsi que dans le parenchyme pulmonaire. Au cours de la fibrose, la voie RhoA/ROCK est impliquée de façon importante par ses effets sur la prolifération, la migration, la différenciation, la contraction cellulaire et son interaction avec les autres voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie de la fibrose.

III.4.1 ROCK et prolifération des (myo)fibroblastes

L'exposition des fibroblastes pulmonaires humains à l'hyperoxie *in vitro*, entraîne une activation de la RhoA par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) en favorisant la dissociation du GDI de la RhoA, favorisant ainsi la prolifération des fibroblastes et la production du collagène de type-I (Kondrikov et al., 2011). Des fibroblastes pulmonaires provenant de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) présentent une augmentation de la prolifération cellulaire *in vitro*, associée à une surexpression génique et protéique de la cycline D1, un régulateur du cycle cellulaire, due à l'activation de la voie RhoA/ROCK (Watts et al., 2006). De plus, il a été montré que la voie RhoA/ROCK est impliquée dans la prolifération des fibroblastes pulmonaires murins par l'activation de la MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) consécutive à la stimulation de 5-HT *in vitro* (Mair et al., 2008).

III.4.2 ROCK et migration des (myo)fibroblastes

En plus de son effet sur la prolifération, la voie RhoA/ROCK influence également la migration des (myo)fibroblastes. Les fibroblastes pulmonaires de souris ayant reçu la bléomycine par voie intratrachéale possèdent des caractéristiques des myofibroblastes et présentent une augmentation de la migration cellulaire en réponse à une stimulation du PDGF-BB *in vitro*, que l'on peut inhiber par le Y-27632, un inhibiteur des ROCK (Shimizu et al., 2001).

III.4.3 ROCK et différenciation des fibroblastes

La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est un processus très important au cours de la pathogenèse de la fibrose. Les myofibroblastes, caractérisés par l'expression de α -SMA (*α -smooth muscle actin*) et sa contractilité, sont capables de synthétiser et sécréter la MEC. Au niveau des fibroblastes cardiaques des rats, la force mécanique entraîne une activation de la voie RhoA/ROCK *in vitro*, suivi par une phosphorylation de la LIM kinase (LIMK, *LIM kinase*) ainsi qu'une inactivation de la cofiline, qui aboutit à une réorganisation d'actine. Cette réorganisation d'actine, due à l'activation de la voie RhoA/ROCK/LIMK, joue un rôle important dans la régulation positive de l'expression de α -SMA, et favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes cardiaques (Zhao et al., 2007). La différenciation des fibroblastes peut être influencée par différents facteurs de croissance, notamment le CTGF (*connective tissue growth factor*) et le TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*). Les études précédentes ont montré que l'activation du TGF- β 1 et du CTGF est impliquée dans la surexpression de α -SMA et la différenciation des fibroblastes pulmonaires par l'intermédiaire de la voie RhoA/ROCK *in vitro*, et que le simvastatine est capable d'inhiber les changements phénotypiques et fonctionnels des fibroblastes (Watts and Spiteri, 2004; Watts et al., 2005).

En dehors des fibroblastes locaux, il existe une autre source de myofibroblastes, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, *epithelial to mesenchymal transition*). Il a été démontré que la voie RhoA/ROCK est impliquée dans

la réorganisation du cytosquelette ainsi que dans l'EMT liée à une activation du TGF- β 1 (Bhowmick et al., 2001; Xu et al., 2009).

III.4.4 ROCK et contraction des myofibroblastes

Récemment, il a été montré que la contractilité des myofibroblastes est essentiellement impliquée dans la progression et la persistance de la fibrose tissulaire (Huang et al., 2011; Wipff et al., 2007b). En dehors de son effet sur la contraction des CML, la voie RhoA/ROCK participe également à la contraction des myofibroblastes par la phosphorylation de la MYPT-1 (Parizi et al., 2000; Tomasek et al., 2006). Il a été récemment montré qu'une augmentation de la contractilité des myofibroblastes, due à une élévation de la phosphorylation de la MLC, joue un rôle critique dans la fibrose pulmonaire chez des souris ayant reçu des injections de la bléomycine. Le traitement par la relaxine, qui favorise une déphosphorylation de la MLC-P par l'inactivation de la voie RhoA/ROCK, altère la contractilité des myofibroblastes et améliore la fibrose pulmonaire (Huang et al., 2011). Par ailleurs, l'inhibition des ROCK par le traitement avec le fasudil peut atténuer la cicatrisation grâce à l'inhibition de la contractilité des myofibroblastes (Bond et al., 2011).

IV. La voie RhoA/ROCK et l'hypertension pulmonaire (HTP)

IV.1 Définition et classification clinique des HTP

L'hypertension pulmonaire (HTP) est un ensemble de différentes affections qui entraînent une élévation permanente de la pression artérielle dans la circulation pulmonaire. Chez les sujets sains, les valeurs normales de pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) sont de 14.0 ± 3.3 mmHg au repos (Kovacs et al., 2009). L'HTP se définit par une PAPm supérieure ou égale à 25 mmHg au repos, mesurée par cathétérisme cardiaque droit. Selon le dernier symposium mondial sur l'HTP qui s'est tenu en Californie en 2008, les différentes formes d'HTP sont classées en cinq groupes et un sous-groupe, en fonction de leurs physiopathologies, leurs caractéristiques cliniques et surtout leurs prises en charge thérapeutiques (Simonneau et al., 2009) ([Tableau 2](#)).

Le groupe 1 rassemble les hypertensions artérielles pulmonaires (HTAP), qui affectent directement les petits vaisseaux pulmonaires, caractérisées par la vasoconstriction excessive, le remodelage de la paroi vasculaire, la thrombose *in situ* et l'inflammation chronique contribuant à l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire (RVP). A côté de l'HTAP idiopathique, d'autres étiologies d'HTAP du groupe 1 incluent les facteurs héréditaires, la prise d'anorexigènes ou de toxines, les maladies du tissu conjonctif, l'infection par le VIH, l'hypertension portale, les cardiopathies congénitales, la bilharziose ou l'anémie hémolytique chronique. Malgré une atteinte prédominante au niveau des veinules et des capillaires pulmonaires, la maladie veino-occlusive pulmonaire et l'hémangiomatose capillaire pulmonaire sont classées dans un sous-groupe appartenant au groupe 1, en raison de certaines similitudes comme les modifications histopathologiques (par exemple la fibrose de l'intima et l'hypertrophie de la média), les facteurs de risque et les présentations cliniques. La prise en charge thérapeutique de la maladie veino-occlusive pulmonaire et de l'hémangiomatose capillaire pulmonaire est assez différente des autres HTAP et le pronostic est également plus mauvais dans ces deux formes que dans les autres

formes d'HTAP (Montani et al., 2009).

Le groupe 2 comprend les HTP d'origine ventriculaire gauche associée à une dysfonction systolique/diastolique ou à une pathologie valvulaire, au cours desquelles l'élévation de la PAPm est liée à une augmentation de la pression post-capillaire.

Le groupe 3 comprend les HTP liés à une affection respiratoire chronique et/ou une hypoxémie comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), les maladies pulmonaires interstitielles (fibrose ou emphysème), le séjour en haute altitude et les troubles respiratoires liés au sommeil, dont le mécanisme principal est l'hypoxémie chronique. La circulation pulmonaire est capable de réagir par une vasoconstriction lors d'une hypoxie caractérisée par une baisse de la PaO₂ à moins de 60 mmHg, ce qui permet une redistribution du sang des zones hypoxiques vers les zones normoxiques pour maintenir un rapport ventilation/perfusion optimal (Brimioulle et al., 1996). Lorsque l'hypoxie alvéolaire devient chronique, la vasoconstriction pulmonaire est davantage liée à un déséquilibre de la production et la sécrétion anormale de médiateurs vasoactifs consécutive à un dysfonctionnement endothélial (Budhiraja et al., 2004). La BPCO et les pneumopathies interstitielles (surtout la fibrose pulmonaire) sont les deux causes principales d'HTP dans ce groupe, ceci sera détaillé dans les prochains chapitres de l'introduction.

Le groupe 4 comprend des HTP post-thromboembolique chronique (Dartevelle et al., 2004).

Le groupe 5 comprend des HTP liés à divers mécanismes peu clairs et/ou multifactoriels.

La classification détaillée des HTP est présentée dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Classification des hypertensions pulmonaires (Dana Point, Etats-Unis, 2008) (Simonneau et al., 2009).

-
- 1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)**
 - 1.1. HTAP idiopathique
 - 1.2. HTAP héréditaire (Mutation de BMPR2, d'ALK1, d'endoglin ou des facteurs non identifiés)
 - 1.3. HTAP induite par la prise d'anorexigènes ou de toxines
 - 1.4. HTAP associée à d'autres affections
 - 1.4.1. Connectivites
 - 1.4.2. Infection par le VIH
 - 1.4.3. Hypertension portale
 - 1.4.4. Cardiopathies congénitales
 - 1.4.5. Bilharziose
 - 1.4.6. Anémie hémolytique chronique
 - 1.5. HTAP persistante du nouveau-né
 - 1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire**
 - 2. Hypertension pulmonaire due à une cardiopathie gauche**
 - 2.1. Dysfonction systolique
 - 2.2. Dysfonction diastolique
 - 2.3. Valvulopathie
 - 3. Hypertension pulmonaire associée aux maladies respiratoires et/ou hypoxémie chronique**
 - 3.1. Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)
 - 3.2. Pneumopathies interstitielles
 - 3.3. Affections respiratoires associant un syndrome restrictif et obstructif
 - 3.4. Syndrome d'apnée du sommeil
 - 3.5. Syndrome d'hypoventilation alvéolaire
 - 3.6. Séjour en haute altitude
 - 3.7. Anomalies du développement
 - 4. Hypertension pulmonaire post-thromboembolique chronique**
 - 5. Hypertension pulmonaire due à un ou plusieurs mécanismes peu clairs et/ou multifactoriels**
 - 5.1. Maladies hématologiques: syndrome myéoprolifératif, splénectomie
 - 5.2. Maladies systémiques: sarcoïdose, histiocytose X, lymphangiomyomatose, neurofibromatose, vascularite
 - 5.3. Maladies métaboliques: glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdies
 - 5.4. Autres: médiastinites fibreuses, obstruction tumorale, insuffisance rénale chronique dialysée
-

IV.2 Physiopathologie de l'HTP

Au niveau du poumon, la vasoconstriction, le remodelage de la paroi des petits vaisseaux et la thrombose *in situ* sont les 3 principaux éléments qui contribuent à une augmentation de la RVP et de la PAPm (Fig. 7). La vasoconstriction pulmonaire est un événement précoce et commun dans la pathogenèse de l'HTP, tandis que le remodelage de la paroi des petits vaisseaux pulmonaires devient progressivement important dans le développement de l'HTP (Humbert et al., 2004).

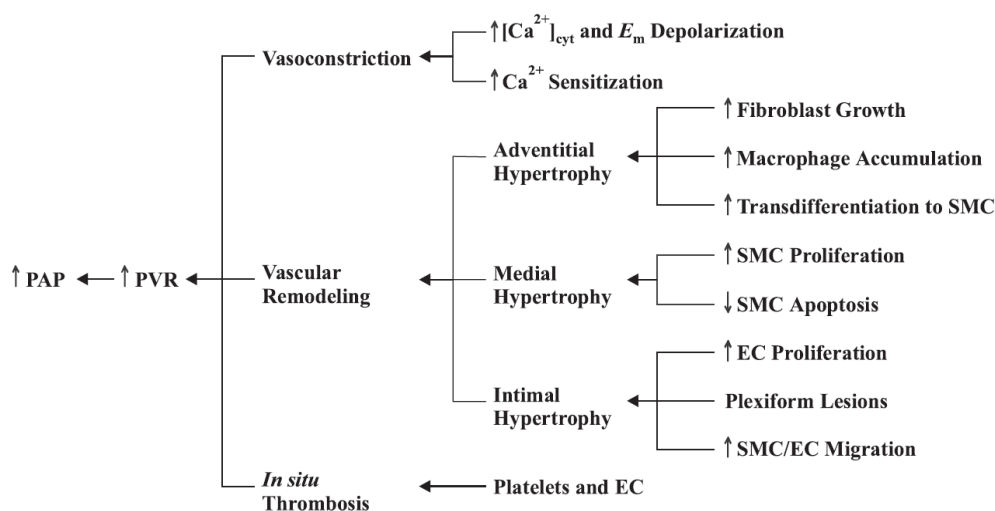


Fig. 7. Physiopathologie de l'HTP (Mandegar et al., 2004).

IV.2.1 La vasoconstriction pulmonaire hypoxique

Le mécanisme de la vasoconstriction pulmonaire associée à l'hypoxie alvéolaire est connu (Sommer et al., 2008; Ward and McMurtry, 2009). Lorsque l'hypoxie alvéolaire devient chronique, la vasoconstriction excessive pulmonaire est davantage liée à un dysfonctionnement endothélial qui d'une part diminue la production des vasodilatateurs, comme la prostacycline et le monoxyde d'azote (NO), et d'autre part, augmente la production de vasoconstricteurs comme l'ET-1, la 5-HT et le thromboxane-A₂ (TXA₂) (Budhiraja et al., 2004). Ces médiateurs jouent un rôle

important non seulement dans la régulation de la contraction des CML, mais aussi dans la migration, l'apoptose et la prolifération cellulaire qui conduisent progressivement au remodelage vasculaire par l'interaction avec les facteurs de croissance, de coagulation et/ou d'inflammation (Humbert et al., 2008).

IV.2.2 Le remodelage vasculaire pulmonaire

Le remodelage progressif de la paroi vasculaire pulmonaire aboutit à une obstruction de la lumière vasculaire et à une augmentation de la RVP. Il implique toutes les tuniques de la paroi des vaisseaux pulmonaires, où chaque type de cellules vasculaires (CE, CML et fibroblastes) est impliqué dans le remodelage vasculaire pulmonaire (Humbert et al., 2004).

La formation des lésions plexiformes due à une prolifération aberrante des CE est bien caractérisée dans l'HTP (Budhiraja et al., 2004; Cool et al., 1997; Fishman, 2000). Le stimulus initial de la prolifération anormale des CE est inconnu, mais pourrait être lié à l'hypoxie, aux contraintes de cisaillement, à l'inflammation ainsi qu'à la réponse aux médicaments ou aux toxines sur un terrain génétique prédisposant (Budhiraja et al., 2004). Les atteintes des CE altèrent non seulement la prolifération et l'apoptose cellulaire, mais aussi les fonctions homéostatiques de l'endothélium (par exemple la coagulation, la production des facteurs de croissance et des agents vasoactifs) (Budhiraja et al., 2004; Humbert et al., 2004).

L'hypertrophie de la média due à une prolifération des CML, ainsi que la néomuscularisation des petits vaisseaux distaux, périphériques et normalement non muscularisés jusque dans les acini respiratoires, sont les caractéristiques communes dans toutes les formes de remodelage vasculaire pulmonaire associées à l'HTP (Humbert et al., 2004). Ces CML ont des phénotypes hétérogènes et sont orientés différemment dans la média. Cette hétérogénéité se distingue, d'une part, par de différentes expressions de protéine du cytosquelette (α -actine, myosine, desmine et calponine), et d'autre part, par leur capacité à proliférer sous l'effet de l'hypoxie et de différents facteurs de croissance (Frid et al., 1997).

La néointima, caractérisée par la formation d'une couche de myofibroblastes et de MEC entre l'endothélium et la *lamina* élastique interne, est souvent présente en cas d'HTP sévère (Humbert et al., 2004). Le mécanisme responsable de la migration des fibroblastes de l'adventice vers la média (et à un état plus sévère vers l'intima) est mal connu. Cependant certaines études indiquent qu'il y a une régulation positive des métalloprotéases de la matrice (MMP2 et MMP9) qui sont impliquées dans la migration des fibroblastes (Humbert et al., 2004).

IV.2.3 Les plaquettes et la thrombose

La thrombose *in situ* est impliquée dans la physiopathologie de l'HTP, dans la mesure où celle-ci est associée à la fois aux anomalies de la cascade de coagulation et du système fibrinolytique et aux dysfonctionnements plaquettaires et endothéliaux (Fuster et al., 1984; Pietra et al., 1989). Les contraintes de cisaillement au niveau des petits vaisseaux pulmonaires sont capables de stimuler la surface des cellules endothéliales qui, lorsqu'elles sont lésées, favorisent la thrombose *in situ*. Le dysfonctionnement plaquettaire altère non seulement la coagulation intravasculaire, mais aussi le stockage et la libération de différents facteurs vasoactifs ou mitogéniques par les plaquettes, comme le TXA₂, le PDGF, la 5-HT, le TGF-β et le VEGF qui jouent un rôle important dans la vasoconstriction et le remodelage vasculaire pulmonaire (Herve et al., 2001).

IV.3 Rôle de la voie RhoA/ROCK dans l'HTP

De nombreuses études ont montré que la voie RhoA/ROCK joue un rôle important dans la vasoconstriction pulmonaire, le remodelage vasculaire pulmonaire et le dysfonctionnement endothélial au cours du développement de l'HTP, et que l'inhibition pharmacologique de cette voie de signalisation pourrait être bénéfique dans le traitement de l'HTP (Duong-Quy et al., 2012a; Fukumoto et al., 2007; Shimokawa and Takeshita, 2005) (**Fig. 8**).

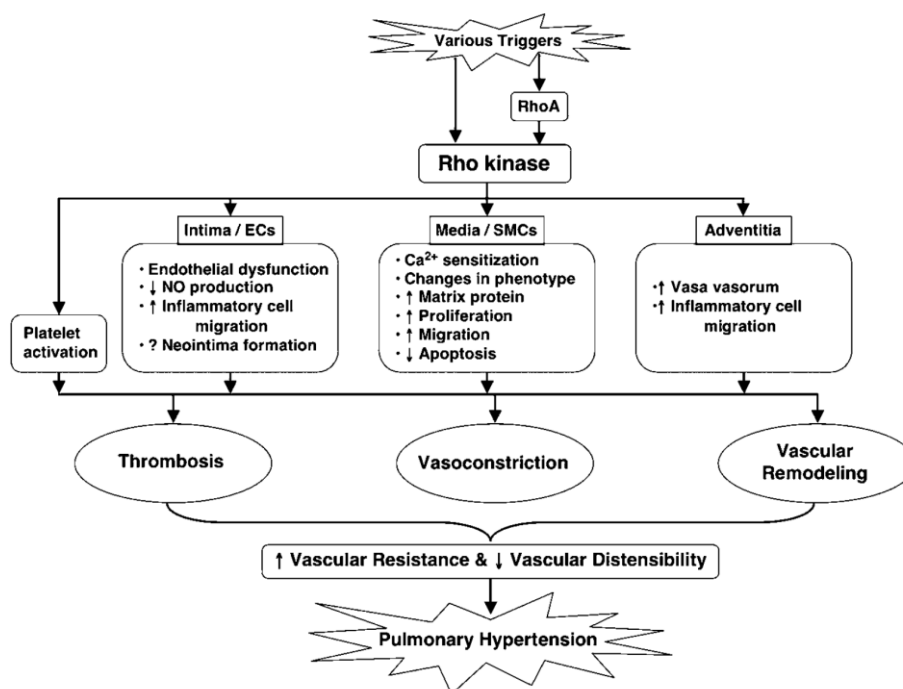


Fig. 8. Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de l'HTP (Oka et al., 2008).

IV.3.1 La voie RhoA/ROCK dans la vasoconstriction pulmonaire

Les études sur le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la vasoconstriction pulmonaire sont principalement basées sur la mesure de la contractilité des artères pulmonaires isolées ainsi que la pression de perfusion au niveau des poumons perfusés *in situ*, en réponse à l'hypoxie aiguë ou aux différents médiateurs vasoactifs. La vasoconstriction pulmonaire en réponse à l'hypoxie est déjà largement étudiée (Sommer et al., 2008; Ward and McMurtry, 2009).

Robertson *et al* ont montré que l'activation de la voie RhoA/ROCK est impliquée de façon importante dans la vasoconstriction pulmonaire en réponse à l'hypoxie aiguë au niveau des artères pulmonaires isolées et des poumons perfusés *in situ* (Robertson et al., 2000). Ces auteurs ont également montré que la vasoconstriction au niveau des artères pulmonaires isolées en réponse à l'hypoxie

aiguë est indépendante de la concentration intracellulaire du calcium, et que l'activation de la voie RhoA/ROCK pourrait être liée aux médiateurs dérivés de l'endothélium (Robertson et al., 2003).

De nombreuses études ont par la suite montré que la vasoconstriction pulmonaire dépendante de la participation de la voie RhoA/ROCK est essentiellement associée aux divers médiateurs vasoactifs, comme l'ET-1, le TXA₂, la 5-HT et l'Ang II (Barman, 2007; Martin et al., 2004; Nguyen Dinh Cat and Touyz, 2011; Weigand et al., 2006), dont la plupart sont surexprimés à cause du dysfonctionnement endothélial au cours du développement de l'HTP (Farber and Loscalzo, 2004).

IV.3.2 La voie RhoA/ROCK et les modèles animaux d'HTP

La participation de la voie RhoA/ROCK dans l'HTP a été mise en évidence dans différents modèles animaux (Oka et al., 2008). La plupart des études ont utilisé les modèles animaux d'HTP induite par l'hypoxie chronique ou par l'injection de la monocrotaline (MCT) (Guilluy et al., 2005; Homma et al., 2007; Jiang et al., 2007; Tawara et al., 2007; Xu et al., 2010a; Zhao et al., 2009). Récemment, l'activation de la voie RhoA/ROCK a été également montrée dans l'HTP induite par la bléomycine non seulement chez des souris adultes mais aussi chez des rats nouveau-nés (Hemnes et al., 2008; McNamara et al., 2008). De plus, Oka *et al* ont montré les rôles des ROCK dans l'HTP induite par l'hypoxie chronique plus une injection d'un inhibiteur du récepteur de VEGF (SU5416), qui entraîne l'HTP occlusive sévère chez des rats (Oka et al., 2007). D'autres études ont trouvé l'activation de la voie RhoA/ROCK dans l'HTP induite par le haut débit vasculaire « shunt » chez des rats (Li et al., 2007).

Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans les modèles animaux d'HTP et les effets des inhibiteurs des ROCK dans les modèles animaux d'HTP est respectivement présentés dans le **Tableau 3** et le **Tableau 4**.

Tableau 3. Rôle de la voie RhoA/ROCK dans les modèles animaux d’HTP (Duong-Quy et al., 2012a).

Authors, Year	PH model	Involved role of Rho-kinase signaling in PH
(Li et al., 2010)	MCT-induced PH in rats	PASMCs proliferation mediated by ADMA
(Desbuard et al., 2009)	Hypoxic associated with discontinued dexfenfluramine-induced PH in rats	PH due to discontinuation of anorexia
(Gien et al., 2008)	Partial ligation of the ductus arteriosus in utero (PPHN) sheep	Impaired angiogenesis ; downregulated eNOS and NO
(Homma et al., 2008)	MCT-induced PH in pneumonectomized rats	PH mediated by HMG-CoA reductase and cleaved caspase-3
(McNamara et al., 2008)	CH- and Bleomycin-induced PH in rats	Vasoconstriction
(Hemnes et al., 2008)	Bleomycin-induced PH in rats	ROS-mediated lung fibrosis And NOS uncoupling
(Homma et al., 2007)	CH-induced PH in rats	Vasoconstriction in response to KCl mediated by ET-1 and 5-HT
(Barman, 2007)	CH-induced PH in rats	ET-1-induced vasoconstriction
(Oka et al., 2007)	Severe occlusive PAH in rats	Angioproliferation in pulmonary arterioles ; vasoconstriction
(Li et al., 2007)	High flow-induced PH in rats	Vascular remodeling
(Nagaoka et al., 2006)	PH of Denver FHR	Sustained vasoconstriction
(Khan et al., 2005)	MCT-induced PH in rats	NA-induced PA contraction
(Nagaoka et al., 2004)	CH-induced PH in rats	Vasoconstriction

MCT, monocrotaline ; PH, pulmonary hypertension; ADMA, asymmetric dimethylarginine ; PASMCs, pulmonary arterial smooth muscle cells ; iPAH, idiopathic pulmonary arterial hypertension ; ROS, reactive oxygene species ; 5-HT, serotonin ; PPHN, persistent pulmonary hypertension of the newborn ; CH, chronique hypoxia ; ET-1, endothelin-1 ; FHR, fawn hooded rat ; NA, noradrenalin.

Tableau 4. Effets des inhibiteurs des ROCK dans les modèles animaux d’HTP (Duong-Quy et al., 2012a).

Authors, Year	PH model	Rho-kinase inhibitors (daily dose)	Effect of Rho-kinase inhibitors
(Vanderpool et al., 2011)	CH-induced PH in mice	Y-27632 ($10^{-5}M$, isolated mouse lungs)	Decreased : PA impedance, diameter of main PA, and right PA compliance
(Dai et al., 2011)	Left-ventricular dysfunction-induced PH in rats	Fasudil (30 mg/kg)	Improved : mPAP, RV hypertrophy, PA medial thickness
(Xu et al., 2010b)	CH-induced PH in juvenile rats	Y-27632 (15 mg/kg)	Attenuated : RV hypertrophy, PA wall remodeling ; normalized : RVSF
(Dahal et al., 2010)	MCT-induced PH in rats ; CH-induced PH in mice	Azaindole-1 (10-30 mg/kg)	Improved : RVSP, TPR, RV hypertrophy ; anti-PASMC proliferation
(Mouchaers et al., 2010)	MCT-induced PH in rats	Fasudil (40 mg/kg)	Reduced : mPAP, PVR, RVSP, RV hypertrophy
(Ziino et al., 2010)	CH-induced PH in neonatal rats	Y-27632 (10 mg/kg) Fasudil (20 mg/kg)	Attenuated : hemodynamic and structural changes
(McNamara et al., 2008)	CH- and bleomycin-induced PH in rats	Y-27632 (15 mg/kg) Fasudil (30 mg/kg)	Normalized : PVR (PH refractory to NO)
(Tawara et al., 2007)	MCT-induced PH in rats	Fasudil (30 mg/kg) associated with Beraprost sodium	Decreased : mPAP, RV hypertrophy, medial thickening (synergistic effect)

(Oka et al., 2007)	Severe occlusive PAH in rats	Fasudil (10 mg/kg, intravenous administration)	Decreased : RVSP, vasoconstriction Increased : CO
(Jiang et al., 2007)	MCT-induced PH in rats	Fasudil (10-30 mg/kg)	Reduced : mPAP
(Girgis et al., 2007)	CH-induced PH in rats	Simvastatine (non selective inhibitor)	Reduced : mPAP, RV hypertrophie, medial thickening
(Li et al., 2007)	High flow-induced PH in rats	Fasudil (30 mg/kg)	Suppressed : PASMC proliferation Attenuated : RV hypertrophy
(Abe et al., 2006)	CH-induced PH in mice	Fasudil (100 mg/kg)	Improved : mPAP, RV hypertrophie, eNOS expression
(Nagaoka et al., 2006)	PH of Denver FHR	Fasudil (30 mg/kg)	Reduced : elevated PAP Improved : alveolarization vascularization
(Guilluy et al., 2005)	CH-induced PH in rats	Fasudil (30 mg/kg)	Reduced : PAP, RV hypertrophy
(Nagaoka et al., 2005)	CH-induced PH in rats MCT-induced PH in rats	Y-27632 (30 mg/kg) inhaled Y-27632 and fasudil	Decreased : mPAP
(Fagan et al., 2004)	CH-induced PH in mouses	Y-27632 (30 mg/kg)	Decreased : RVSP, RV hypertrophie
(Abe et al., 2004)	MCT-induced PH in rats	Fasudil (30-100 mg/kg)	Improved : survival, RVSP, RV hypertrophie, medial thickening, endothelial dysfunction

PH, pulmonary hypertension ; CH, chronic hypoxia ; PA, pulmonary artery ; SMCs, smooth muscle cells ; MCT, monocrotaline ; RV, right ventricle ; RVSF, right ventricular systolic function ; RVSP, right ventricular systemic pressure ; mPAP, mean pulmonary arterial pressure ; TPR, total pulmonary resistance ; PVR, pulmonary vascular resistance.

Nagaoka *et al* ont montré que l'administration aiguë de Y-27632 ou du fasudil entraîne une vasodilatation et diminue la RVP chez des rats ayant une HTP induite par l'hypoxie chronique (Nagaoka et al., 2004). Hyvelin *et al* et McNamara *et al* ont confirmé que la vasoconstriction liée à l'activation de la voie RhoA/ROCK joue un rôle essentiel dans l'HTP induite par l'hypoxie chronique chez des rats adultes ou nouveau-nés (Hyvelin et al., 2005; McNamara et al., 2008). Les mêmes observations ont été trouvées chez des rats ayant une HTP induite par la MCT (Jiang et al., 2007) ou par la bléomycine (McNamara et al., 2008). Dans ces études, l'administration aiguë de Y-27632 ou du fasudil diminue la vasoconstriction pulmonaire, la RVP et la PAPm. Ces études suggèrent que l'HTP de ces modèles animaux est principalement associée à la vasoconstriction persistante dépendante de l'activation de la voie RhoA/ROCK. Ces résultats correspondent aux changements histopathologiques des vaisseaux pulmonaires où l'épaississement de la paroi vasculaire (souvent lié à l'hypertrophie de la média) ne diminue que de façon marginale la lumière des artérioles pulmonaires dans l'HTP induite par la MCT ou l'hypoxie chronique (Howell et al., 2004; van Suylen et al., 1998). Ainsi Crossno *et al* ont montré que la rosiglitazone, un agoniste du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*), diminue le remodelage vasculaire pulmonaire sans pour autant inhiber le développement de l'HTP induite par l'hypoxie chronique chez le rat. Cependant, l'administration aiguë du fasudil normalise immédiatement la PAPm dans cette même étude (Crossno et al., 2007).

Par rapport aux modèles discutés ci-dessus, où il n'y a pas de diminution significative de la lumière vasculaire pulmonaire, l'administration aiguë du fasudil, en revanche, ne peut pas complètement normaliser la PAPm des rats ayant subi une double agression causée par l'hypoxie chronique associée à une injection d'un inhibiteur du récepteur de VEGF (SU5416) (Oka et al., 2007). En plus de la musculation artérielle pulmonaire, les lésions obstructives du néointima se développent chez des rats soumis à l'hypoxie chronique et à des injections du SU5416

ou chez des rats ayant subi une pneumonectomie et des injections de MCT (Nishimura et al., 2002; Taraseviciene-Stewart et al., 2001). Dans ce cas-là, l'augmentation de la PAPm consécutive à des lésions obstructives vasculaires ne peut plus être complètement normalisée par l'administration aiguë du fasudil (Oka et al., 2007). En revanche, un traitement préventif par le fasudil améliore les lésions obstructives vasculaires et inhibe le développement de l'HTP chez des rats ayant subi une pneumonectomie associée à des injections de MCT (Homma et al., 2008).

Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans le remodelage vasculaire pulmonaire de l'HTP a été mis en évidence dans divers modèles expérimentaux. Guilluy *et al* ont montré que le traitement chronique avec le fasudil réduit la PAPm, l'hypertrophie du ventricule droit (VD) et le remodelage vasculaire pulmonaire chez des rats ayant une HTP induite par l'hypoxie chronique (Guilluy et al., 2005). Chapados *et al* ont montré que le traitement chronique avec le fasudil diminue l'épaississement de la média vasculaire pulmonaire des rats ayant reçu des injections de MCT, empêche la formation des filaments d'actine et réduit l'expression de la *tenascin-C*, une protéine de MEC (Chapados et al., 2006). Chez des rats ayant une HTP induite par le haut débit vasculaire, la diminution du remodelage vasculaire pulmonaire, par un traitement chronique avec le fasudil, est associée à une diminution de la prolifération des CML et à une augmentation de l'apoptose des CML (Li et al., 2007).

De nombreuses études ont par ailleurs disséqué les interactions entre l'activité de la voie RhoA/ROCK et d'autres médiateurs vasoactifs dans l'HTP, tels que l'ET-1, la 5-HT et la voie du NO. Selon une étude précédente, l'ET-1 et la 5-HT sont tous les deux impliqués dans l'activation de la voie RhoA/ROCK comme cela a été montré à partir d'expériences *ex vivo* (poumon isolé perfusé ou artères pulmonaires isolées) provenant de rats exposés à l'hypoxie chronique (Homma et al., 2007). La vasoconstriction pulmonaire au cours de l'HTP induite par l'hypoxie chronique est due à une activation de la voie RhoA/ROCK *via* l'ET-1 (Barman, 2007). Le rôle de la 5-HT dans l'activation de la voie RhoA/ROCK dans l'HTP a été également mis en évidence (Guilluy et al., 2009). Les autres recherches ont montré

que l'activation de la voie RhoA/ROCK dans l'HTP est accompagnée d'une altération de la voie du NO. Ainsi, l'inhibition de la survenue d'une HTP par le traitement avec le Y-27632 ou le fasudil est associée à une diminution de la musculation des artères pulmonaires distales liée à une augmentation de l'expression de NOS-3 dans le tissu pulmonaire (Abe et al., 2006; Fagan et al., 2004). Par ailleurs, le traitement avec le sildenafil, un inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5 (PDE-5), inhibe l'activité de la RhoA en empêchant sa translocation à la membrane cellulaire, et améliore l'HTP induite par l'hypoxie ou par la bléomycine (Guilluy et al., 2005; Hemnes et al., 2008).

IV.3.3 La voie RhoA/ROCK et les malades porteurs d'HTP

Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de l'HTP est relativement bien étudié dans divers modèles animaux. En revanche, sa place dans l'HTP chez l'homme commence à peine à être explorée. La première étude chez l'homme réalisée en 2009 a montré que l'activité de la voie RhoA/ROCK est augmentée dans les tissus pulmonaires et les CML des artères pulmonaires en culture provenant des patients porteurs d'une HTAP idiopathique (Guilluy et al., 2009). L'activation de la voie RhoA/ROCK est associée à la 5-HT ainsi que le transporteur de 5-HT (5-HTT), en favorisant une sérotonylation de la RhoA, qui contribue également à la prolifération des CML des artères pulmonaires ainsi que l'activation plaquettaire. De plus, Do.e *et al* ont montré une augmentation de l'activité des ROCK non seulement dans les tissus pulmonaires, mais aussi dans les neutrophiles circulants des patients atteints d'HTP (Do e et al., 2009). Ces auteurs ont aussi trouvé une corrélation entre l'activité de la voie RhoA/ROCK et la sévérité de l'HTP. Dans cette étude, il y avait aussi une diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante, ainsi qu'une augmentation de la vasoconstriction artérielle pulmonaire endothélium-indépendante associée à l'activation de la voie RhoA/ROCK en réponse à la 5-HT *ex vivo*.

L'effet bénéfique des inhibiteurs des ROCK dans le traitement de l'HTP observé dans différents modèles animaux encourage les chercheurs à évaluer

davantage son effet thérapeutique chez les patients atteints d’HTP (**Tableau 5**).

Tableau 5. Effets des inhibiteurs des ROCK chez les patients atteints d’HTP (Duong-Quy et al., 2012a).

Authors, Year	Patients	Rho-kinase inhibitors	Effect of Rho-kinase inhibitors
(Fujita et al., 2010)	Patients with PAH (iPAH, aPAH, PAH due to LHD)	Fasudil (inhalation : 30mg/10 min)	Decreased : mPAP, PVR/SVR
(Li et al., 2009)	Left-to-right shunt-induced PH	Fasudil (intravenous administration : 30mg/30min)	Decreased : PASP, PVR, PVR/SVR Increased : CI
(Ishikura et al., 2006)	Patients with PAH (iPAH, aPAH)	Fasudil (intravenous administration : 30mg/30min)	Decreased : mPAP, TPR Increased : CI
(Fukumoto et al., 2005)	Patients with severe PAH	Fasudil (intravenous administration : 30mg/30min)	Decreased : mPAP, PVR Increased : CI

PAH, pulmonary arterial hypertension ; iPAH, idiopathic PAH ; aPAH, associated PAH ; LHD, left heart disease ; mPAP, mean pulmonary arterial pressure ; TPR, total pulmonary resistance ; PVR, pulmonary vascular resistance ; SVR, systemic vascular resistance ; PASP, pulmonary arterial systolic pressure ; CI, cardiac index.

Le premier essai clinique a été rapporté par Fukumoto *et al.*, dans lequel 9 patients atteints d’HTP sévère (âge moyen de 53 ans) ont été étudiés (Fukumoto et al., 2005). Les résultats montrent qu’une administration unique par voie intraveineuse de fasudil (i.v. 30 mg/30 minutes) entraîne une légère diminution de la PAPm et une augmentation de l’index cardiaque (IC) chez des patients, mais ces variations n’ont

pas atteint le seuil de significativité statistique. Cependant, le fasudil entraîne une diminution significative de la RVP sans changer la pression artérielle systolique. Plus tard, Ishikura *et al* ont rapporté les résultats d'un autre essai clinique sur l'effet de fasudil intraveineux avec la même posologie (i.v. 30 mg/30 minutes) dans un groupe de 8 patients féminins (âge moyen de 41 ± 11 ans) atteints d'HTP de groupe 1 (Ishikura et al., 2006). Ces auteurs ont montré que le traitement avec le fasudil non seulement diminue la RVP, mais aussi améliore la PAPm et l'IC de façon significative. La différence entre les résultats des 2 essais cliniques pourrait être liée à la différence de la sévérité de l'HTP ainsi que le traitement concomitant avec les autres vasodilatateurs chez ces patients. Les résultats de ces 2 essais cliniques laissent entrevoir l'effet bénéfique du fasudil dans le traitement de l'HTP chez l'homme.

Plus récemment, l'effet bénéfique du fasudil a été également montré chez les jeunes patients (12 patients, âge moyen de 12.3 ans) atteints d'HTP associée à une cardiopathie congénitale (Li et al., 2009). Dans cet essai clinique, l'administration de fasudil (i.v. 30 mg/30 minutes) a significativement amélioré les paramètres hémodynamiques, tels que la PAPm, la RVP et l'IC. En outre, Fujita *et al* ont montré que l'inhalation aiguë de fasudil (30 mg/10min) induit également un effet bénéfique chez des patients (âge moyen de 45 ± 4 ans) atteints d'HTP de groupe 1, en diminuant significativement la PAPm et le ratio RVP/RVS (résistance vasculaire pulmonaire/ résistance vasculaire systolique) (Fujita et al., 2010).

Jusqu'aujourd'hui, l'effet du fasudil dans le traitement de l'HTP chez l'homme est limité à l'administration aiguë par voie intraveineuse ou par inhalation. Cependant, l'effet du fasudil à long terme ainsi que la combinaison de celui-ci avec d'autres traitements chez les patients atteints d'HTP restent encore à évaluer.

IV.3.4 Mécanismes responsables de l'amélioration de l'HTP par les inhibiteurs des ROCK

Selon les études *in vivo* résumées ci-dessus, l'activation de la voie RhoA/ROCK est essentiellement impliquée dans la physiopathologie de l'HTP dans

différents modèles animaux, mais aussi probablement chez l'homme. Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans le développement de l'HTP est principalement lié à la vasoconstriction persistante, le remodelage vasculaire pulmonaire et la thrombose *in situ*, associés au dysfonctionnement endothélial et à l'inflammation vasculaire pulmonaire (Oka et al., 2008).

Parmi les études *in vivo*, certaines ont montré que la suppression de l'HTP par les inhibiteurs des ROCK est associée à une diminution de l'expression des facteurs de croissance et des marqueurs de la prolifération cellulaire, de la production de MEC et de l'infiltration des cellules inflammatoires. Il reste néanmoins difficile de tirer une conclusion à partir de ces études *in vivo*, et de savoir si les effets protecteurs des inhibiteurs des ROCK contre le remodelage vasculaire pulmonaire sont directement liés à une inhibition de la voie RhoA/ROCK agissant sur les mécanismes de remodelage tissulaire, ou sont indirectement la conséquence des effets hémodynamiques (vasodilatation artérielle pulmonaire) des inhibiteurs de cette voie. Les études *in vitro* nous permettent de mieux comprendre le mécanisme cellulaire et moléculaire de l'activation (ou de l'inhibition) de la voie RhoA/ROCK dans l'HTP. Ainsi, certaines études *in vitro* ont montré que l'activation de la voie RhoA/ROCK est directement impliquée dans la prolifération et la migration des cellules vasculaires pulmonaires. Par exemple, Liu *et al* ont montré que la prolifération des CML artérielles pulmonaires en réponse à la 5-HT est associée à l'activation de la voie RhoA/ROCK, en favorisant la translocation nucléaire des protéines ERK 1/2 phosphorylées (Liu et al., 2004). Une autre étude réalisée par Li *et al* a montré que l'effet inhibiteur de l'atorvastatine sur la prolifération et la migration des CML artérielles pulmonaires en réponse à la 5-HT est lié à l'inhibition de la translocation de la RhoA vers la membrane cellulaire et à l'inhibition de l'activité des ROCK (Li et al., 2007). De plus, l'activation des substrats de la RhoA, tels que les ROCKs, le PKN et les diaphanous 1 et 2 (*mDia 1* et *mDia 2*) est impliquée dans la transcription des gènes codant les protéines contractiles des CML vasculaires orientant celles-ci vers un phénotype contractile (Deaton et al., 2005; Hinson et al., 2007; Staus et al., 2007).

Cependant, les mécanismes expliquant comment l'activation de la voie RhoA/ROCK peut, d'une part, stimuler la contraction cellulaire, et d'autre part modifier la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la synthèse des protéines de la MEC dans la physiopathologie de l'HTP restent encore à étudier. Il faut aussi remarquer que la voie RhoA/ROCK pourrait être régulée de manière différente au niveau des CML selon le type et la taille des vaisseaux pulmonaires (Bailly et al., 2004). Enfin, même si l'activation de la voie RhoA/ROCK dans les CML vasculaires pulmonaires est déjà relativement bien étudiée, le rôle de la voie RhoA/ROCK dans les CE, les fibroblastes ainsi que dans les lésions néointimales au cours de l'HTP demeure encore peu connu.

V. Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) avec ou sans HTP

V.1 Définition et épidémiologie de la BPCO

La BPCO est un groupe de maladies chroniques, caractérisée par une diminution incomplètement réversible des débits expiratoires, associé à une inflammation chronique pulmonaire et une destruction/réparation anormale de la structure des petites voies aériennes. L'inflammation chronique est caractérisée par une migration des cellules inflammatoires dans les petites voies aériennes, accompagnée d'une prolifération des CML, d'une fibrose des parois des bronchioles et d'une hypersécrétion du mucus, qui contribuent à une obstruction des petites voies aériennes. Il s'agit principalement de la bronchite chronique, avec l'obstruction des petites voies aériennes, et l'emphysème, avec une distension permanente des alvéoles pulmonaires et une destruction des parois alvéolaires. (Barnes, 2000; Rabe et al., 2007; Spurzem and Rennard, 2005).

La prévalence de la BPCO est en augmentation constante depuis 20 ans partout dans le monde. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la BPCO sera la 3^{ème} cause de mortalité (après les cardiopathies ischémiques et les maladies vasculaires cérébrales) en 2020 (Murray and Lopez, 1997). Le tabagisme est la principale cause de la BPCO dont la survenue et la gravité chez un patient donné est modulée par des facteurs génétiques (Mannino and Buist, 2007). On estime que l'augmentation de la mortalité de la BPCO est liée, d'une part, à la diminution de la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires dans les pays développés, et d'autre part, à une augmentation dramatique du tabagisme et de la pollution environnementale dans les pays en voie de développement (Mannino and Buist, 2007).

V.2 HTP associée à la BPCO

V.2.1 Définition et épidémiologie de l'HTP associée à la BPCO

L'HTP associée à la BPCO est classée dans le 3^{ème} groupe des HTP

(Simonneau et al., 2009). Elle est définie par une PAPm supérieure ou égale à 20 – 25 mmHg au repos. La prévalence de l’HTP associée à la BPCO varie entre 20% et 91% en fonction de la définition de l’HTP (PAPm \geq 20 mmHg vs. PAPm \geq 25 mmHg au repos), la sévérité de l’obstruction bronchique mesurée par le VEMS (volume expiré maximal à la première seconde) et la méthode de mesure de la PAPm (échographie vs. cathétérisme cardiaque droit) (Barberà et al., 2003; Shujaat et al., 2012).

La présence de l’HTP dans la BPCO présage une évolution péjorative de la maladie. Dans la plupart des cas, l’augmentation de la PAPm au repos se développe lentement dans la BPCO, avec une altération modérée de la fonction du ventricule droit (VD) et une préservation du débit cardiaque. Néanmoins, l’augmentation transitoire de la PAPm peut atteindre des chiffres importants pendant l’exercice, le sommeil et l’exacerbation chez les patients souffrant de la BPCO (Abraham et al., 1969; Coccagna and Lugaresi, 1978; Weitzenblum, 2003; Weitzenblum et al., 1979). Depuis l’oxygénothérapie à long terme à domicile, la diminution de la PAPm est devenue un élément pronostique fiable dans cette maladie. La survie à 5 ans est seulement de 36% chez des patients avec une PAPm initiale \geq 25 mmHg, ce qui est nettement moindre par rapport aux 62% chez des patients dont la PAPm initiale est inférieure à 25 mmHg (Oswald-Mammosser et al., 1995).

V.2.2 Physiopathologie de l’HTP associée à la BPCO

De nombreux facteurs, dont la vasoconstriction hypoxique, le remodelage vasculaire pulmonaire et le dysfonctionnement endothélial, contribuent au développement de l’HTP dans la BPCO. Le dysfonctionnement endothélial lié au tabagisme est unanimement considéré comme un facteur causal précoce de l’HTP associée à la BPCO (Barberà and Blanco, 2009) (**Fig. 9**).

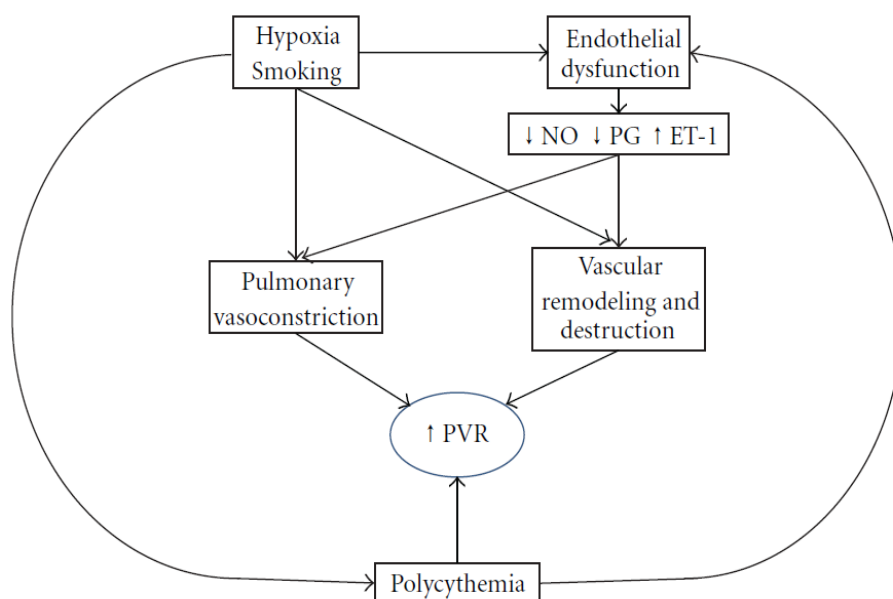


Fig. 9. Mécanismes physiopathologiques de l'augmentation de la RVP dans l'HTP associée à la BPCO (Shujaat et al., 2012).

V.2.2.1 Vasoconstriction pulmonaire hypoxique

Dans la BPCO, la constriction hypoxique des petits vaisseaux pulmonaires est un mécanisme protecteur, qui favorise la redistribution du sang des zones hypoxiques vers les zones normoxiques, afin de maintenir un rapport ventilation/perfusion (V_A/Q) optimal et maintenir la pression partielle de l'oxygène artériel (PaO_2) dans des valeurs physiologiques. Cependant, ce mécanisme protecteur peut être altéré à cause d'une destruction importante des tissus des voies aériennes ou d'un dysfonctionnement endothélial. Par exemple, la contribution de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique semble prépondérante chez des patients atteints de BPCO modéré, à un stade de la maladie où la circulation pulmonaire est encore réactive (Barber et al., 1994, 1996), tandis que la vasoconstriction pulmonaire hypoxique semble jouer un rôle moins important dans la BPCO sévère, où les remaniements tissulaires affectent aussi bien les voies aériennes que les vaisseaux pulmonaires, figeant l'ensemble dans un tissu fibreux rendant difficile toute variation

aigu ë du calibre bronchique et vasculaire (Barber à et al., 1994). De plus, la magnitude de la vasoconstriction hypoxique des artères pulmonaires *in vitro*, provenant de patients atteints de BPCO, peut être altéré lors du dysfonctionnement endothélial (Peinado et al., 2002).

Lorsque l'hypoxie alvéolaire devient chronique avec la progression de l'obstruction bronchique dans la BPCO, la vasoconstriction pulmonaire hypoxique se généralise à l'ensemble du poumon et, au lieu de jouer son rôle protecteur, devient un facteur aggravant et contribue à une augmentation persistante de la RVP et de la PAPm (Shujaat et al., 2012; Stenmark et al., 2006) (**Fig. 9**).

L'oxygénothérapie à long terme est actuellement considérée comme le traitement le plus efficace pouvant ralentir et parfois reverser la progression de l'HTP associée à la BPCO (Vestbo et al., 2012). Cependant, l'oxygénothérapie ne peut pas complètement normaliser la PAPm ni réduire le remodelage vasculaire pulmonaire (Barber à and Blanco, 2009). Les vasodilatateurs non spécifiques (antagonistes des canaux calciques) ou spécifiques de l'HTAP (prostacycline, sildenafil ou bosentan) ne peuvent être utilisés qu'avec prudence dans le traitement de l'HTP associée à la BPCO. Cette prudence est liée aux risques d'aggravation des inégalités ventilation/perfusion consécutive à l'augmentation de la perfusion capillaire des zones alvéolaires non (ou peu) ventilées, et l'hypoxémie qui en résulte (Barber à and Blanco, 2009; Zakyntinos et al., 2011). Ce risque est moindre avec l'utilisation des molécules ayant un effet vasodilatateur pulmonaire prépondérant, comme l'inhalation de NO à faible concentration qui diminue la PAPm sans altérer les échanges gazeux (Adnot et al., 1993). En revanche, l'inhalation de NO à forte concentration certes diminue la PAPm, mais affecte également le rapport V_A/Q et diminue significativement la PaO_2 pour des raisons précédemment invoquées (Barber à et al., 1996). De plus, il n'existe pas aujourd'hui de données systématiques concernant l'efficacité et la sécurité à long terme de l'utilisation de ces médicaments prescrits dans l'HTAP à propos de leur utilisation dans le traitement de l'HTP associée à la BPCO (Barber à and Blanco, 2009).

V.2.2.2 Remodelage vasculaire pulmonaire

Le remodelage vasculaire pulmonaire n'est pas un phénomène tissulaire observé exclusivement au dernier stade (sévère) de la BPCO, étant présent, à des degrés divers, à toutes les phases de la BPCO (Barberà et al., 1994; Hale et al., 1980; Magee et al., 1988; Peinado et al., 1998; Wright et al., 1983). Le remodelage vasculaire pulmonaire au cours de la BPCO est principalement caractérisé par une fibrose de l'intima, une prolifération des CML affectant les petits vaisseaux pulmonaires muscularisés et une néomuscularisation des artérioles pulmonaires (Magee et al., 1988; Wilkinson et al., 1988; Wright et al., 1992). Barberà *et al* ont montré qu'une muscularisation anormale des artérioles ainsi qu'une fibrose significative de l'intima des vaisseaux pulmonaires existent déjà chez des patients atteints de BPCO modéré (Barberà et al., 1994). Plus tard, Peinado *et al* ont montré que ces remodelages vasculaires pulmonaires sont principalement liés à la consommation de tabac, car l'épaississement de l'intima au niveau des petits vaisseaux pulmonaires est déjà présent chez les fumeurs sans BPCO (Peinado et al., 1998). Ces résultats suggèrent que c'est le tabagisme, et non pas l'hypoxie, le facteur prédominant de la phase initiale du remodelage vasculaire pulmonaire au cours du développement de l'HTP associée à la BPCO (Barberà and Blanco, 2009).

V.2.2.3 Dysfonctionnement endothélial

L'endothélium normal joue un rôle important dans la synthèse et la sécrétion de divers médiateurs vasoactifs impliqués dans la régulation de la vasoconstriction et du remodelage vasculaire pulmonaire (Budhiraja et al., 2004). Le NO, synthétisé principalement par la NOS-3 dans les CE, possède des effets vasodilatateurs et antiprolifératifs (Murad, 2006). Tandis que l'ET-1, synthétisé aussi dans les CE, est un puissant agent vasoconstricteur qui possède également des propriétés mitogéniques, notamment sur les CML (Fagan et al., 2001). Dans le développement de la BPCO, le dysfonctionnement endothélial pourrait être consécutif au tabagisme, à l'inflammation chronique et à l'hypoxie. Le dysfonctionnement endothélial aboutit ensuite à une

altération de la production des médiateurs vasoactifs, tels que le NO et l'ET-1, aboutissant à une vasoconstriction pulmonaire anormale et un remodelage vasculaire pulmonaire (Shujaat et al., 2012).

Le dysfonctionnement endothélial apparaît précocement dans le développement de la BPCO, étant déjà présent chez des patients atteints de BPCO modérée ou les fumeurs dont la fonction respiratoire est encore normale (Barberà et al., 1994, 2001; Peinado et al., 1998). La fumée de cigarette contient plus de 4 000 composants dont une majeure partie diffuse à travers la barrière alvéolo-capillaire et passe immédiatement dans la circulation pulmonaire. Le tabac est capable d'induire un stress oxydatif et une inflammation au niveau du poumon (Peinado et al., 1999; Pryor and Stone, 1993). Le dysfonctionnement endothélial lié au tabac pourrait être un événement initial dans la physiopathologie de l'HTP associée à la BPCO (Barberà and Blanco, 2009).

V.3 Monoxyde d'azote (NO) et BPCO

V.3.1 Biosynthèse et métabolisme du NO

Le NO est synthétisé par 3 isoformes de la NO synthase (NOS) à partir de la L-arginine et de l'oxygène moléculaire (O_2) en L-citrulline en présence de ses cofacteurs (NADPH, calmoduline, BH_4 , etc.) (Moncada et al., 1989) (**Fig. 10**). Les 3 isoformes de la NOS, codées par 3 gènes différents localisés sur les chromosomes 7, 12 et 17, diffèrent entre elles par leurs localisations cellulaires, leurs caractéristiques biochimiques et leurs fonctions enzymatiques. La NOS neuronale (NOS-1) et la NOS endothéliale (NOS-3), appartiennent à la famille des NOS constitutives dont l'expression normalement présente à l'état physiologique, permet la synthèse du NO en tant que neurotransmetteur (action de la NOS-1) et en tant que médiateur paracrine endothélial de la vasorelaxation. L'isoforme macrophagique (NOS-2) appartient à la famille des NOS inductibles. Son expression est normalement absente à l'état physiologique, et ne se manifeste que dans les situations pathologiques (**Tableau 6**).

Les principaux métabolites stables du NO retrouvés dans la circulation sanguine sont appelés NO_x qui comprennent les nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-). Lors du stress oxydatif, la formation excessive d'anions superoxydes (O_2^-) entraîne la réaction de ce dernier avec le NO pour former une molécule hautement cytotoxique, l'anion peroxyde nitrite (ONOO^-). A l'état pathologique, la forte production du NO provoque un effet délétère direct sur les tissus attesté par la présence de 3-nitrotyrosine (3-NT), marqueur du stress nitrosatif (Fig. 10).

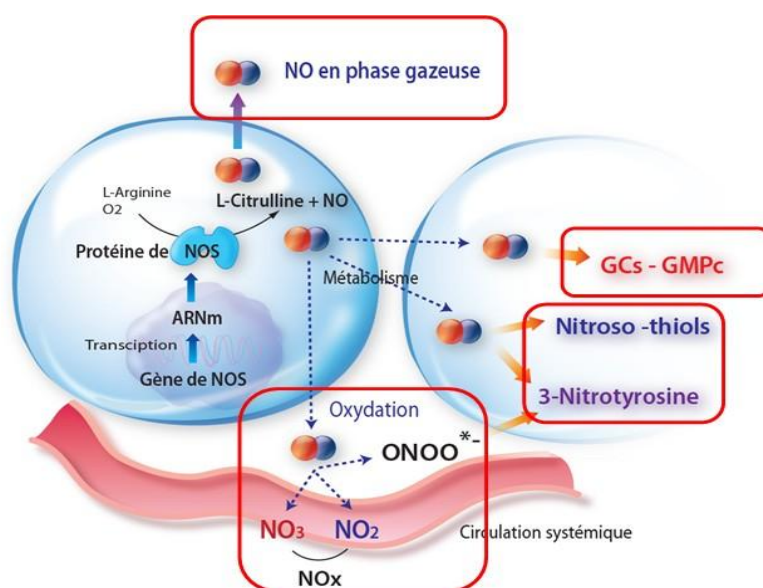


Fig. 10. Biosynthèse et métabolisme principal du NO.

Isoformes	Neuronale (NOS-1)	Inductible (NOS-2)	Endothéliale (NOS-3)
Activité	Constitutive	Inductible	Constitutive
Localisation chromosomique du gène	12q24.2	17cen-q12	7q35-36
Masse moléculaire de la protéine	160 kDa	130 kDa	140 kDa
Cellules de l'appareil respiratoire	Neurones, aux alentours des cellules musculaires lisses bronchiques et bronchiolaires	Macrophages, pneumocytes de type II, fibroblastes, Cellules musculaires lisses, chondrocytes, mastocytes, neutrophiles, cellules endothéliales	Cellules endothéliales, cellules épithéliales bronchiques, pneumocytes de type II
Fonction du NO	Neurotransmission	Bactéricidie Tumoricidie	Vasodilatation
Cofacteurs Ca^{++} /Calmoduline	Dépendante	Indépendante	Dépendante
Effecteurs membranaires	Acides aminés neuroexcitateurs	LPS, IL-1 β , TNF α , etc...	Acétylcholine, bradykinine, etc...

Tableau 6. Les trois principales isoformes des NO synthases (NOS).

V.3.2 Rôle du NO dans la relaxation des CML et la prolifération cellulaire

Une fois synthétisé, le NO diffuse dans les CML vasculaires et active la guanylate cyclase soluble (GCs), qui catalyse la réaction de biosynthèse d'un second messenger nucléotidique intracellulaire, le guanosine monophosphate cyclique (GMPc), à partir de son précurseur, le guanosine triphosphate (GTP). Cette augmentation du GMPc dans les CML active une série de protéines kinases dépendantes de la protéine G (PKG) et déclenche la cascade de signalisation NO/GMPc/PKG, qui régule à différents niveaux les mécanismes de relaxation des CML (Murad, 2006). Ainsi, la PKG, en phosphorylant les molécules cibles, inhibe l'activité de la MLCK et/ou augmente l'activité de la MLCP, et diminue l'interaction entre l'actine et la myosine, ce qui aboutit à la relaxation de la CML. D'autre part, la PKG inhibe la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol, et entraîne une diminution de la concentration intracytosolique de calcium. En même temps, la PKG favorise l'ouverture des canaux potassiques membranaire permettant l'efflux de potassium à l'origine d'une hyperpolarisation membranaire et inhibe la probabilité de l'ouverture des canaux calciques de type L. En diminuant l'entrée de calcium dans les CML, l'activation de la voie de signalisation NO/GMPc/PKG favorise la relaxation de la CML (Griffiths and Evans, 2005). La concentration intracellulaire de GMPc est contrôlée par la PDE-5 qui hydrolyse le GMPc en 5'-GMP inactif (Hanson et al., 1998; Thusu et al., 1995) (**Fig. 11**).

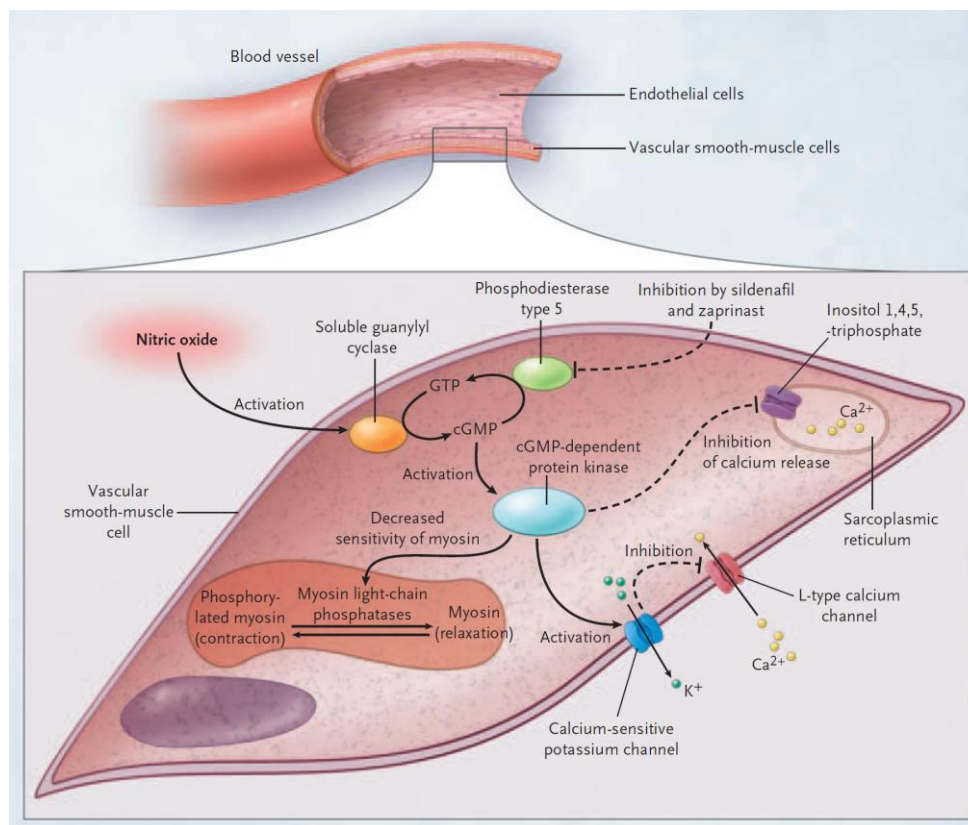


Fig. 11. Mécanisme d'action du NO dans la relaxation des CML vasculaires (Griffiths and Evans, 2005).

Le NO joue aussi un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire. L'effet antiprolifératif du NO est dépendant de la concentration intracellulaire du GMPc, qui interfère avec l'expression et l'activité de diverses protéines du cytosquelette, ainsi que les protéines contrôlant le cycle cellulaire comme les cyclines et les protéines kinases dépendantes des cyclines (Ishida et al., 1997; RayChaudhury et al., 1996). Le NO peut également réguler la prolifération cellulaire par un mécanisme indépendant du GMPc, en inhibant l'activité des récepteurs tyrosine kinase comme les EGF-R (*epidermal growth factor receptor*) exprimés par les fibroblastes (Estrada et al., 1997).

V.3.3 Rôle du NO dans le dysfonctionnement endothélial de la BPCO

Le rôle du NO dans le dysfonctionnement endothélial a été mis en évidence

non seulement dans la BPCO sévère (Dinh-Xuan et al., 1991), mais aussi dans la BPCO modérée (Peinado et al., 1998, 1999) ou chez des fumeurs dont la fonction respiratoire est normale (Barberà et al., 2001; Duong-Quy et al., 2011). Il existe une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires provenant de patients atteints de BPCO sévère (Dinh-Xuan et al., 1991). De nombreuses études ont par la suite montré l'importance du dysfonctionnement endothélial dont la diminution de l'expression et de l'activité de la NOS-3 est la cause de la réduction de la synthèse et/ou de la biodisponibilité du NO. L'expression de la NOS-3 dans les artères pulmonaires est diminuée non seulement chez les patients atteints d'HTP avec BPCO (Giaid and Saleh, 1995), mais aussi chez les fumeurs avec une fonction respiratoire normale (Barberà et al., 2001; Barua et al., 2001). Barberà *et al* ont aussi trouvé une corrélation entre la diminution de l'expression de la NOS-3 et le dysfonctionnement endothélial des artères pulmonaires des fumeurs non atteints de BPCO (Barberà et al., 2001).

Le tabagisme actif ou passif peut être à l'origine du dysfonctionnement endothélial dans les artères coronaires, pulmonaires et systémiques (Celermajer et al., 1993, 1996). L'exposition à l'extrait de fumée de cigarette (EFC) entraîne une diminution irréversible de l'expression génique et protéique et de l'activité de la NOS-3 dans les CE vasculaires pulmonaires (Su et al., 1998). L'exposition *in vitro* des CE vasculaires pulmonaires à l'EFC entraîne une inhibition de l'activité de la NOS-3 et une diminution de la production et la biodisponibilité du NO dues à une production excessive des ERO et à une altération du métabolisme de l'arginine (Zhang et al., 2006).

Le dysfonctionnement endothélial dans la BPCO, avec une altération de la production des médiateurs vasoactifs, est impliqué dans la modification de l'expression des facteurs de croissance. Ainsi, l'inhibition de la NOS-3 est responsable de la surexpression génique du VEGF au niveau du poumon lors de l'hypoxie (Tuder et al., 1995), ce qui favorise la prolifération cellulaire et aboutit à un remodelage vasculaire pulmonaire dans la BPCO (Santos et al., 2003).

V.4 Endothéline-1 (ET-1) et BPCO

V.4.1 Biosynthèse de l'ET-1

La famille des endothélines (ET) comprend trois peptides de 21 acides aminés, appelés endothéline-1 (ET-1), endothéline-2 (ET-2) et endothéline-3 (ET-3). Ces trois isoformes ne diffèrent entre elles que de quelques résidus d'acides aminés. En revanche, elles se distinguent par leurs profils d'expression tissulaire et par leurs affinités pour les récepteurs de l'ET. Les ET sont synthétisés principalement par les CE mais également les leucocytes, les macrophages, les CML, les cardiomyocytes et les cellules mésangiales (Levin, 1995).

L'ET-1 est l'isoforme prépondérante, tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif. Il provient d'un précurseur, le pré-pro-ET-1, long de 203 acides aminés (**Fig. 12**). Après clivage par des endopeptidases de type furine, le pré-pro-ET-1 est converti en un intermédiaire biologiquement inactif de 38 acides aminés, nommé le pro-ET-1 (ou big ET-1). Le big ET-1 est ensuite clivé par les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE-1, *endothelin converting enzyme-1*) au niveau du pont Trp₂₁-Val₂₂, pour donner l'ET-1₁₋₂₁ biologiquement actif. Cette étape a une importance physiologique essentielle puisque l'efficacité physiologique de l'ET-1 est 100 fois supérieure à celle du big ET-1 (Levin, 1995). Dans les CE, la régulation de la synthèse de l'ET-1 s'effectue au niveau transcriptionnel. Elle peut être induite par l'Ang II, les catécholamines, les facteurs de croissance, l'hypoxie, l'insuline, la thrombine et les contraintes de cisaillement. La synthèse de l'ET-1 est inhibée par le peptide natriurétique, le NO, la prostaglandine E₂ et la prostacycline (**Fig. 12**).

L'ET-1 n'est pas stocké dans les vésicules de sécrétion au sein des CE. Cependant la cascade de réactions aboutissant à la synthèse de l'ET-1 à partir de son précurseur pré-pro-ET-1 s'effectue en quelques minutes, ce qui permet un ajustement très rapide de la production de l'ET-1. L'ET-1 est principalement excrété au pôle basal des CE en regard des CML, suggérant un mécanisme d'action autocrine/paracrine. Sa concentration plasmatique est très faible, de l'ordre de 1-2 pg/ml chez les adultes

sains.

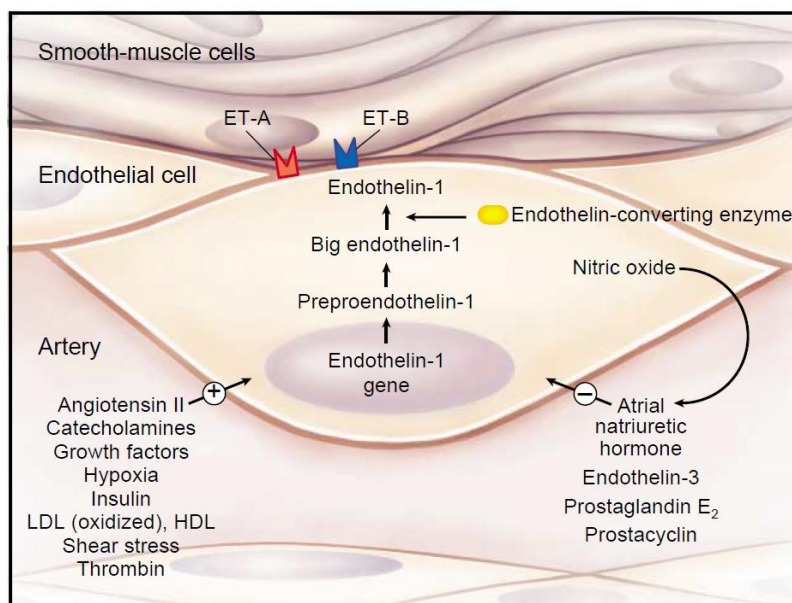


Fig. 12. Biosynthèse de l'ET-1 (Levin, 1995).

V.4.2 Récepteurs de l'ET-1

L'ET-1 exerce ses effets biologiques en se liant à des récepteurs membranaires dont il existe deux types distincts : les récepteurs ET-A et ET-B. Ces deux récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G trimériques. Le récepteur ET-A possède une affinité 10 fois plus grande pour l'ET-1 et l'ET-2 que pour l'ET-3, alors que le récepteur ET-B possède la même affinité pour les trois isoformes de l'ET (Levin, 1995).

Dans les artères pulmonaires, le récepteur ET-A est principalement exprimé à la surface des CML vasculaires tandis que le récepteur ET-B est retrouvé à la fois sur les CE et sur les CML vasculaires. L'activation des récepteurs ET-A et ET-B au niveau des CML active la protéine Gq couplée à la phospholipase C (PLC) entraînant la contraction ainsi que la prolifération des CML (Davie et al., 2002; Haynes et al., 1995; Seo et al., 1994). L'activation des récepteurs ET-B au niveau des CE passe également par la protéine Gq, mais du fait de la dépendance de la NOS-3 vis-à-vis du

calcium, ceci aboutit à la production du NO et accessoirement à celle de la PGI₂, deux puissants vasodilatateurs synthésés par la CE (Hirata et al., 1993) (**Fig. 13**). L'administration par voie intraveineuse de l'ET-1 dans la circulation pulmonaire entraîne une réponse biphasique, commençant par une faible vasodilatation initiale, suivie par une vasoconstriction soutenue. La faible vasodilatation initiale correspond à la libération du NO et de la PGI₂ suite à la stimulation des récepteurs ET-B des CE. La vasoconstriction légèrement retardée correspond à l'activation des récepteurs ET-A et ET-B au niveau des CML (Eddahibi et al., 1993). De plus, les récepteurs ET-B présents à la surface des CE jouent aussi un rôle important dans la clairance de l'ET-1 plasmatique (Dupuis et al., 1996).

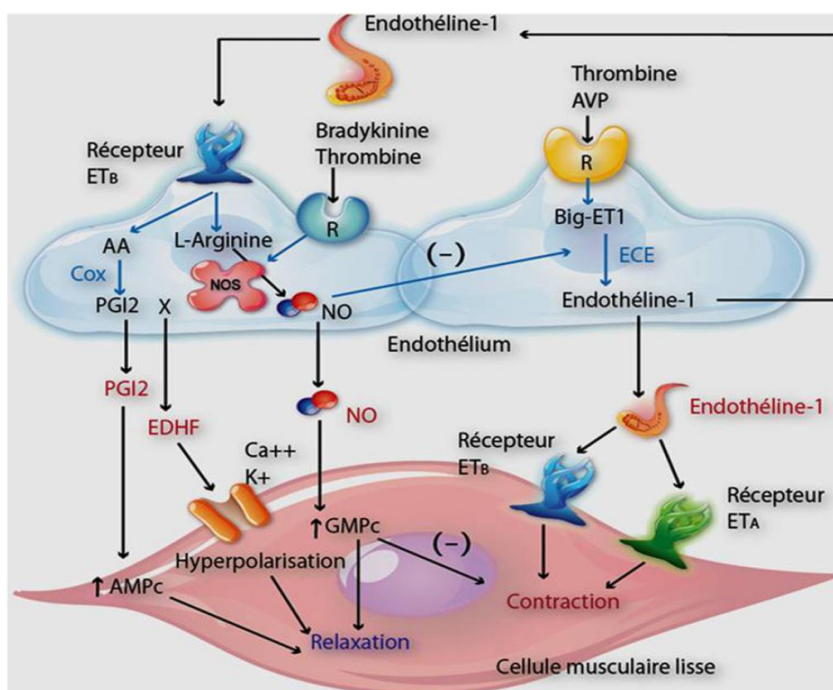


Fig. 13. Récepteurs de l'ET-1 et leurs effets dans la vasoconstriction (Duong-Quy et al., 2012b). Il existe deux types de récepteurs membranaires de l'ET-1 : le récepteur ET-A et le récepteur ET-B. La liaison de l'ET-1 aux récepteurs ET-A et ET-B des CML active la protéine Gq couplée à la PLC entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium, responsable de la contraction des CML. L'activation du récepteur ET-B des CE stimule la vasodilatation par l'intermédiaire de la production du NO et de la PGI₂.

V.4.3 Rôles de l'ET-1 dans la contraction des CML et la prolifération cellulaire

La liaison de l'ET-1 à ses récepteurs ET-A ou ET-B au niveau des CML active la protéine Gq couplée à la PLC (Fig. 14). Cette dernière hydrolyse les phospholipides membranaires, donnant naissance à l'inositol triphosphate (IP₃) et au diacylglycérol (DAG). Par des voies de signalisation intracellulaires différentes, l'IP₃ entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium responsable de la contraction des CML (Levin, 1995), tandis que le DAG stimule l'activité de la protéine kinase C (PKC) membranaire favorisant l'induction de proto-oncogènes c-fos, c-myc et c-jun responsables de la prolifération cellulaire (Clerk et al., 2002; Zamora et al., 1993). *In vitro*, l'ET-1 active la prolifération des CML, stimule la synthèse des protéines de la MEC, et potentialise les effets des facteurs de croissance tels que le TGF- β et le PDGF. L'action mitogénique de l'ET-1 sur les CML des vaisseaux pulmonaires est médiée par les deux types de récepteurs, ET-A et ET-B. Une prolifération excessive et incontrôlée aboutit, dans un deuxième temps, au remodelage des vaisseaux pulmonaires (Davie et al., 2002).

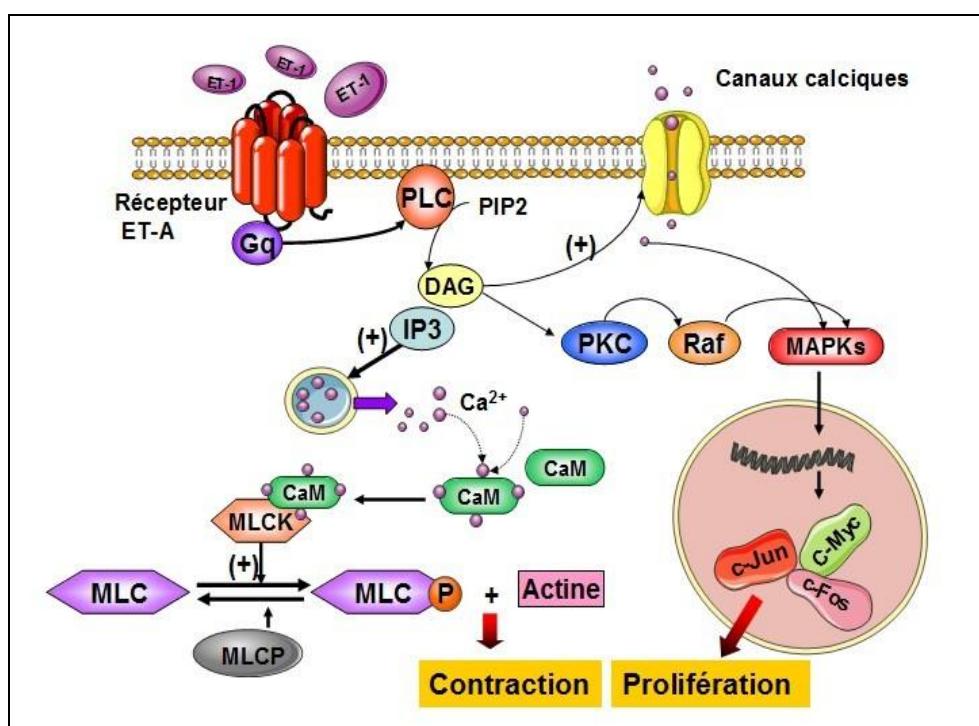


Fig. 14. Rôle de l'ET-1 dans la contraction et la prolifération des CML.

V.4.4 Rôles de l'ET-1 dans le dysfonctionnement endothélial de la BPCO

Le tabagisme étant la principale cause de la BPCO, le rôle de l'ET-1 dans le dysfonctionnement endothélial de la BPCO a été très logiquement étudié dans les modèles animaux ou les CE vasculaires pulmonaires en culture exposés à la fumée de cigarette. De nombreuses études ont montré une augmentation de la production *in vivo* et *in vitro* de l'ET-1 en réponse au tabac. Ainsi, une exposition aiguë ou chronique à la fumée de cigarette entraîne une augmentation importante de l'expression génique et/ou protéique de l'ET-1 au niveau des artères pulmonaires chez les rats ou les cobayes (Wright et al., 2002, 2004). Ce phénomène est également observable dans les CE d'artères pulmonaires humaines ou bovines soumises à l'exposition *in vitro* à l'EFC, avec une surexpression génique de l'ET-1 et une augmentation de la production de l'ET-1 associée à une activation de la PKG (Lee et al., 2001b). La production élevée de l'ET-1 participe non seulement à la vasoconstriction pulmonaire, mais aussi au remodelage vasculaire pulmonaire. Wright *et al* ont constaté que l'augmentation de la PAPm chez des cobayes après exposition chronique à la fumée de cigarette est fortement corrélée avec la surexpression génique et protéique de l'ET-1 ainsi que la musculation des petits vaisseaux pulmonaires (Wright et al., 2006). Très tôt, Sekhon *et al* ont montré que la fumée de cigarette stimule la prolifération cellulaire des petits vaisseaux pulmonaires et des voies aériennes chez des rats (Sekhon et al., 1994). Plus tard, Dadmanesh et Wright ont trouvé que l'effet activateur du tabac sur la prolifération des cellules pulmonaires est significativement réduit par un antagoniste du récepteur ET-A (Dadmanesh and Wright, 1997). De fait, l'effet délétère du tabac se traduit non seulement par une surexpression de l'ET-1, mais aussi par une augmentation de l'expression des récepteurs ET-A et ET-B. Granström *et al* ont montré que l'expression protéique des récepteurs ET-A et ET-B est élevée au niveau des bronches des rats sous l'effet du tabac (Granström et al., 2006). Plus récemment, Milara *et al* ont montré que l'EFC entraîne une surexpression du récepteur ET-B dans les CE des artères pulmonaires humaines qui serait consécutive à une augmentation de la production des ROS et de

l'ET-1, ainsi qu'une contraction excessive de la CE liée à une activation de la RhoA (Milara et al., 2010).

Les données cliniques montrent également l'augmentation de la concentration plasmatique de l'ET-1 chez le sujet tabagique. Ainsi, le tabagisme peut entraîner une élévation transitoire de la concentration plasmatique de l'ET-1 chez les fumeurs (Goerre et al., 1995). Le même phénomène a été trouvé par Haak *et al* (Haak et al., 1994). Par ailleurs, les concentrations plasmatiques et dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) de l'ET-1 sont élevées chez des patients atteints de BPCO avec ou sans HTP (Bacakoğlu et al., 2003). En fait, la concentration plasmatique de l'ET-1 reste plus élevée pendant la journée chez les patients atteints de BPCO que chez les sujets sains, et pourrait augmenter très rapidement suite à une désaturation de l'oxygène pendant le sommeil nocturne (Spiropoulos et al., 2003).

V.5 Rôle de la voie RhoA/ROCK dans le dysfonctionnement endothélial de la BPCO

Jusqu'à présent, la plupart des études ont cherché à déterminer le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la régulation de l'inflammation des voies aériennes, la bronchoconstriction, le remodelage des voies aériennes ainsi que l'exacerbation de la BPCO à cause de l'infection virale dans la BPCO. L'inhibition des ROCK par le Y-27632 favorise la bronchodilatation, réduit l'inflammation des voies aériennes et améliore l'hyperréactivité bronchique (Fernandes et al., 2007). Néanmoins, les données scientifiques sur le rôle des ROCK dans le dysfonctionnement endothélial pulmonaire de la BPCO sont relativement limitées. Schweitzer *et al* ont récemment montré que l'altération de la barrière endothéliale au niveau des CE vasculaires pulmonaires en culture observée lors de l'exposition à l'EFC *in vitro* est dépendante du stress oxydatif et de l'activation de la voie RhoA/ROCK (Schweitzer et al., 2011). Il n'existe pas de preuves directes montrant l'activation de la voie RhoA/ROCK dans le dysfonctionnement endothélial pulmonaire de la BPCO expérimentale due à l'exposition chronique de la fumée de cigarette. En revanche, la régulation de la voie

RhoA/ROCK chez les fumeurs ayant une fonction respiratoire normale a déjà été rapporté.

Noma *et al* ont montré l'existence d'une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, mesurée par le flux sanguin de l'artère brachiale (FMD, *flow-mediated dilation*), chez les fumeurs avec une fonction respiratoire normale (Noma et al., 2005). Chez ces mêmes sujets, l'administration intraveineuse du fasudil améliore significativement la dysfonction endothéliale systémique. Les mécanismes de ce dysfonctionnement ont été dévoilés plus tard par la même équipe, montrant l'augmentation de l'activité des ROCKs dans les leucocytes périphériques (Hidaka et al., 2010). Cette augmentation est liée au tabagisme et elle est corrélée significativement à la diminution de la vasodilatation systémique dépendante du NO chez les fumeurs sains (Hidaka et al., 2010). Plus récemment, notre équipe a trouvé une augmentation de l'expression et de l'activité des ROCK dans les artères pulmonaires des fumeurs sains, associée à une altération de la vasodilatation pulmonaire dépendante de l'endothélium *ex vivo* ainsi qu'une diminution de l'activité de la NOS-3 dans les artères pulmonaires provenant des fumeurs sains (Duong-Quy et al., 2011). Néanmoins, le rôle de la voie RhoA/ROCK dans le dysfonctionnement endothélial des artères pulmonaires des patients atteints de BPCO avec ou sans hypoxémie n'a pas encore été étudié.

La voie RhoA/ROCK peut être activée par les cytokines inflammatoires (IL-6 et *macrophage chemoattractant protein-1*), ou par la fumée de cigarette (Fukumoto and Shimokawa, 2011; Sakai et al., 2011). La fumée de cigarette induit un stress oxydatif avec production excessive des ERO qui participent de manière importante à l'activation de la voie RhoA/ROCK (Noma et al., 2007). Par exemple, Richen *et al* ont montré que la fumée de cigarette, par l'intermédiaire du stress oxydatif associée à une activation de la voie RhoA/ROCK, réduit l'élimination des cellules apoptotiques (Richens et al., 2009).

Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans le dysfonctionnement endothélial est

également lié à son interaction avec la voie du NO et la voie de l'ET-1. Ainsi, l'activation de la voie RhoA/ROCK inhibe l'expression et l'activité de la NOS-3, ainsi que la biodisponibilité du NO (Laufs et al., 1999b; Rikitake and Liao, 2005), alors que l'inhibition des ROCK augmente la stabilité des ARN messagers de la NOS-3 (Laufs and Liao, 1998). Par ailleurs, le NO peut inhiber la RhoA par une réaction de S-nitrosation (Zuckerbraun et al., 2007). L'ET-1, un des agonistes de la voie RhoA/ROCK, peut activer cette voie de signalisation par l'activation des récepteurs ET-A et ET-B (Jernigan et al., 2008). La voie RhoA/ROCK est également impliquée dans l'activation de la transcription du gène codant le pré-pro-ET-1 dans les CE (Hernández-Perera et al., 2000).

VI. Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la fibrose pulmonaire (FP) avec ou sans HTP

VI.1 Définition et épidémiologie de l'HTP associée à la pneumopathie infiltrante diffuse (HTP-PID)

La pneumopathie infiltrante diffuse (PID), ancienne appellation “pneumopathie interstitielle diffuse”, comprend un groupe de maladies hétérogènes possédant des caractéristiques fonctionnelles communes, avec notamment un syndrome restrictif et des troubles des échanges gazeux aboutissant à une fibrose irréversible des structures parenchymateuses pulmonaires (Thannickal et al., 2004; 2000, 2002). La survenue d'une HTP, complication connue et redoutée de la PID, est probablement liée aux mécanismes physiopathologiques communs entre ces deux entités (Behr and Ryu, 2008). L'HTP associée à la PID (HTP-PID) se définit également par une PAPm supérieure ou égale à 25 mmHg au repos, mesurée par cathétérisme cardiaque droit (Simonneau et al., 2009). Les patients atteints d'HTP-PID présentent des symptômes non spécifiques, comme la dyspnée, la fatigue et la limitation à l'exercice, qui existent également dans la PID sans HTP. Ceci est sans doute la raison expliquant la méconnaissance du diagnostic d'HTP-PID qui très souvent n'est découverte qu'au stade de l'insuffisance ventriculaire droite (Battle et al., 1996; Rubin, 2004; Wigley et al., 2005).

Selon la nouvelle classification de l'HTP (Guide Dana Point 2008), l'HTP-PID est classé dans le 3^{ème} groupe, comprenant l'HTP associée aux maladies respiratoires et/ou hypoxémie chronique (Simonneau et al., 2009). La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), les connectivites (surtout la sclérodémie systémique, ScS) et la sarcoïdose sont les causes les plus fréquentes de l'HTP-PID.

VI.1.1 HTP associé à la FP idiopathique (HTP-FPI)

La prévalence de l'HTP dans la FPI varie entre 32% à 84% (Lettieri et al., 2006; Nadrous et al., 2005), en fonction des critères d'inclusion des patients

(incidence ou prévalence), les méthodes diagnostiques (cathétérisme cardiaque droit ou échographie cardiaque), le stade de la maladie (précoce ou avancé) et la sélection de cohortes des patients (dans la liste de transplantation du poumon) (Pitsiou et al., 2011).

Le développement de l'HTP associée à la FPI (HTP-FPI) est associé à un mauvais pronostic (Hamada et al., 2007; King et al., 2001; Lettieri et al., 2006; Nadrous et al., 2005). Lettieri *et al* ont montré que la PAPm élevée est un facteur prédictif important lié à une augmentation de la mortalité chez les patients atteints d'HTP-FPI à un stade avancé (Lettieri et al., 2006). La survie à 5 ans est seulement de 17% chez des patients dont la PAPm est supérieure à 17 mmHg par rapport aux 62 % des patients ayant une PAPm < 17 mmHg (Hamada et al., 2007). Dans cette étude, la PAPm n'est cependant pas un facteur prédictif indépendant et significatif de la survie chez ces patients. La capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DL_{CO}) est le seul facteur prédictif significatif de la survie. La PAPm fournit des informations supplémentaires concernant la gravité de la FP (Hamada et al., 2007). Ces deux études suggèrent également que la PAPm puisse être liée à la gravité de la fibrose. La limitation à l'exercice est augmentée chez les patients atteints d'HTP-FPI modérée ou sévère (Leuchte et al., 2004). Une augmentation de la PAPm constitue également un facteur de risque responsable de la mortalité à 90 jours après transplantation pulmonaire chez des patients atteints de FPI grave (Whelan et al., 2005).

VI.1.2 HTP associée à la sclérodémie systémique (HTP-ScS)

La ScS est une maladie hétérogène du tissu conjonctif, caractérisée principalement par un désordre du système immunitaire, un dysfonctionnement endothélial et une activation anormale des fibroblastes, conduisant à une production excessive du collagène et une fibrose progressive atteignant non seulement la peau mais aussi les organes internes, tels que les appareils gastro-intestinal, cardiaque, rénal et pulmonaire (Jimenez and Derk, 2004). L'atteinte pulmonaire présente deux principales facettes : la FP et l'HTP, qui ensemble représentent la première cause de

mortalité liée à la ScS (Steen and Medsger, 2007).

La prévalence de l'HTP dans la ScS est d'environ 10% à 12% (Condliffe et al., 2009), variant entre 5% et 27% en fonction des critères d'inclusion des patients, les méthodes de mesure de la PAPm et les critères diagnostiques (Koh et al., 1996; Wigley et al., 2005). Par rapport à l'HTAP idiopathique, l'HTP-ScS possède un plus mauvais pronostic, avec un risque de décès 4 fois plus important (Fisher et al., 2006).

Au cours de la ScS, l'HTP est le plus souvent une HTAP appartenant au groupe 1 de la classification de Dana Point (Simonneau et al., 2009). C'est une HTAP isolée, sans PID associée, qui correspond à une maladie vasculaire pulmonaire pure. Lorsqu'une PID est présente, l'HTP-ScS est alors classée dans le groupe 3, correspondant à une HTP associée à des maladies respiratoires et/ou à une hypoxémie chronique (Simonneau et al., 2009). La plupart des auteurs estiment que lorsque la PID est suffisamment importante atteignant plus de 30% du parenchyme pulmonaire et/ou entraînant un syndrome restrictif important aux EFR, avec notamment une capacité vitale forcée (CVF) et/ou une capacité pulmonaire totale (CPT) < 70% des valeurs théoriques, les patients sont le plus souvent classés dans le groupe 3 (Hachulla et al., 2011). Les patients atteints de ScS limitée développent une HTAP isolée environ 10 à 15 ans après le diagnostic initial de la ScS (Steen and Medsger, 2003). Les patients atteints de ScS diffuse ont un risque de développer une PID en moins de 5 ans après diagnostic initial de la ScS, avec la possibilité de développer une HTP concomitante (Steen, 2003).

VI.2 Physiopathologie de l'HTP-PID

La fibrose du parenchyme pulmonaire et le remodelage des vaisseaux pulmonaires partagent les mêmes mécanismes physiopathologiques, ce qui pourrait expliquer la haute prévalence de l'HTP dans la PID (Behr and Ryu, 2008). La physiopathologie de l'HTP-PID n'est pas connue. Le rôle prédominant de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique et la diminution de la densité vasculaire due à l'accumulation du tissu fibrotique dans la physiopathologie de l'HTP-PID a été émis en

question (Nadrous et al., 2005; Ryu et al., 2007; Strange and Highland, 2005). Les nouveaux concepts soulignent l'importance des atteintes vasculaires pulmonaires et le remodelage vasculaire dont l'importance accompagne la progression de la fibrose pulmonaire expliquant la survenue de l'HTP-PID (Farkas et al., 2009; Nathan et al., 2007). Les atteintes vasculaires pulmonaires sont associées à de multiples facteurs humoraux comprenant diverses cytokines, des facteurs de croissance et des médiateurs vasoactifs, et cellulaires de l'appareil respiratoire (cellules épithéliales, CE, CML, fibroblastes, cellules inflammatoires, etc.) (Farkas et al., 2011).

VI.2.1 Physiopathologie et spécificité de l'HTP-FPI

La vasoconstriction pulmonaire hypoxique est un mécanisme bien connu des maladies respiratoires chroniques (Naeije and Barberà 2001), mais les résultats récents ne permettent pas de conforter l'hypothèse d'un rôle prépondérant de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique dans la physiopathologie de l'HTP-FPI (Nadrous et al., 2005; Ryu et al., 2007; Strange and Highland, 2005). Par exemple, Pouwels-Fry *et al* ont trouvé que l'oxygénothérapie n'améliore pas significativement l'augmentation de la PAPm lors de l'exercice chez les patients atteints de FPI, suggérant ainsi un rôle mineur de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique dans les mécanismes contribuant à l'augmentation de la PAPm induite par l'exercice dans la FPI (Pouwels-Fry et al., 2008).

La densité vasculaire varie dans les poumons au cours de la FPI. Il existe une raréfaction des vaisseaux dans les zones pulmonaires où la fibrose est prédominante (Cosgrove et al., 2004; Ebina et al., 2004). Au sein de ces zones, il existe des CE apoptotiques responsables d'une diminution de la surface du lit vasculaire pulmonaire, et donc de l'augmentation de la RVP (Ebina et al., 2004; Renzoni et al., 2003; Tachihara et al., 2006). La raréfaction vasculaire pulmonaire est non seulement liée à une extension du tissu fibrosé mais elle est aussi liée à un déséquilibre entre l'angiogenèse et l'angiostase secondaire à une diminution de l'expression du VEGF et à une augmentation de l'expression du PEDF (*pigment*

epithelium-derived factor) (Cosgrove et al., 2004; Ebina et al., 2004). La néovascularisation due à une surexpression du VEGF, observée dans la FPI de stade précoce ou dans les zones non fibrosées du poumon, a été aussi mise en évidence (Antoniou et al., 2006; Ebina et al., 2004). Ces néovaisseaux sont cependant morphologiquement anormaux, étant caractérisés par une absence de la couche d'élastine qui favorise le développement de l'HTP (Renzoni et al., 2003).

Les phénomènes de remodelage vasculaire pulmonaire dans la FPI sont hétérogènes, allant des lésions de type prolifératif touchant l'intima à l'épaississement de la média, voire l'occlusion complète de la lumière vasculaire associée à une fibrose tissulaire et aux lésions plexiformes (Farkas et al., 2011). Le stress oxydatif, les CE apoptotiques ou les tissus fibrotiques sont capables de produire diverses cytokines comme le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), des facteurs de croissance (TGF- β , CTGF, PDGF, FGF (*fibroblast growth factor*)), les leucotriènes, etc. (Ask et al., 2006; Nathan et al., 2007; Sakao et al., 2006). Ces différents facteurs sont impliqués dans la prolifération cellulaire, le remodelage vasculaire et la fibrose pulmonaire (Pitsiou et al., 2011).

Le dysfonctionnement endothélial joue aussi un rôle fondamental dans la physiopathologie de l'HTP-FPI, en régulant la vasoconstriction, le remodelage vasculaire et la fibrose pulmonaire, avec d'une part une diminution de la production des substances vasodilatatrices et/ou antiprolifératives (NO, prostacycline, PGE₂, etc.), et d'autre part une augmentation de la production des facteurs vasoconstricteurs et prolifératifs (ET-1, Ang II, TXA₂, etc.) (Budhiraja et al., 2004; Farkas et al., 2011; Pitsiou et al., 2011). La GCs peut être inactivée par le stress oxydatif au cours de la FP, aboutissant à la perte de l'effet vasodilatateur et antiprolifératif de la voie de signalisation NO/GCs/GMPc (Evgenov et al., 2006). L'ET-1 participe aussi à la physiopathologie de la FP par ses effets sur la prolifération cellulaire et le déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants (Fonseca et al., 2011). La surexpression de l'ET-1 est détectée dans les lésions plexiformes des patients atteints d'HTP-FPI (Giaid et al., 1993). Les concentrations plasmatiques et dans le LBA de l'ET-1 sont élevées

chez les patients atteints de FPI (Reichenberger et al., 2001; Ugucioni et al., 1995), en relation avec une surexpression de l'enzyme de conversion de l'ET (Saleh et al., 1997). De plus, la concentration plasmatique de l'ET-1 est directement corrélée avec la PAPm des patients atteints de FPI (Trakada et al., 2003). Les mécanismes physiopathologiques de l'HTP-FPI sont résumés dans la **Fig. 15**.

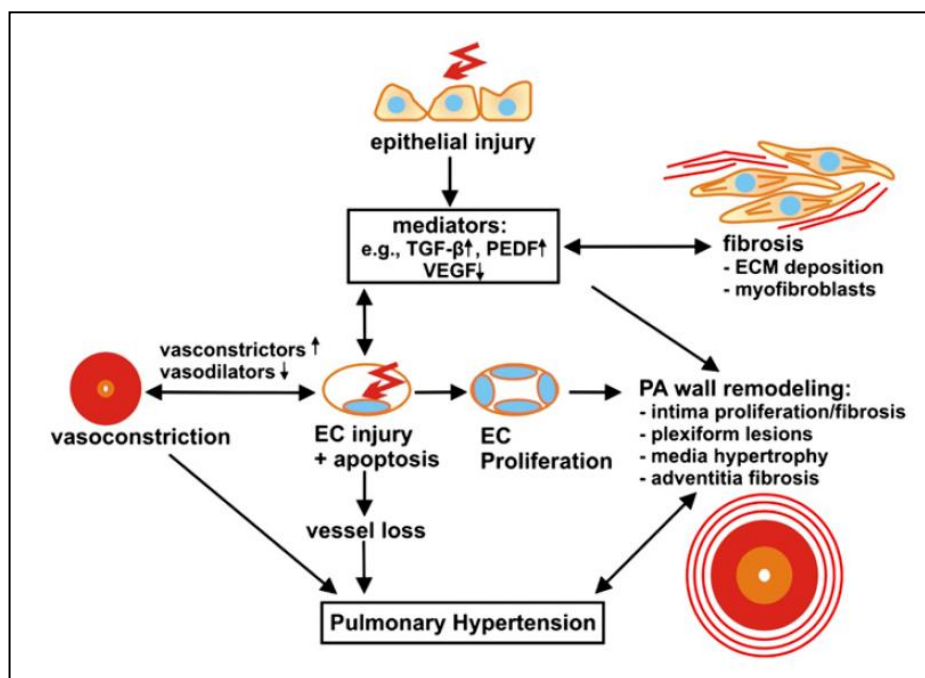


Fig. 15. Physiopathologie de l'HTP associée à la FPI (Farkas et al., 2011). Les agressions sur l'épithélium respiratoire entraînent la production de différents médiateurs, qui sont impliqués dans l'induction de la fibrose, le remodelage vasculaire, l'apoptose et le dysfonctionnement des CE. Parmi ces médiateurs, le TGF-β participe à l'activation des fibroblastes aboutissant à la production excessive du collagène et le dépôt des protéines de la MEC. La surexpression du PEDF ainsi que la diminution de l'expression du VEGF entraînent l'apoptose des CE, responsable d'une diminution de la densité vasculaire. Les CE apoptotiques sont aussi capables de proliférer et de ce fait participer au remodelage vasculaire pulmonaire. De plus, le dysfonctionnement endothélial est impliqué de manière importante dans l'augmentation de la vasoconstriction et le remodelage vasculaire pulmonaire. Enfin, la vasoconstriction, la raréfaction de la densité vasculaire et le remodelage vasculaire pulmonaire contribuent à l'HTP-FIP.

VI.2.2 Physiopathologie et spécificité de l'HTP-ScS

La physiopathologie actuelle de l'HTP-ScS souligne l'importance d'une part du remodelage du parenchyme et des vaisseaux pulmonaires, et d'autre part, de l'interaction entre l'inflammation et l'auto-immunité (Le Pavec et al., 2010).

Le remodelage vasculaire pulmonaire apparaît tôt dans le développement de la ScS, impliquant non seulement les cellules vasculaires pulmonaires (CE, CML, (myo)fibroblastes, etc.), mais aussi les cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes B et T, cellules dendritiques, etc.), le collagène, les autres protéines de la MEC, et les auto-anticorps (Le Pavec et al., 2010) (**Fig. 16**). Ce remodelage se caractérise par une activation / apoptose / prolifération des CE, une prolifération et hypertrophie des CML, un recrutement des cellules inflammatoires, un état procoagulant, une prolifération intimale ainsi qu'une fibrose adventitielle aboutissant à une oblitération vasculaire pulmonaire (Cerinic et al., 2003; Dorfmueller et al., 2007; Sgonc et al., 1996).

L'inflammation joue un rôle fondamental dans la physiopathologie de l'HTP-ScS. Les macrophages, les lymphocytes T et B ainsi que les cellules dendritiques ont été trouvés au niveau des lésions plexiformes (Hassoun et al., 2009). Les rôles des leucocytes, des macrophages et des lymphocytes, initialement décrits dans les lésions vasculaires pulmonaires dans l'HTAP idiopathique (Tuder et al., 1994), sont aussi mis en évidence dans l'HTP associée aux connectivites (Dorfmueller et al., 2007).

Le rôle de l'auto-immunité dans la ScS a été mis en évidence par la présence de nombreux auto-anticorps dans le sérum des patients, tels que les anticorps anti-CE, anti-fibroblastes, anti-récepteurs du PDGF, anti-centromère, anti-topoisomérase 1 et anti-métalloprotéinase matricielle 1-3, etc. (Le Pavec et al., 2010) (**Fig. 16**). Les auto-anticorps circulants jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie de la ScS. Par exemple, les anticorps anti-fibroblastes sont capables d'activer les fibroblastes et induire la synthèse du collagène, contribuant directement à la FP et au remodelage

vasculaire pulmonaire (Tamby et al., 2006). De plus, les anticorps anti-CE sont responsables de l'activation des CE, conduisant à l'apoptose et au dysfonctionnement endothélial (Negi et al., 1998; Nicolls et al., 2005).

L'activation des CE, caractérisée par une surexpression des molécules d'adhésions cellulaires, est responsable d'une angiogenèse anormale reflétée par un niveau plasmatique élevé du VEGF (Choi et al., 2003; Distler et al., 2002). Ce dernier est impliqué dans la formation des lésions plexiformes de l'HTP sévère (Tuder et al., 2001). L'activation et l'apoptose des CE sont considérées comme les événements initiaux dans les atteintes vasculaires au cours de la ScS (Sgonc et al., 1996). Les CE apoptotiques et le dysfonctionnement endothélial produisent ensuite divers cytokines et facteurs de croissance (TGF- β , CTGF, PDGF, etc.) et induisent le déséquilibre des médiateurs vasoactifs (NO, ET-1, etc.), favorisant la survenue de la vasoconstriction pulmonaire, du remodelage vasculaire et de la fibrose pulmonaire (Budhiraja et al., 2004; Farkas et al., 2011; Pitsiou et al., 2011).

Malgré un manque de pouvoir statistique des études sur le fond génétique de la ScS, certains gènes candidats associés à la ScS ont été mis en évidence, tels que les gènes codant le CCL2 (*chemokine ligand 2*, ou *monocytes chemotactic protein-1*, MCP-1), le CD19, le TNF- α , les interleukines (IL-1 α , IL-10), et les facteurs de croissance (CTGF), etc. (Crilly et al., 2003; Fonseca et al., 2007; Huttyrová et al., 2004; Karrer et al., 2005; Tolusso et al., 2005; Tsuchiya et al., 2004) (**Fig. 16**). Aujourd'hui, la connaissance des gènes candidats dans l'HTP-ScS demeure encore imparfaite. Les mutations du gène codant le récepteur II de la protéine morphogénétique osseuse (BMP2, *Bone morphogenetic protein receptor 2*) n'ont pas été détectées dans deux petites cohortes de patients porteurs d'HTP-ScS (Morse et al., 2002; Tew et al., 2002). Par contre, un polymorphisme du gène endoglin associé à l'HTP-ScS a été récemment rapporté (Wipff et al., 2007a), dont les mutations sont déjà bien connues dans la tégangiectasie hémorragique héréditaire (Machado et al., 2009). Cependant, le rôle fonctionnel associé au polymorphisme d'endoglin dans l'HTP-ScS reste encore à être clarifié.

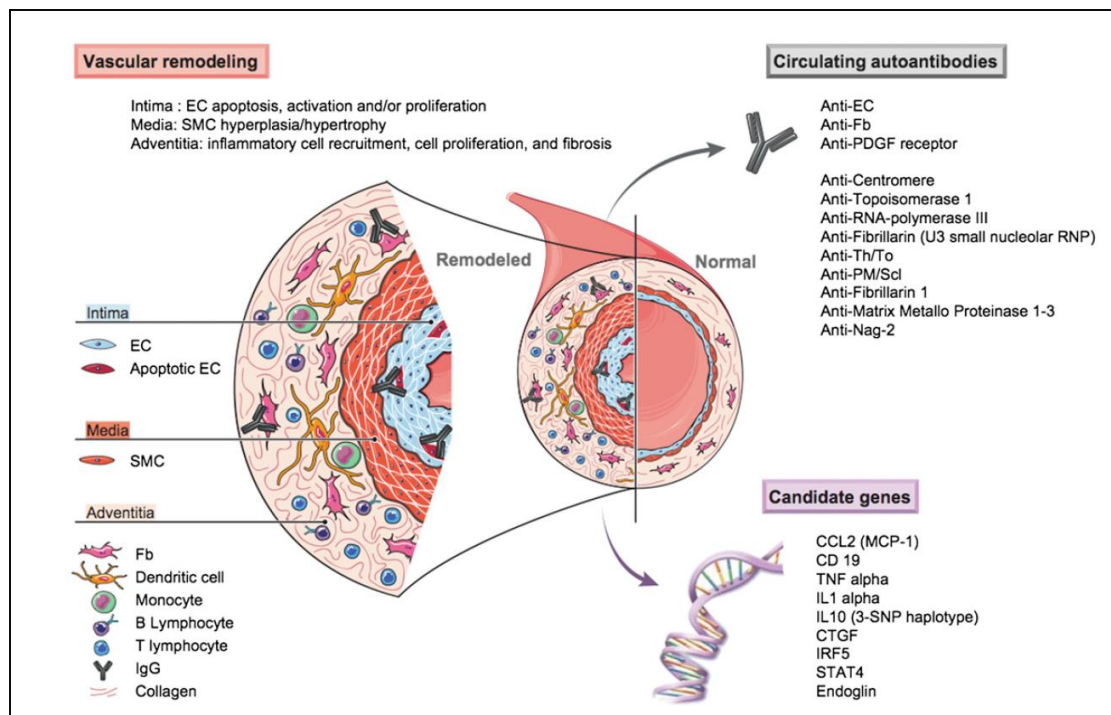


Fig. 16. Physiopathologie de l'HTP associée à la ScS, incluant les atteintes vasculaires, les auto-anticorps circulants et les gènes candidats dans la ScS (Le Pavec et al., 2010).

VI.3 Modèles animaux de FP avec ou sans HTP

VI.3.1 Modèle animal de FPI induite par la bléomycine

VI.3.1.1 Introduction du modèle

Le modèle de FP induite par la bléomycine est un des modèles animaux les mieux connus et les plus utilisés pour étudier la FPI aujourd'hui. La bléomycine est un antibiotique dérivé du fungus *Streptomyces verticillus* (Umezawa et al., 1967). Cet antibiotique a été éprouvé efficace dans le traitement du cancer, tels que les carcinomes épidermoïdes squameux et les tumeurs de la peau (Umezawa, 1974). Néanmoins, son utilisation comme un agent anti-néoplasique est limitée à cause de ses effets délétères pulmonaires dépendants de la dose administrée qui se traduisent par la survenue d'une FP (Muggia et al., 1983). La bléomycine peut induire la FP dans de nombreux espèces

d'animaux (souris, rats, hamsters, cobayes, lapins, chiens et primates) par différentes voies d'administration, telles que la voie intrapéritonéale (ip), intraveineuse (iv), sous-cutanée (sc) ou intratrachéale (it) (Muggia et al., 1983). L'administration intratrachéale de bléomycine (1.25 à 4 U/kg, dose dépendante de la souche) est largement utilisée pour induire la FP chez des rongeurs, grâce à sa facilité à manipuler et reproduire (Phan et al., 1980; Snider et al., 1978; Thrall et al., 1979). Une seule injection intratrachéale de bléomycine entraîne initialement une altération directe de l'épithélium alvéolaire avec une pan-alvéolite neutrophilique et lymphocytaire (Janick-Buckner et al., 1989a), suivie par une activation des fibroblastes et une hyperproduction de la MEC (Moore and Hogaboam, 2008). La bléomycine peut causer un clivage de la chaîne d'ADN (Lown and Sim, 1977) et une surproduction des ERO (Sausville et al., 1976), aboutissant à une réponse inflammatoire, une activation des fibroblastes et enfin une FP par l'intermédiaire de nombreuses cytokines, chimiokines et des facteurs de croissance (Chaudhary et al., 2006).

La bléomycine est inactivée par une enzyme, l'hydrolase de bléomycine (Sebti et al., 1989). L'effet indésirable de la bléomycine sur la fibrogenèse dépend du type de tissu étudié. La quantité de cette enzyme dans les poumons est moindre que dans les autres tissus, expliquant la sensibilité particulière des poumons aux effets toxiques, notamment ceux conduisant à la constitution d'une fibrose pulmonaire (Onuma et al., 1974). De plus, la réponse fibrosante à la bléomycine chez les souris varie selon la souche animale. Les souris C57BL/6 sont plus susceptibles de développer la FP avec la bléomycine que les souris Balb/c, puisque l'expression pulmonaire de l'hydrolase de bléomycine est plus faible chez les souris C57BL/6 (Manali et al., 2011; Schrier et al., 1983a).

VI.3.1.2 Mécanismes physiopathologiques de l'agression pulmonaire par la bléomycine

L'administration intratrachéale de bléomycine induit une réponse inflammatoire et fibrosante au niveau du poumon, entraînant une élévation initiale

des cytokines et des chémozines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- γ , CCL2, CCL12, etc.), suivie par une augmentation des expressions des cytokines pro-fibrosantes (TGF- β , CTGF, PDGF, FGF, etc.). Chez des souris ayant reçu la bléomycine par voie intratrachéale, la transition entre un état inflammatoire et la fibrose pulmonaire apparaît entre le 7^{ème} jour (J7) et le 14^{ème} jour (J14) après l'administration de la substance toxique (Chaudhary et al., 2006). La FP se développe à partir de J7, elle devient plus importante vers J14 à J21 (Izbicki et al., 2002; Manali et al., 2011). Après J28, l'importance de la FP est variable entre les individus et peut même régresser chez certains (Gharaee-Kermani et al., 2005; Izbicki et al., 2002; Lawson et al., 2005; Starcher et al., 1978).

➤ **Cellules inflammatoires**

L'infiltration des cellules inflammatoires associée à la bléomycine intratrachéale commence par une infiltration neutrophilique aiguë, suivie par une transition vers une inflammation chronique avec les macrophages et les lymphocytes (Izbicki et al., 2002). Le recrutement pulmonaire des neutrophiles est très important pendant la phase aiguë inflammatoire (de J3 à J7) et diminue progressivement pendant la phase fibrosante (de J7 à J14), ce qui suggère que le rôle des neutrophiles est moins important dans la constitution de la fibrose que dans l'initiation de la cascade inflammatoire menant à la FP (Izbicki et al., 2002). Les macrophages, en revanche, semblent jouer un rôle important et direct dans la fibrogenèse pulmonaire. Les macrophages sont capables de produire les médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrosants (TGF- β , CTGF, PDGF, etc.) dans la phase précoce de la fibrose (Kovacs, 1991). Ils sont également capables d'induire l'activité chémoattractante des neutrophiles et de stimuler la synthèse du collagène (Izbicki et al., 2002). Les macrophages produisent des ERO via l'activation de la NADPH oxydase et participent à l'hyperproduction de la MEC associée à un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants, notamment concernant les MMP et les TIMP (inhibiteurs des MMP) (Manoury et al., 2005). Le rôle de lymphocytes T dans la réponse fibrosante associée à la bléomycine n'est pas encore clair voire controversé. Les lymphocytes T

sont capables de produire les facteurs chénotactiques et prolifératifs des fibroblastes en stimulant la synthèse du collagène par ces derniers (Hibbs et al., 1983; Johnson and Ziff, 1976; Postlethwaite et al., 1984; Wahl and Gately, 1983). L'infiltration des lymphocytes T et B a été mise en évidence dans les poumons des animaux traités par la bléomycine (Chandler et al., 1983; Thrall and Barton, 1984). Le développement de la FP associée à la bléomycine est diminué chez les souris athymiques (Schrier et al., 1983b). A l'inverse, d'autres études ont montré que la déplétion de certaines sous-populations de lymphocytes T ne prévient pas le développement de la FP chez les souris C57BL/6 traitées par la bléomycine par rapport aux souris témoins (Janick-Buckner et al., 1989b).

➤ **Activation des fibroblastes**

La prolifération et l'activation des fibroblastes sont au centre de la fibrogenèse, régulées par de nombreuses cytokines (IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α , etc.), chémoquinas (CCL2, CCL12, etc.) et facteurs de croissance (TGF- β , CTGF, PDGF, FGF, etc.). L'IL-4, produite principalement par les lymphocytes T ou les mastocytes, stimule la prolifération des fibroblastes, l'expression génique et la synthèse protéique de la MEC (Makhluf et al., 1996; Postlethwaite et al., 1992). L'IL-13 participe aussi à l'activation des fibroblastes par l'intermédiaire du TGF- β (Doucet et al., 1998; Lee et al., 2001a; Oriente et al., 2000). Le CCL2 (ou MCP-1) est un facteur chénotactique des monocytes et des lymphocytes, également impliqué dans le recrutement et l'activation des leucocytes pendant l'inflammation (Leonard and Yoshimura, 1990). Il entraîne une surexpression génique du collagène de type I au niveau des fibroblastes des rats *in vitro*, associée à une activation du TGF- β (Gharaee-Kermani et al., 1996).

➤ **Rôle du TGF- β dans la fibrogenèse pulmonaire**

Parmi de nombreux médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrosants, le TGF- β est un des plus puissants facteurs de croissance jouant un rôle important dans la fibrogenèse tissulaire. Il existe 3 isoformes de TGF- β (TGF- β 1, 2 et 3) encodés par 3 gènes différents, qui sont tous exprimés dans le tissu fibrotique (Letterio and

Roberts, 1998; Schiller et al., 2004). Le développement de la fibrose tissulaire est néanmoins principalement associé au TGF- β 1 (Ask et al., 2008), exprimé dans différents types de cellules (CE, CML, fibroblastes, macrophages et lymphocytes, etc.) (Annes et al., 2003). Le TGF- β est synthétisé sous forme de protéine inactive, nommé latent TGF- β , qui est associée à un peptide LAP (latency-associated peptide). Le clivage du LAP et l'activation du latent TGF- β sont nécessaires pour que le TGF- β puisse s'associer à son récepteur, un complexe hétéromérique de deux récepteurs transmembranaires : le récepteur du TGF- β de type I (T β RI) et le récepteur du TGF- β de type II (T β RII) (Annes et al., 2003). Dès l'association du TGF- β avec le T β RII, un complexe stable avec le T β RI se forme, permettant sa propre transphosphorylation et l'activation des protéines kinases du T β RI (ALK 1-7, *activin receptor-like kinase*), parmi lesquelles la protéine kinase ALK-5 est présente de façon prépondérante dans différents types de cellules et joue un rôle fondamental dans la transduction des signaux intracellulaires du TGF- β 1 (Rahimi and Leof, 2007).

La voie de signalisation du TGF- β est à la fois dépendante et indépendante des molécules Smad (**Fig. 17**).

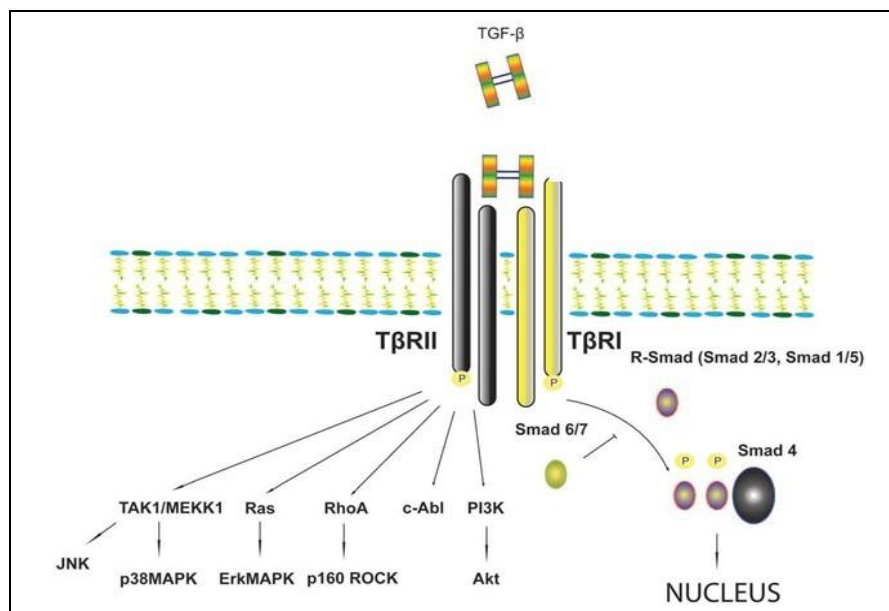


Fig. 17. Voies de signalisation intracellulaires du TGF- β dépendantes et indépendantes des molécules Smad (Biernacka et al., 2011).

Les huit membres de la famille Smad sont regroupés dans trois classes : R-Smad (*receptor-activated Smads*, Smad 1, 2, 3, 5 et 8), Co-Smad (*common mediator Smad*, Smad 4) et I-Smad (*inhibitory Smads*, Smad 6 et 7). Les R-Smad (Smad 2 et 3) sont directement phosphorylés par la protéine kinase ALK-5, puis le phospho-Smad2/3 (pSmad2/3) forme un complexe avec le Co-Smad (Smad 4), dont la translocation dans le noyau permet d'activer ou inhiber la transcription de gènes (Feng and Derynck, 2005; Massagué et al., 2005). Tandis que les I-Smad (Smad 6 et 7) sont des régulateurs négatifs de la voie TGF- β , avec le Smad 7 comme un antagoniste du T β RI, et le Smad 6 comme une molécule compétitive des R-Smad par sa propre association au Co-Smad 4 (Biernacka et al., 2011).

À côté des voies dépendantes de Smad, certains effets du TGF- β passent par les voies de signalisation dites indépendantes de Smad (Derynck and Zhang, 2003). La famille de MAPK comprend une série de protéines kinases (sérine/thréonine) : ERK, p38 et JNK (*c-Jun-N-terminal kinase*). Le TGF- β est capable d'activer toutes ces trois protéines kinases de la famille de MAPK, qui participent ensuite à la régulation de la différenciation, la prolifération, la survie et l'apoptose cellulaire en réponse au stress et aux signaux mitogéniques extracellulaires (Fig. 17). Ces voies de signalisation peuvent aussi interférer avec la voie TGF- β /Smad. Par exemple, la p38MAPK et la JNK potentialisent l'activation de la voie TGF- β /Smad (Furukawa et al., 2003; Yoshida et al., 2005), tandis que la protéine kinase ERK active (Funaba et al., 2002) ou inhibe (Kretzschmar et al., 1999) les Smad en fonction du type cellulaire. Le TGF- β peut également activer la protéine kinase c-Abl (*Abelson nonreceptor tyrosine kinase*), ainsi que la voie PI3 kinase/Akt et la voie RhoA/ROCK (Derynck and Zhang, 2003) (Fig. 17).

Le TGF- β 1 est un régulateur important du phénotype et de la fonction des fibroblastes (Biernacka et al., 2011) (Fig. 18). Les fibroblastes sont activés et différenciés en myofibroblastes, en exprimant les protéines de phénotype contractile (α -SMA), ce qui est associé à l'activation de la voie du TGF- β dépendante (Dobaczewski et al., 2010) ou indépendante des molécules Smad (Bakin et al., 2000;

Liu et al., 2007; Shi-wen et al., 2009; Thannickal et al., 2003). Le TGF- β participe aussi à la transition épithéliale-mésenchyme (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) par l'activation dépendante des Smad (TGF- β /Smad) ou indépendante de ces derniers (ERK, p38MAPK, JNK, RhoA/ROCK ou PI3 kinase/Akt) (Xu et al., 2009). Le TGF- β est aussi impliqué dans la synthèse de protéines de la MEC (collagène de type I et III ou fibronectine) par les fibroblastes (Verrecchia et al., 2001), ainsi que dans la préservation de la MEC par la régulation de l'expression ou de l'activité des MMP et TIMP (Mauviel, 2005; Schiller et al., 2004).

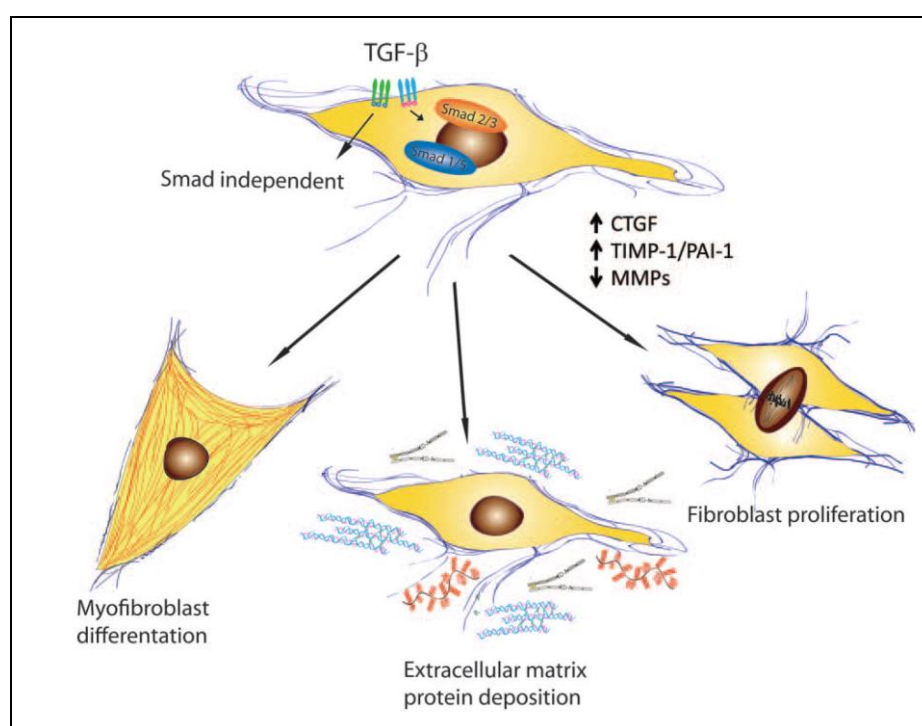


Fig. 18. Principaux effets du TGF- β sur le phénotype et la fonction des fibroblastes (Biernacka et al., 2011).

➤ Les autres mécanismes

Les autres mécanismes physiopathologiques du modèle de FP induite par la bléomycine comprennent le stress oxydatif, le déséquilibre entre MMP/TIMP, l'apoptose des CE, etc. (Yamamoto and Nishioka, 2005). Par exemple, la bléomycine

est capable de provoquer un stress oxydatif via la production des ERO comme l'anion superoxyde et le radical hydroxyle. Ces radicaux libres entraînent des lésions endothéliales, la production de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes, ainsi que la prolifération des fibroblastes et la production du collagène (Falanga et al., 1993; Murrell et al., 1990).

En résumé, la bléomycine induit la réponse inflammatoire et la FP selon différents mécanismes en agissant sur différents types de cellules (cellules épithéliales, CE, CML, (myo)fibroblastes, cellules inflammatoires du sang circulant, cellules du système immunitaire, etc.) Les communications entre ces cellules activées dans ce modèle expérimental se font via un réseau complexe de cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et radicaux libres, aboutissant à l'activation des fibroblastes et enfin la FP (Moeller et al., 2008; Yamamoto and Nishioka, 2005).

VI.3.2 Modèle animal de ScS induite par l'acide hypochloreux (HOCl)

VI.3.2.1 Rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la ScS

Le stress oxydatif survient quand il existe un déséquilibre entre les agents oxydants et antioxydants, en faveur de l'augmentation d'ERO (Dröge, 2002). Le rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la ScS a été mis en évidence par de nombreuses études chez l'homme et dans les modèles murins (Allanore et al., 2004; Herrick and Matucci Cerinic, 2001; Ogawa et al., 2006; Sambo et al., 2001; Servettaz et al., 2007; Simonini et al., 1999). Les fibroblastes cutanés provenant de patients atteints de ScS produisent spontanément de grandes quantités d'ERO, favorisant la synthèse du collagène (Sambo et al., 1999, 2001). Chez les patients atteints de ScS, les auto-anticorps anti-récepteur du PDGF (PDGFR) exprimés par les fibroblastes induisent également la production d'ERO (Baroni et al., 2006). Les sérums des patients atteints de ScS induisent non seulement une augmentation de la production d'ERO par les CE et les fibroblastes *in vitro*, mais aussi une prolifération des fibroblastes et un dysfonctionnement endothélial (Servettaz et al., 2007).

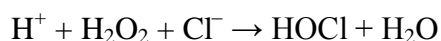
Les ERO produits par les CE et les fibroblastes participent à la physiopathologie de la ScS par plusieurs mécanismes. Les ERO peuvent entraîner une oxydation de l'ADN-topoisomérase-1, associé à une altération de la tolérance à cet auto-antigène nucléaire (Casciola-Rosen et al., 1997; Servettaz et al., 2009). Les ERO peuvent stimuler la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes directement ou indirectement par l'intermédiaire de la voie ADAM-17/Notch (Kavian et al., 2010) ou de la voie TGF- β (Bellocq et al., 1999). Les ERO peuvent aussi stimuler la prolifération des fibroblastes cutanés par l'activation de la voie Ras/ERK1/2, ce qui explique la capacité pro-proliférative *in vitro* des fibroblastes provenant de patients atteints de ScS (Svegliati et al., 2005).

Il a été récemment montré que l'injection intradermique de différents générateurs des ERO peut reproduire les principales caractéristiques de la ScS limitée ou diffuse chez des souris, en fonction de types d'ERO générés (Servettaz et al., 2009). Par exemple, l'acide hypochloreux (HOCl) ou les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) peuvent reproduire des signes semblables à ceux de la ScS diffuse chez des souris, comme la fibrose cutanée, la fibrose pulmonaire et l'atteinte rénale. Tandis que les symptômes provoqués par l'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) ou les peroxynitrites (ONOO^-) sont ceux de la ScS limitée chez des souris, autrement dit une fibrose cutanée isolée (Servettaz et al., 2009).

Par ses propriétés anatomiques et physiologiques, les poumons sont en permanence exposés au stress oxydatif. Les ERO occupent une place primordiale dans la physiopathologie des maladies respiratoires, puisqu'elles sont générées de manière importante par différents types de cellules, en utilisant directement l'oxygène de l'air inspiré dans les poumons. Les principales cellules qui génèrent les ERO dans les poumons sont des cellules inflammatoires phagocytaires (les macrophages et les neutrophiles) ou les cellules non phagocytaires comme les CE et les fibroblastes (Gabrielli et al., 2008).

VI.3.2.2 Caractéristiques biochimiques d'HOCl

L' HOCl , une des principales ERO, est généralement formé dans les polynucléaires neutrophiles ou les macrophages au cours de la phagocytose sous l'effet de la myélo-peroxydase (MPO). Les MPO, libérées lors de l'activation des neutrophiles, sont des enzymes ayant à la fois une activité de peroxydation et de chloration, donnant la formation d' HOCl (Fig. 19).



L' HOCl réagit très vite avec les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) pour donner les radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}). Un autre produit des MPO est le dioxyde d'azote ($\text{NO}_2^{\cdot-}$). Cette molécule peut interagir avec l' HOCl pour former le chlorure de nitrite (NO_2Cl) possédant à la fois la capacité de nitration, d'oxydation et de chloration (Fig. 19).

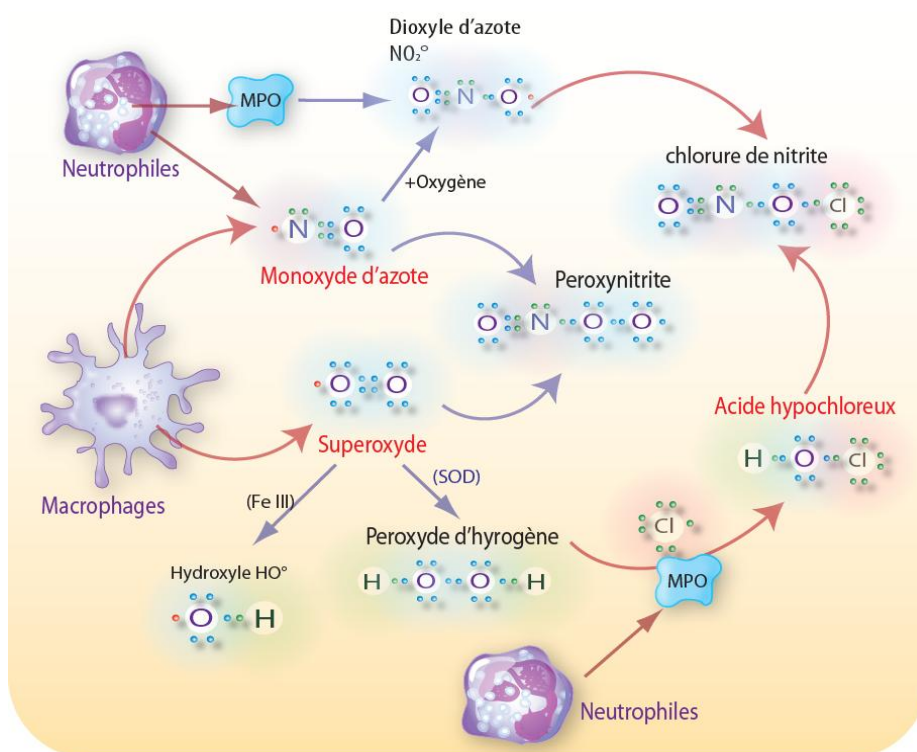


Fig. 19. Formation des ERO : HOCl , $\text{NO}_2^{\cdot-}$ et NO_2Cl .

VI.3.2.3 Phénotypes de la ScS diffuse induite par l'HOCl chez les souris

Un travail récent a montré que l'injection intradermique d'HOCl peut reproduire les symptômes de la ScS diffuse chez les souris Balb/c, en induisant non seulement la fibrose cutanée, mais aussi la fibrose pulmonaire et l'atteinte rénale, accompagnée d'une production d'auto-anticorps anti-ADN-topoisomérase-1 retrouvés dans le sérum des patients atteints de ScS diffuse (Servettaz et al., 2009). De plus, la ScS induite par l'HOCl est observable dans différentes souches de souris, comme les souches Balb/c, C57BL/6, DBA/1 et NZB (Batteux et al., 2011).

Les souris traitées par l'HOCl (injection intradermique, tous les jours, pendant 4 à 8 semaines) développent à la fois une fibrose cutanée (injection pendant 4 semaines) et une fibrose pulmonaire (injection pendant 6 à 8 semaines) (Batteux et al., 2011). Comme chez les souris ayant reçu une injection sous-cutanée de bléomycine, la fibrose cutanée est localisée, elle est limitée aux zones entourant le site d'injection d'HOCl. La peau injectée par l'HOCl contient les myofibroblastes, caractérisés par une surexpression de α -SMA et une production excessive de collagène. L'HOCl augmente le nombre des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4⁺ dans la rate. L'HOCl augmente aussi le niveau sérique des immunoglobulines IgG et IgM, avec une production d'auto-anticorps anti-ADN-topoisomérase-1. Au niveau du poumon, l'analyse immunohistochimique montre une infiltration inflammatoire significative, comprenant principalement les lymphocytes T (Kavian et al., 2010; Servettaz et al., 2009). Dans ce modèle, le dysfonctionnement endothélial apparaît, comme le suggère l'augmentation sérique précoce de l'expression des molécules d'adhésion (sVCAM-1, *soluble vascular cellular adhesion molecule 1* et sE-selectin) chez des souris ayant reçu l'HOCl (Kavian et al., 2012) (Fig. 20).

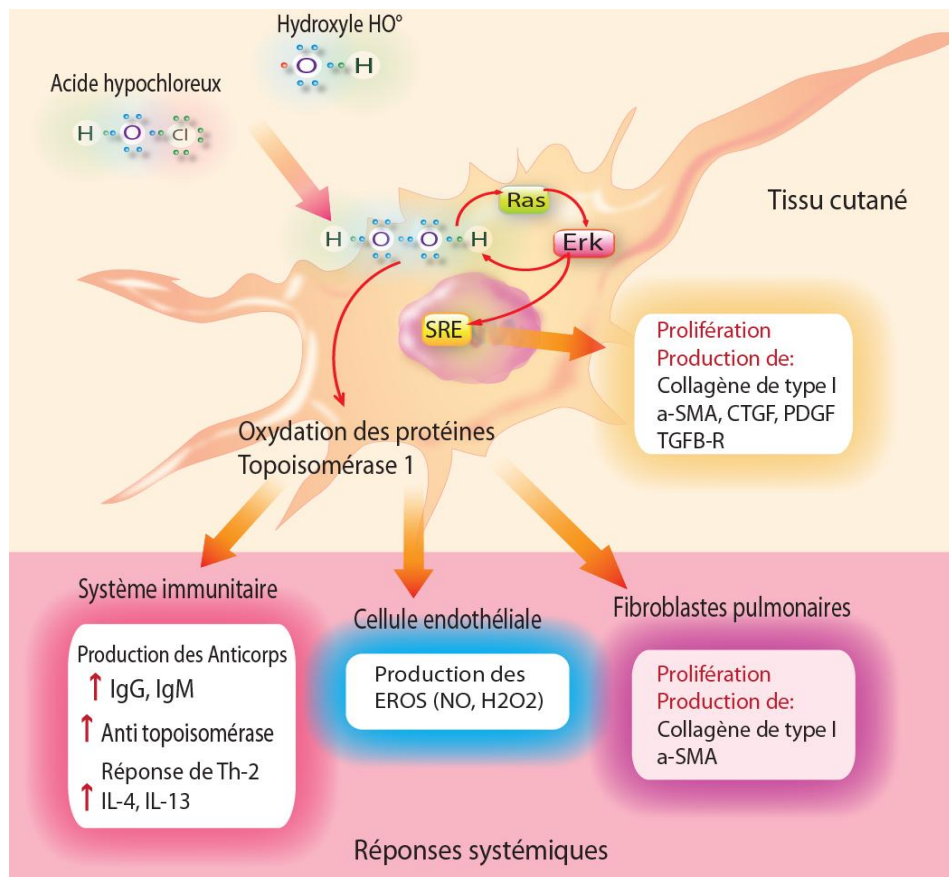


Fig. 20. Phénotypes et mécanismes physiopathologiques de la ScS diffuse induite par l'HOCl chez les souris (Batteux et al., 2011).

VI.3.2.4 Mécanismes physiopathologiques et toxiques d'HOCl

Les mécanismes physiopathologiques du modèle d'HOCl ne sont pas encore bien compris. Cependant, il a été montré que l'injection d'HOCl induit une réponse inflammatoire systémique dans la phase précoce de la ScS et que les ERO jouent un rôle direct dans l'induction de la fibrose locale et systémique, dans le processus auto-immunitaire et dans les atteintes vasculaires (Fig. 20).

L'injection intradermique d'HOCl stimule la production des ERO par les fibroblastes, qui confèrent un phénotype hyperprolifératif aux fibroblastes altérés, en activant la voie Ras et la phosphorylation des protéines kinases ERK1/2. La production des ERO stimule la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes,

qui expriment α -SMA et participent à la production excessive de collagène de type I.

Les ERO sont responsables de l'oxydation de certaines protéines intracellulaires comme l'ADN-topoisomérase-1. La concentration des protéines oxydées dans les sérums des patients ou des souris atteints de ScS reflète la gravité de cette maladie (Fig. 20). De plus, le sérum provenant des souris ayant reçu des injections d'HOCl ou des patients atteints de ScS induit une hyperproduction d' H_2O_2 au niveau des CE ou des fibroblastes *in vitro*. Les protéines oxydées dans ces sérums aggravent le stress oxydant systémique dont l'un des corollaires est l'oxydation de l'ADN-topoisomérase-1.

Le rôle du système immunitaire dans ce modèle a été également mis en évidence. Les souris injectées par l'HOCl présentent dans le sérum des auto-anticorps (ex. auto-anticorps anti-ADN-topoisomérase-1) similaires à ceux des patients atteints de ScS. De plus, le nombre des lymphocytes T et B est plus élevé chez les souris traitées par l'HOCl que chez les souris témoins. Les lymphocytes T (Th2) sont responsables de la production des cytokines pro-fibrosantes comme l'IL-4 et l'IL-13.

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans l'induction de la ScS par l'HOCl. L'expression cutanée de TGF- β est moins importante chez les souris traitées par l'HOCl par rapport aux souris injectées par la bléomycine, alors que l'augmentation de la phosphorylation de Smad2/3 est similaire dans les deux modèles. Ceci pourrait être expliqué par un catabolisme élevé du TGF- β à cause de l'injection d'HOCl (Servettaz et al., 2009). En outre, l'activation de la voie Notch participe aussi au développement de la fibrose et la réaction auto-immunitaire chez les souris traitées par l'HOCl (Dees et al., 2011; Kaviani et al., 2010). Dans le modèle d'HOCl, l'hyperproduction des ERO peut activer l'ADAM-17, une protéase impliquée dans le clivage de Notch ainsi que l'activation de la voie Notch (Kaviani et al., 2010). Plus récemment, il a été montré que la phosphorylation du récepteur du PDGF (PDGFR) est impliquée dans la fibrose tissulaire et que la phosphorylation du récepteur du VEGF (VEGFR) est responsable de la microangiopathie et du dysfonctionnement

endothélial au niveau de la peau chez les souris traitées par l'HOCl (Kavian et al., 2012). L'inhibition simultanée de la phosphorylation des récepteurs PDGFR et VEGFR par un inhibiteur des protéines tyrosine kinases, sunitinib, améliore significativement la fibrose cutanée et la fibrose pulmonaire (Kavian et al., 2012). Cependant, les mécanismes moléculaires de la FP induite par l'HOCl restent encore imparfaitement connus. Nous avons trouvé que l'injection d'HOCl entraîne d'une part une expression élevée de NOS-2 au niveau de l'épithélium bronchiolaire concomitante à une augmentation de la concentration de NO dans l'air expiré chez la souris pendant la phase initiale (2 à 4 semaines après l'injection), et d'autre part, une expression diminuée de NOS-3 dans l'endothélium vasculaire pulmonaire durant la phase tardive (6 à 8 semaines après l'injection) (Thong et al.).

VI.3.3 Comparaison entre les deux modèles animaux (bléomycine vs. HOCl)

Comme précédemment décrit, la bléomycine est un agent pro-fibrosant bien connu qui peut induire une fibrose pulmonaire suite à des injections intratrachéales, ou une fibrose touchant à la fois la peau et les poumons suite à des injections sous-cutanées. Cependant, certaines caractéristiques retrouvées chez les souris traitées par la bléomycine (sc.) ne correspondent pas à celles observées chez les patients atteints de ScS.

Premièrement, la bléomycine (sc.) ne modifie pas la prolifération des fibroblastes cutanés *in vitro*, alors qu'il existe une augmentation significative de la prolifération des fibroblastes provenant de patients atteints de ScS et des souris traitées par l'HOCl (Servettaz et al., 2009). Ensuite, la ScS induite par la bléomycine est due aux propriétés chimiques intrinsèques de cette dernière, capable de produire les cytokines comme le TGF- β (Seder et al., 1998), alors que la ScS induite par l'HOCl est due à une production excessive des ERO, reproduisant ainsi le stress oxydatif de la ScS chez l'homme. Enfin, la caractéristique fondamentale du modèle des souris traitées par l'HOCl est la présence dans le sérum des auto-anticorps semblables à ceux des patients atteints de ScS.

Jusqu'à maintenant, le rôle des ERO dans le développement de la FP induite par l'HOCl a déjà été mis en évidence. En revanche, la question visant à savoir si l'HOCl peut aussi induire une HTP associée à la FP n'est pas encore élucidée. De plus, les mécanismes physiopathologiques autres que le stress oxydatif, notamment la voie RhoA/ROCK, impliqués dans le développement de la fibrose cutanée et pulmonaire n'ont pas encore été étudiés dans le modèle de souris traitées par l'HOCl.

VI.4 Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la FP avec ou sans HTP

La voie RhoA/ROCK est impliquée de façon importante dans la physiopathologie de l'HTP par le dysfonctionnement endothélial, la vasoconstriction pulmonaire persistante, le remodelage vasculaire et l'inflammation chronique induits par les dérèglements de cette voie (Loirand et al., 2006). Le fasudil, un inhibiteur sélectif des ROCK, a été largement étudié dans les modèles animaux de l'HTP, surtout l'HTP induite par la MCT ou par l'hypoxie chronique (Abe et al., 2006; Guilluy et al., 2005; Jiang et al., 2007; Mouchaers et al., 2010; Tawara et al., 2007). L'effet anti-fibrosant du fasudil dans la fibrose cardiaque, rénale ou hépatique est connu (Ikeda et al., 2007; Ishimaru et al., 2007; Satoh et al., 2002; Takeda et al., 2010), mais les conséquences de son utilisation à long terme et l'inhibition chronique de la voie RhoA/ROCK sur le développement de la FP avec ou sans HTP ne sont pas connues.

Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de la FP avec ou sans HTP a été surtout étudié chez les souris traitées par des injections de bléomycine. Les études précédentes ont montré que l'activation de la voie RhoA/ROCK joue un rôle important dans le développement de la FP expérimentale de la souris induite par la bléomycine, alors que le blocage de la voie RhoA/ROCK (par simvastatine ou par Y-27632) améliore cette FP, en diminuant le nombre de cellules inflammatoires dans le LBA, l'importance des signes histopathologiques pulmonaires et la production du collagène (Ou et al., 2008; Shimizu et al., 2001). Avec la FP, l'injection intratrachéale de bléomycine peut aussi induire une HTP chez les rongeurs dans la phase tardive.

Ainsi, l'inhibition de la voie RhoA/ROCK par le sildenafil chez les souris traitées par des injections intratrachéales de bléomycine améliore les signes histologiques de la FP et les paramètres hémodynamiques de l'HTP (Hemnes et al., 2008a). De plus, une seule injection intrapéritonéale d'un inhibiteur des ROCK (fasudil ou Y-27632) chez les rats nouveau-nés normalise complètement la RVP préalablement augmentée par la bléomycine, sans améliorer l'hypertrophie ni la dysfonction du VD (McNamara et al., 2008a).

Il a été récemment montré que le traitement à long terme avec le fasudil atténue la FP induite par la bléomycine intratrachéale chez les souris (Jiang et al., 2012). Cependant, l'effet préventif d'un traitement à long terme par le fasudil sur la survenue de la FP et de l'HTP induites par la bléomycine ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas encore été étudiés.

Enfin, malgré la mise en évidence de la FP chez les souris ayant reçu des injections d'HOCl, nous ne savons pas si l'HOCl pourrait également induire une HTP associée à la FP. De plus, le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de la fibrose cutanée, la FP, et l'HTP (s'il existe) dans le modèle d'HOCl reste encore à étudier.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

B. OBJECTIFS DU TRAVAIL

La voie RhoA/ROCK joue un rôle important dans la physiopathologie de l'HTP par son implication dans le dysfonctionnement endothélial, la constriction et le remodelage des vaisseaux pulmonaires. L'effet bénéfique des inhibiteurs des ROCK dans le traitement de l'HTP a été mis en évidence non seulement dans de différents modèles animaux de l'HTP mais aussi chez les patients atteints d'HTP dans un nombre limité d'essais cliniques. Selon les classifications internationales, la BPCO et la PID sont deux causes fréquentes mais distinctes d'HTP ayant en commun plusieurs mécanismes physiopathologiques dont le dysfonctionnement endothélial, le remodelage vasculaire et la fibrose parenchymateuse. Selon le nouveau concept physiopathologique de l'HTP, certains événements comme le dysfonctionnement endothélial et le remodelage vasculaire pourraient être présents même avant l'établissement de l'HTP. Les objectifs de ce travail étaient d'étudier le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de la BPCO et de la PID avec ou sans HTP et de préciser les anomalies moléculaires liées à la perturbation de la signalisation de cette voie dans chacune de ces situations.

Première étude : Cette première étude vise à comprendre l'importance de la voie RhoA/ROCK sur la modulation du tonus vasculaire et les conséquences des anomalies de cette voie sur le dysfonctionnement endothélial des artères pulmonaires des patients atteints de BPCO avec ou sans hypoxémie.

Deuxième étude : Cette deuxième étude vise à préciser le rôle physiopathologique de la voie RhoA/ROCK dans la survenue d'une FP associée à une HTP dans un modèle murin de PID induite par instillation intratrachéale de bléomycine

Troisième étude : Cette troisième étude vise à préciser le rôle physiopathologique de la voie RhoA/ROCK dans la survenue d'une fibrose cutanée associée ou non à une FP et/ou une HTP dans un modèle murin de ScS induite par injection intradermique d'HOCl.

TRAVAUX DE RECHERCHE

I. Première étude:

Activation de la voie RhoA/ROCK et dysfonctionnement endothélial des artères pulmonaires chez les patients atteints de BPCO

Etat de la question

La BPCO est un groupe de maladies chroniques, caractérisées par une diminution incomplètement réversible des débits expiratoires, associée à une inflammation chronique pulmonaire et une destruction de la structure des petites voies aériennes (Vestbo et al., 2012). L'HTP associée à la BPCO est souvent détectée chez les patients atteints de BPCO modéré ou sévère, dont les mécanismes physiopathologiques sont principalement liés à la vasoconstriction hypoxique chronique, le remodelage vasculaire et le dysfonctionnement endothélial pulmonaire (Shujaat et al., 2012). Ce dysfonctionnement endothélial pulmonaire n'est cependant pas l'apanage des patients atteints de BPCO sévère avec ou sans HTP (Dinh-Xuan et al., 1991), pouvant être présent chez des patients atteints de BPCO modéré (Barberà et al., 1994; Peinado et al., 1998, 1999; Santos et al., 2002) ou chez les fumeurs sans atteinte respiratoire (Peinado et al., 1998; Barberà et al., 2001; Duong-Quy et al., 2011). Le dysfonctionnement endothélial associé au tabagisme est considéré comme un événement initial, mais surtout précoce, dans l'histoire naturelle de l'HTP associée à la BPCO, qui précède souvent le remodelage vasculaire pulmonaire et l'établissement de l'HTP dans la BPCO (Barberà and Blanco, 2009).

Le dysfonctionnement endothélial est associé à un déséquilibre entre la production des médiateurs vasodilatateurs (ex. le NO) et vasoconstricteurs (ex. l'ET-1), aboutissant à une vasoréactivité pulmonaire anormale avec un tonus vasomoteur élevé (Budhiraja et al., 2004). Dans la BPCO, l'altération de la relaxation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires pourrait être liée à une altération de la voie du NO, telle qu'une diminution de l'expression et/ou de l'activité de la NOS-3, et une diminution de la production et/ou de la biodisponibilité du NO (Su et al., 1998; Barberà et al., 2001; Zhang et al., 2006). Récemment, le rôle de la voie

RhoA/ROCK dans le dysfonctionnement endothélial systémique lié au tabagisme a été également mis en évidence (Noma et al., 2005; Hidaka et al., 2010). Cette voie de signalisation joue un rôle important dans la contraction, la migration, la prolifération et l'apoptose cellulaire ainsi que dans la fonction de la barrière endothéliale (Loirand et al., 2006). De plus, la voie RhoA/ROCK peut interférer avec la voie du NO, en inhibant l'expression et l'activité de la NOS-3, ainsi que la biodisponibilité du NO (Laufs et al., 1999; Rikitake and Liao, 2005). Récemment, notre équipe a montré une activation de la voie RhoA/ROCK ainsi qu'une diminution de l'activité de la NOS-3 dans le dysfonctionnement endothélial au niveau des artères pulmonaires des fumeurs ayant (encore) une fonction respiratoire normale (Duong-Quy et al., 2011). Cependant, le rôle physiopathologique de la régulation de la voie RhoA/ROCK dans la circulation pulmonaire des patients BPCO n'a pas encore été étudié.

Le but de ce travail est d'évaluer le rôle modulateur ou aggravant des voies RhoA/ROCK et NO/GMPc, et leur interaction sur les mécanismes physiopathologiques menant au dysfonctionnement endothélial des artères pulmonaires des patients atteints de BPCO avec ou sans hypoxémie.

Matériels et méthodes

Le diagnostic de la BPCO avec ou sans hypoxémie étant confirmé cliniquement et spirométriquement avant l'inclusion des patients, qui sont ensuite classés en trois groupes : 1) Groupe non-BPCO (VEMS/CVF \geq 70%, n=7), 2) Groupe BPCO non-hypoxémique (VEMS/CVF < 70%, PaO₂ \geq 80 mmHg, n=7) et 3) Groupe BPCO hypoxémique (VEMS/CVF < 70%, PaO₂ < 80 mmHg, n=6). Les prélèvements des artères pulmonaires proximales (diamètre externe de 3 à 4 mm, longueur de 4 à 6 mm) ont été obtenus à distance du tissu tumoral lors de l'exérèse chirurgicale dans le cadre d'une lobectomie ou une pneumonectomie pour un cancer bronchique. La relaxation dépendante et indépendante de l'endothélium des artères pulmonaires isolées était mesurée en réponse à une série de concentrations croissantes d'acétylcholine (ACh) et de nitroprussiate du sodium (SNP), respectivement.

L'expression de la NOS-3 était mesurée par immunohistochimie, Western blot et RT-PCR. Les concentrations de nitrates et de GMPc représentant la biodisponibilité du NO et l'activité de la NOS-3, étaient quantifiées par ELISA. La concentration d'ET-1 était également quantifiée par ELISA. L'expression protéique totale de RhoA était mesurée par Western blot, tandis que celle de RhoA-GTP, la forme activée de RhoA, était évaluée après prétraitement par immunoprécipitation suivi d'une semi-quantification par Western blot. L'activité des ROCK était évaluée par ELISA, en quantifiant la phosphorylation de MBS (*myosin-binding subunit*).

Principaux Résultats

Le groupe des sujets non-BPCO est caractérisé par une fonction respiratoire normale (VEMS = 91 ± 7 %, VEMS/CVF = 84 ± 6 %, PaO₂ = 90 ± 5 mmHg). Le groupe BPCO non-hypoxémique est composé de sujets fumeurs avec un trouble ventilatoire obstructif sans hypoxémie (VEMS = 82 ± 10 %, VEMS/CVF = 65 ± 4 %, PaO₂ = 84 ± 7 mmHg). Le groupe BPCO hypoxémique comprend les sujets fumeurs avec un trouble ventilatoire obstructif associé à une hypoxémie modérée (VEMS = 68 ± 11 %, VEMS/CVF = 61 ± 6 %, PaO₂ = 70 ± 5 mmHg). La consommation de tabac et le trouble ventilatoire obstructif (VEMS) étaient significativement plus importants dans le groupe BPCO hypoxémique par rapport au groupe BPCO non-hypoxémique. La concentration d'ET-1 au niveau des artères pulmonaires était significativement plus élevée dans le groupe BPCO hypoxémique (6.16 ± 2.03 fmol/ml) que dans les groupes non-BPCO (1.43 ± 0.68 fmol/ml) et BPCO non-hypoxémique (3.42 ± 1.68 fmol/ml).

La relaxation indépendante de l'endothélium des artères pulmonaires isolées en réponse au SNP était similaire dans les trois groupes. En revanche, la relaxation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires en réponse à l'ACh était significativement diminuée dans les groupes BPCO non-hypoxémique et hypoxémique, par rapport au groupe non-BPCO. De même, les concentrations de nitrates et de GMPc étaient significativement diminuées dans les groupes BPCO non-hypoxémique et hypoxémique, par rapport au groupe non-BPCO. En revanche,

l'expression génique et/ou protéique de NOS-3, n'était significativement diminuée que dans le groupe BPCO hypoxémique. La relaxation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires était fortement corrélée avec la concentration de nitrates ($r = 0.87$, $P < 0.001$) ou de GMPc ($r = 0.91$, $P < 0.001$). La corrélation entre la relaxation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires et l'expression génique de NOS-3, bien que significative, était relativement faible ($r = 0.35$, $P < 0.01$).

L'expression protéique de RhoA totale était similaire dans les trois groupes. En revanche, l'expression protéique de RhoA-GTP et l'activité des ROCK étaient significativement élevées dans les groupes BPCO non-hypoxémique et hypoxémique par rapport au groupe non-BPCO. L'expression protéique de RhoA-GTP était significativement corrélée avec la concentration d'ET-1 ($r = 0.56$, $P < 0.001$), la PaO₂ ($r = 0.65$, $P < 0.001$) et la consommation de tabac ($r = 0.81$, $P < 0.001$). L'expression protéique de RhoA-GTP était aussi significativement corrélée avec l'expression génique de NOS-3 ($r = 0.65$, $P < 0.001$), la concentration de nitrates ($r = 0.78$, $P < 0.001$) et la concentration de GMPc ($r = 0.90$, $P < 0.001$).

Entre les groupes BPCO non-hypoxémique et hypoxémique, la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'ACh des artères pulmonaires ainsi que la concentration de nitrates ou de GMPc étaient encore significativement plus faibles dans le groupe BPCO hypoxémique que dans le groupe BPCO non-hypoxémique. L'expression protéique de RhoA-GTP et l'activité des ROCK étaient, en revanche, significativement plus élevées dans le groupe BPCO hypoxémique que dans le groupe BPCO non-hypoxémique.

Conclusions

Les résultats de cette première étude montrent d'une part une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires, corrélée avec une diminution de l'activité de NOS-3, et d'autre part, une activation de la voie RhoA/ROCK dans les artères pulmonaires, corrélée avec la concentration d'ET-1, la PaO₂ et la consommation de tabac, chez les patients BPCO par rapport aux patients

non-BPCO. Il existe également une corrélation entre l'activité de RhoA et l'expression génique et l'activité de NOS-3. Ces modifications sont d'autant plus franches que l'obstruction bronchique et/ou l'hypoxémie sont plus marquées chez les patients BPCO.

**Activation of RhoA/Rho-kinase pathway and endothelial dysfunction
in human pulmonary arteries in chronic obstructive pulmonary
disease**

Sy Duong-Quy¹, MD, PhD, Yihua Bei¹, MD, PhD, Thong Hua-Huy¹, MD, PhD,
Pierre Dao¹, MD, MSc, Nhat-Nam Le-Dong¹, MD, PhD, Anh Tuan Dinh-Xuan¹, MD,
PhD

¹ Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, EA 2511, Assistance Publique
Hôpitaux de Paris, Service de Physiologie – Explorations Fonctionnelles. Hôpital
Cochin, 27 rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

Corresponding Author

Anh Tuan Dinh-Xuan, MD, PhD, Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles,
Hôpital Cochin, 27 rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

E-mail: anh-tuan.dinh-xuan@cch.aphp.fr

ABSTRACT

Background: Recently, the role of RhoA/Rho-kinase pathway in systemic and pulmonary endothelial dysfunction has been demonstrated in smokers with normal lung function. However, its role in patients with COPD (chronic obstructive pulmonary disease) has not yet been investigated. The aim of this study was to evaluate the regulation of RhoA/Rho-kinase pathway and pulmonary endothelial dysfunction in patients with COPD.

Methods: Pulmonary arteries were obtained from non-smokers (control subjects) and patients with non-hypoxemic and hypoxemic COPD (n = 6-7 /group). Endothelium-dependent and -independent relaxations were evaluated by increased concentrations of acetylcholine and sodium nitroprusside. Gene and protein expressions of eNOS were measured by RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry. Nitrate, cGMP and ET-1 concentrations, as well as Rho-kinase activity were measured by Elisa. Protein expressions of total RhoA and GTP-RhoA were measured by Western blot and pull-down assay, respectively.

Results: Endothelium-dependent relaxation was significantly reduced in COPD patients in comparison with control subjects, which was strongly correlated with the reduction of cGMP and nitrate concentrations ($r = 0.91$, $r = 0.87$; $P < 0.001$), and weakly with eNOS gene expression ($r = 0.35$, $P < 0.01$) in pulmonary arterial samples. The activity of RhoA/Rho-kinase pathway in pulmonary arterial samples was increased in COPD patients, which was strongly correlated with the reduction of cGMP and nitrate concentrations ($r = 0.90$, $r = 0.78$; $P < 0.001$), and moderately with eNOS gene expression ($r = 0.65$; $P < 0.001$). The upregulated GTP-RhoA protein expression was significantly correlated with tobacco consumption, PaO₂, and ET-1 concentration ($r = 0.81$, $r = 0.65$, $r = 0.56$; $P < 0.001$).

Conclusions: In patients with COPD, pulmonary endothelial dysfunction was related to the down regulation of eNOS activity and upregulation of RhoA/Rho-kinase activity.

Keywords: COPD, endothelial dysfunction, eNOS, RhoA, Rho-kinases.

INTRODUCTION

The prevalence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has increased constantly since the last twenty years. In 2020, COPD will be the third leading cause of death worldwide after cardiac ischemia and vascular cerebral diseases (Murray and Lopez, 1997; Lopez et al., 2006). In early stages of disease, COPD is characterized by airflow obstruction, mucus hypersecretion, and airway inflammation. In advanced stages, COPD is marked by severe airflow limitation, lung parenchymal destruction, and pulmonary vascular remodeling. In these stages, pulmonary hypertension (PH) is often detected in COPD patients. It is suggested that chronic hypoxia-induced vasoconstriction and vascular hypertrophy are the principal causes of PH in patients with COPD (Barber et al., 2003).

However, the structural changes of pulmonary arteries are not exclusive to patients with advanced COPD, as they have also been observed in patients with mild to moderate COPD and even in smokers with normal lung function (Barber et al., 1994; Santos et al., 2002). These changes are principally characterized by the thickness of vascular walls and usually associated with the alteration of endothelial function in modulation of the vascular tone and permeability (Peinado et al., 1998). Increasing evidence demonstrated that the harmful effect of cigarette smoke is involved in the vascular structural damage and functional disturbances of endothelial cells. Endothelial dysfunction is thought to be the early manifestation of pulmonary vascular remodeling before it progresses to establish PH. Although the correlation between the severity of COPD and endothelial dysfunction has been demonstrated previously (Dinh-Xuan et al., 1991; Peinado et al., 1998), its correlation with the activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) has not been well established.

Previous studies demonstrated that the small G-protein RhoA, with its downstream effector Rho-kinase (ROCK-I or ROCK β and ROCK-II or ROCK α), has been involved in systemic endothelial dysfunction in smokers with normal lung function (Noma et al., 2005; Hidaka et al., 2010). This pathway plays important roles in diverse cell functions such as cell migration and proliferation, smooth muscle cell contraction, gene expression, and etc... (Loirand et al., 2006). Recently, the role of

RhoA/Rho-kinase pathway in pulmonary endothelial dysfunction in healthy smokers has also been demonstrated (Duong-Quy et al., 2011). It has been suggested that this pathway can negatively regulate eNOS expression and activity, as well as nitric oxide (NO) bioavailability (Takemoto et al., 2002; Rikitake and Liao, 2005). Inhibition of RhoA/Rho-kinase increases then eNOS mRNA stability and expression (Laufs and Liao, 1998; Rikitake et al., 2005). Besides the effect of selective Rho-kinase inhibitors in the treatment of PH in animal models, the beneficial pleiotropic effect of statin, a non selective Rho-kinase inhibitor, in patients with COPD has been recently published (Frost et al., 2007; Søyseth et al., 2007).

Although the role of the RhoA/Rho-kinase pathway in endothelial dysfunction has been demonstrated in healthy smokers, its role in patients with COPD has not been clarified. The aim of the present study was to evaluate the regulation of RhoA/Rho-kinase pathway and the role of eNOS in pulmonary endothelial dysfunction in patients with COPD.

MATERIALS AND METHODS

Chemical reagents, antibodies and kits

All chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) unless otherwise noted. Antibodies included anti-eNOS antibody (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY), anti-RhoA and secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Santa Cruz, CA), and secondary biotinylated antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Rho activation kit for pull-down assay was purchased from Stressgen Bioreagent Corp. (Victoria, BC, Canada), and Rho-kinase assay kit from CycLex Co., Ltd (Tera-Sawaoka Ina, Nagano, Japan). Nitric oxide synthase assay kit was purchased from Cayman Chemical Europe (Massy, France), cGMP Enzyme-Immunoassay Biotrak (EIA) system from GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, UK), and Endothelin-1 (1-21) Enzyme-Immunoassay kit **from** Biomedica (Vienna, Austria).

Patients and pulmonary arterial samples

Patients who underwent lung resection for cancer were enrolled in this

study. Three groups of patients were included: never-smokers with normal lung function (control group), smokers with COPD and without hypoxemia (non-hypoxemic COPD group), and hypoxemic smokers with COPD (hypoxemic COPD group). The COPD patients were defined by the standard criteria [ratio of FEV₁ (forced expiratory volume in one second) - to - FVC (forced vital capacity) < 0.7] (Vestbo et al., 2012). Hypoxemia was defined by partial pressure of oxygen (PaO₂) < 80 mmHg. The present study had been approved by the French Ethics Committee. Patients were informed about the study and had given informed consents.

Proximal pulmonary arteries were carefully dissected from apparently normal lung resection. Arterial rings of 3-4 mm external diameter and 4-6 mm of length were cut and immediately placed in Krebs-Henseleit solution at 4 °C for vascular relaxation study within half an hour. Other pulmonary arterial samples were conserved at -80 °C for protein and RNA extractions or fixed in formalin and embedded in paraffin for immunohistochemistry (IHC).

Assessment of endothelium-dependent and -independent relaxations

The relaxations of pulmonary arterial rings were measured in organ bath chambers (Emka Technologies, France). Isometric tensions were measured and recorded by Mac Intosh Performa 630-Software. Briefly, pulmonary arterial rings were stabilized with Krebs-Henseleit solution warmed at 37 °C and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ for at least 30 min at 1.5 g resting tension. After being pre-contracted with L-phenylephrine, arterial rings were exposed to accumulating concentrations of acetylcholine (ACh, 10⁻⁹-10⁻⁴ mol/L) for endothelium-dependent relaxation and sodium nitroprusside (SNP, 10⁻⁹-10⁻⁴ mol/L) for endothelium-independent relaxation manners. For each subject, four pulmonary arterial rings were independently studied but only the rings with sub-maximal pre-contraction response to L-phenylephrine more than 50% of the basal tone were included in the study.

Protein extraction for Western blot and ELISA assay

Pulmonary arterial samples previously stocked at -80 °C, were defrosted in RIPA buffer (Cell Signaling, Boston, MA) containing protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Pulmonary arterials were

homogenized at 24,000 rpm for 40 seconds on ice. The homogenates were then centrifuged at 15,000 rpm for 20 minutes at 4 °C. Protein concentration was determined by BCA Protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) and pulmonary arterial supernatants were kept at -80 °C for further protein analysis.

Western blot for eNOS and RhoA protein expressions

Equal amounts of proteins from pulmonary arterial supernatants were deposited and migrated into SDS-PAGE gels by electrophoresis and then transferred to PVDF membranes (Immobilon-P). Western blot was performed using appropriate primary antibodies and HRP-conjugated secondary antibodies before visualization via chemiluminescence (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Blot density was determined by Image Software System (Genius 2, Syngene, Cambridge, UK). Protein expressions were normalized with β -actin.

Measurement of GTP-RhoA protein expression by pull-down assay

RhoA activation was determined via measuring the active form of RhoA (GTP-RhoA) by immunoprecipitation. This assay used a GST-fusion protein containing the Rho-binding domain (RBD) of mouse Rhotekin to affinity precipitate GTP-RhoA from lysates (500 μ g of total proteins). After pull-down assay, 25 μ L of eluted samples were separated by SDS-PAGE gels, then transferred to PVDF membranes and probed with antibody against RhoA. Blot density was evaluated as previously described. GTP-RhoA protein expression was normalized with β -actin.

Measurement of nitrate, cGMP, ET-1, and MBS concentrations by ELISA

Nitrate concentration. NOS Assay Kit was used to measure newly synthesized NO from L-arginine by the action of eNOS in the presence of essential co-factors according to the manufacturer's instructions. The final products of the reaction were nitrates, measured by colorimetric method (540 nm), which represented indirectly eNOS activity. Nitrate concentrations were determined via the standard curve.

cGMP concentration. cGMP concentration in pulmonary arteries, representing NO bioavailability, was measured by competitive EIA system according to the manufacturer's instructions. The assay combined the use of a

peroxidase-labelled cGMP conjugate, a specific antiserum that can be immobilized on pre-coated microplates, and a stabilized substrate solution. It was based on competition between unlabelled cGMP and a fixed quantity of peroxidase-labelled cGMP, for a limited number of binding sites on a cGMP specific antibody. cGMP concentrations were determined via a standard curve generated by provided cGMP protein standards.

ET-1 concentration. ET-1 (endothelin-1) concentration in pulmonary arteries was quantified by using ET-1(1-21) kit. Briefly, 50 µl of supernatants of each sample and 200 µl of detection antibody reagent were deposited in duplicate in microtiter plate strips pre-coated with polyclonal anti-endothelin antibody. After overnight incubation, the complexes were washed and then, incubated with 200 µl of conjugate and substrate reagents (HRP). Microtiter plate strips were read at 450 nm absorbance with correction at 620 nm. ET-1 concentrations were obtained from the standard curve.

MBS concentration. ROCK activity in pulmonary arterial supernatants (containing phosphatase inhibitors as previously detailed in protein extraction) was determined using CycLex Rho-kinase assay kit according to the manufacturer's protocol. Plates were pre-coated with a ROCK substrate, the C-terminus of recombinant MBS (Myosin-Binding Subunit of myosin phosphatase or MYPT-1), which contains a threonine residue that can be phosphorylated by Rho-kinase or DMPK family members. ROCKs in supernatants phosphorylated Thr-697 of the substrate, and the phosphorylated MBS was detected with specific HRP-conjugated anti-phospho-MBS (Thr-697) antibody via spectrophotometric analysis (450 nm) of color changes of tetra-methylbenzidine (TMB).

Immunohistochemistry for eNOS expression

For immunohistochemical staining of pulmonary arteries, paraffin sections were performed as follows. Endogenous peroxidase activity was reduced using 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min, then antigen unmask by sodium citrate solution (10 mM, pH 6.0) heated at 100 °C for 20 min. Sections were then covered with 10% normal serum block in PBS / 1% BSA (blocking buffer) for 2 hours and

incubated with primary anti-eNOS antibody (dilution 1:200, overnight, 4 °C). Negative control sections were incubated in blocking buffer alone without primary antibody. Bound primary antibodies were detected using biotinylated antibody (dilution 1:200, 1 hour, room temperature), coupled with preformed avidin-biotin (RTU Vectastain Kit) and DAB peroxidase substrate (3, 3'-diaminobenzidine). Sections were counterstained with hematoxylin. The eNOS expression was evaluated in endothelial cells by using intensity scores, assigned as no staining (0), focal staining (1), diffuse weak staining (2), diffuse moderate staining (3), and diffuse strong staining (4). At least ten counted images were performed for each patient.

RNA isolation, cDNA synthesis, and semi-quantitative and real-time RT-PCR

Transcript levels of eNOS in pulmonary arteries were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using LightCycler® 480 System (Roche Applied Sciences) and normalized to cyclophilin. Briefly, total RNA was extracted from frozen arterial tissues (50 mg/sample) using Trizol Reagent (MP Biochemicals, France) and quantified by a NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Reverse transcription reactions were performed on 1 µg of total RNA for each sample, using SuperScript® First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). For qRT-PCR, all samples were processed in duplicate and results were accepted if variation coefficient was less than 0.2. Oligonucleotide primers were designed and purchased from Eurogentec (Liège, Belgium) as follows:

	Forward primers	Reverse primers
eNOS	TAA-GCA-GGC-CTG-GCG-CAA-CG	AGA-CCT-GCA-GTC-CCG-GGC-AT
Cyclophilin	ACC-GTG-TTC-TTC-GAC-ATT-GCC-GT	TGC-TGT-CTT-TGG-GAC-CTT-GTC-TGC

For qRT-PCR, samples were denatured at 95 °C for 10 minutes, followed by 45 cycles of 25 seconds (95 °C for 10s, 60 °C for 5s, 72 °C for 10s), fusion at 68 °C for 30 seconds, and cooling at 45 °C for 10 seconds. Relative quantification values of the

target genes were standardized according to the value of cyclophilin as housekeeping gene.

Statistical analysis

Statistical comparisons were performed with t-Student test or Fisher's exact test between two groups or with analysis of variance (ANOVA) among more than 3 groups by using the SPSS 16.0 software (Chicago, IL, USA). Data are presented as means \pm SD (for table) or means \pm SE (for graphs). Differences were considered significant with $P < 0.05$.

RESULTS

Clinical and functional characteristics

Three groups of patients who met the inclusion criteria were constituted (6-7 subjects per group). Their clinical and functional characteristics are presented in **Table 1**. The patients with hypoxemic COPD had greater tobacco consumption and higher air flow obstruction (FEV₁%) than those with non-hypoxemic COPD ($P < 0.05$). The ET-1 concentration in pulmonary arterial supernatants in hypoxemic COPD group was significantly higher than that in control group and non-hypoxemic COPD group (6.16 ± 2.03 vs 1.43 ± 0.68 and 3.42 ± 1.68 fmol/ml; $P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively) (**Table 1**).

Table 1. Clinical and functional characteristics of patients

Variables	Controls (n = 7)	Non-hypoxemic	Hypoxemic	P values
		COPD (n = 7)	COPD (n = 6)	
Age, years	59 ± 9	58 ± 11	60 ± 8	NS ^{*, †, ‡}
Male/Female	4/3	5/2	4/2	-
Tobacco, packet-year	0	32 ± 6	41 ± 7	<0.05 [‡]
FEV ₁ , % pred	91 ± 7	82 ± 10	68 ± 11	<0.05 [*] ; <0.01 [†] ; <0.05 [‡]
FEV ₁ /FVC, %	84 ± 6	65 ± 4	61 ± 6	-
DLCOc, % pred	88 ± 7 (n=4)	90 ± 9 (n=4)	74 ± 10 (n=3)	NS [*] ; <0.05 ^{†, ‡}
PaO ₂ , mmHg	90 ± 5	84 ± 7	70 ± 5	NS [*] ; <0.001 [†] ; <0.01 [‡]
PaCO ₂ , mmHg	38 ± 5	40 ± 5	42 ± 4	NS ^{*, †, ‡}
PAPs, mmHg	30 ± 4 (n=5)	29 ± 5 (n=5)	31 ± 3 (n=4)	NS ^{*, †, ‡}
ET-1, fmol/ml	1.43 ± 0.68	3.42 ± 1.68	6.16 ± 2.03	<0.01 [*] ; <0.001 [†] ; <0.05 [‡]

% pred: percentage of predicted value; FEV₁: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity; DLCOc: diffusing capacity of monoxide carbon corrected with hemoglobin (*: non-hypoxemic COPD vs controls; †: hypoxemic COPD vs controls; ‡: hypoxemic COPD vs non-hypoxemic COPD; NS: no significant difference).

Endothelium-dependent and -independent relaxation

The percentage of maximal relaxation response to ACh (10^{-6} - 10^{-4} mol/L) for pulmonary endothelium-dependent relaxation was significantly lower in patients with hypoxemic COPD and non-hypoxemic COPD in comparison with control subjects (at 10^{-5} mol/L: $16 \pm 4\%$ and $27 \pm 5\%$ vs $72 \pm 9\%$; $P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively) (**Fig. 1A**). The difference in endothelium-dependent relaxation between non-hypoxemic COPD group and hypoxemic COPD group was significant ($P < 0.05$). Whatever the dose, pulmonary endothelium-independent relaxations in response to SNP were similar and not significantly different among 3 groups ($P > 0.05$) (**Fig. 1B**).

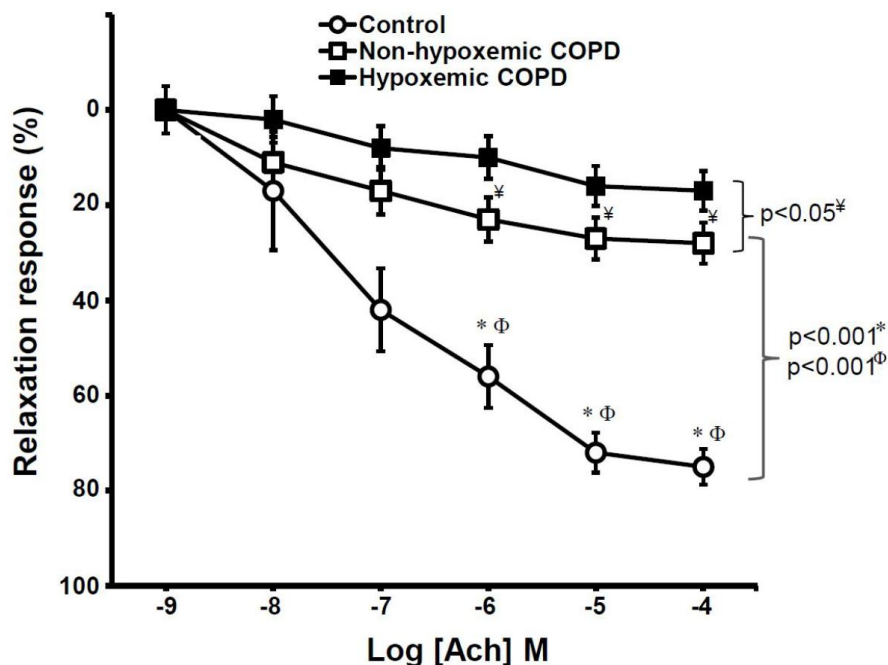


Fig. 1A. Endothelium-dependent relaxation in response to increasing concentrations of acetylcholine (ACh). (*): control vs non-hypoxemic COPD; (ϕ): control vs hypoxemic COPD; (∇): non-hypoxemic COPD vs hypoxemic COPD.

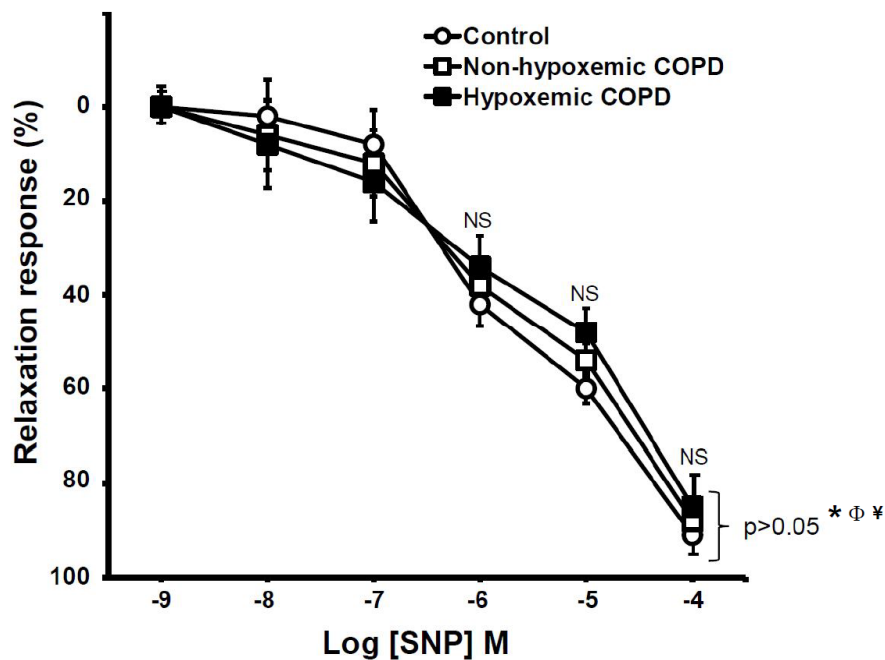


Fig. 1B. Endothelium-independent relaxation in response to increasing concentrations of sodium nitroprusside (SNP). (*): control vs non-hypoxemic COPD; (Φ): control vs hypoxemic COPD; (¥): non-hypoxemic COPD vs hypoxemic COPD; NS: no significant difference.

eNOS immunostaining and eNOS gene and protein expressions

Semi-quantitative assessment of positive staining to eNOS showed that eNOS expression in pulmonary arteries of patients with hypoxemic COPD was significantly lower than that of control subjects and patients with non-hypoxemic COPD ($P < 0.05$ and $P < 0.05$, respectively) (**Fig. 2A**). There was no significant difference in eNOS immunostaining between control group and non-hypoxemic COPD group ($P > 0.05$).

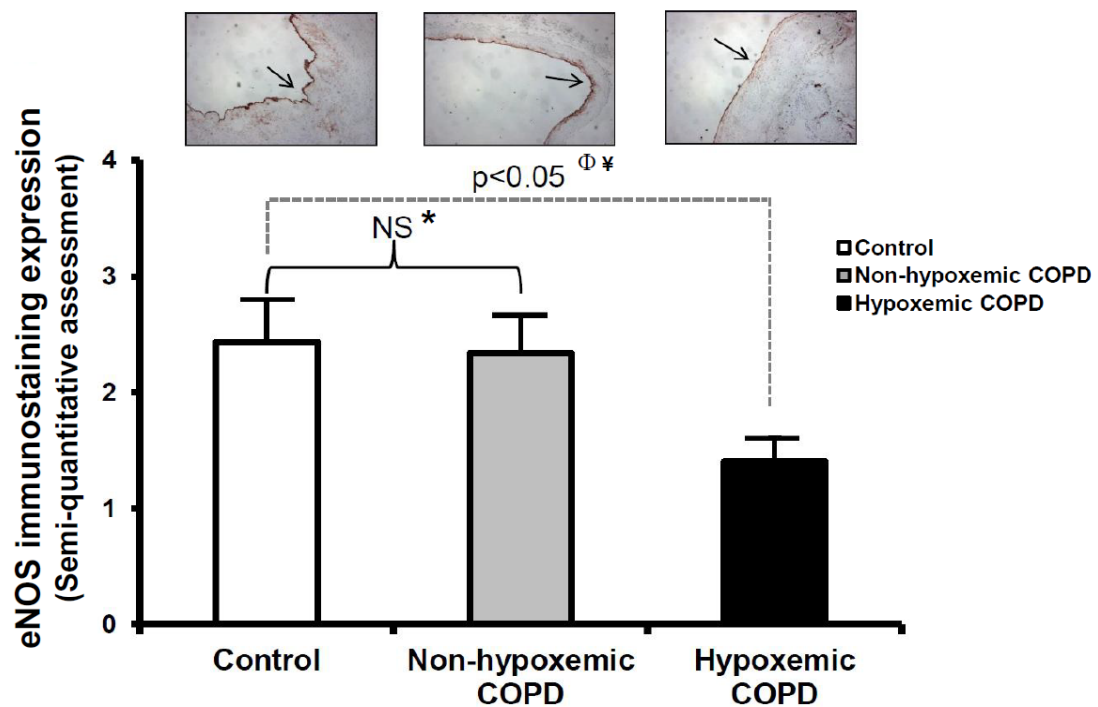


Fig. 2A. Immunostaining expression of eNOS in pulmonary arterials. Images on top: eNOS immunostaining of proximal arterial rings with magnification x 5. (*): control vs non-hypoxemic COPD; (Φ): control vs hypoxemic COPD; (Ψ): non-hypoxemic COPD vs hypoxemic COPD; NS: no significant difference.

Results of relative quantification showed that eNOS gene expression in pulmonary arteries of patients with hypoxemic COPD was significantly lower than that of control subjects and patients with non-hypoxemic COPD ($P < 0.01$ and $P < 0.01$, respectively) (**Fig. 2B**). There was no significant difference in eNOS gene expression between control group and non-hypoxemic COPD group ($P > 0.05$).

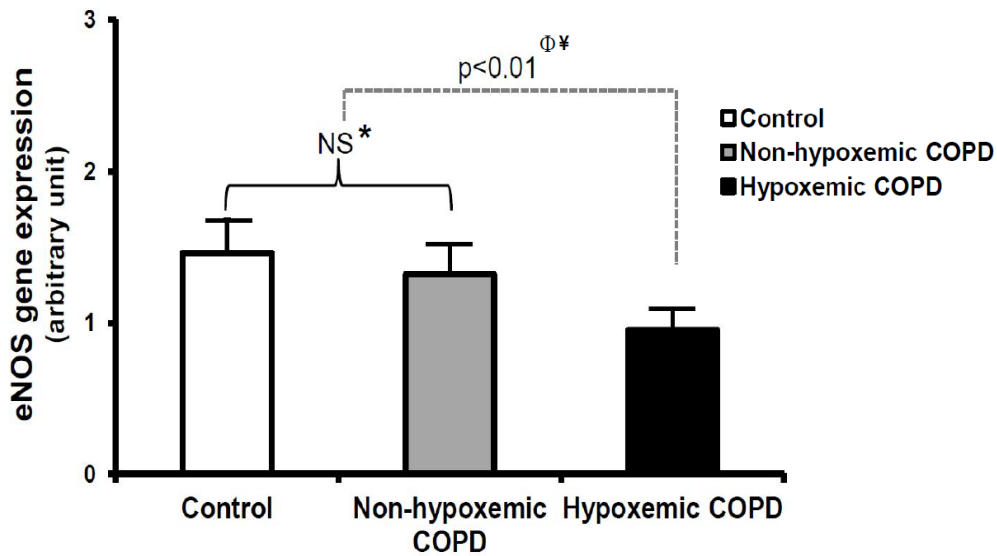


Fig. 2B. Gene expression of eNOS in pulmonary arterials measured by RT-PCR. (*): control vs non-hypoxemic COPD; (Φ): control vs hypoxemic COPD; (Ψ): non-hypoxemic COPD vs hypoxemic COPD; NS: no significant difference.

Western blot analyses of eNOS protein expression in pulmonary arteries showed that eNOS expression in hypoxemic COPD group was significantly lower than that in control group and non-hypoxemic COPD group ($P < 0.01$ and $P < 0.01$, respectively) (**Fig. 2C**). There was no significant difference in eNOS protein expression between control group and non-hypoxemic COPD group ($P > 0.05$).

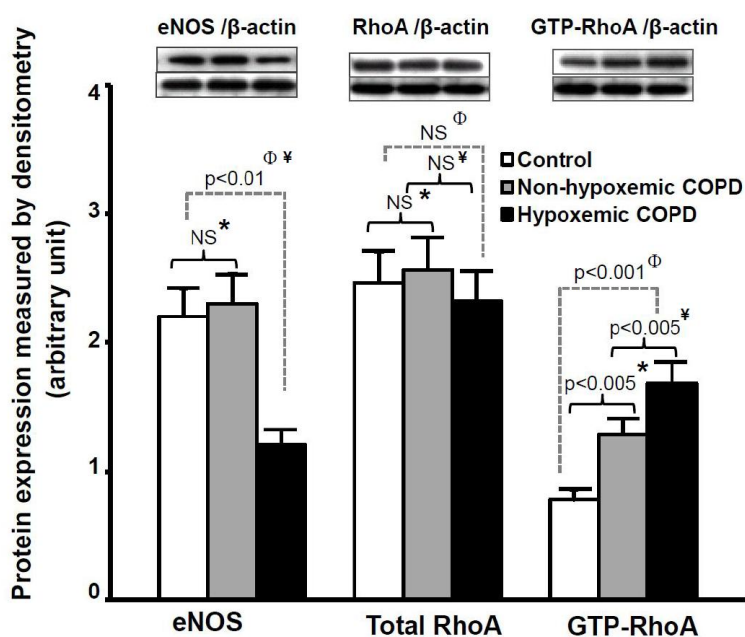


Fig. 2C. Protein expression of eNOS, total RhoA, and GTP-RhoA in pulmonary arterials measured by Western blot and pull-down assay. (*): control vs non-hypoxemic COPD; (Φ): control vs hypoxemic COPD; (\ddagger): non-hypoxemic COPD vs hypoxemic COPD; NS: no significant difference.

RhoA and GTP-RhoA protein expressions

Total RhoA protein expression in pulmonary arterial supernatants was measured by Western blot. There was no significant difference in total RhoA protein expression among three groups ($P>0.05$) (**Fig. 2C**).

The activity of RhoA in pulmonary arterial supernatants was evaluated via measuring the active form of RhoA (GTP-RhoA) by immunoprecipitation. Results of pull-down assay showed that GTP-RhoA protein expression in non-hypoxemic and hypoxemic COPD groups was significantly higher than that in control group ($P<0.005$ and $P<0.001$, respectively) (**Fig. 2C**). Between COPD groups, GTP-RhoA protein expression in hypoxemic COPD group was still higher than that in non-hypoxemic COPD group ($P<0.005$) (**Fig. 2C**). The percentage of GTP-RhoA / total RhoA protein expression in non-hypoxemic and hypoxemic COPD groups was

significantly higher than that in control group ($38 \pm 12\%$ and $56 \pm 10\%$ vs $18 \pm 7\%$; $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively).

Nitrate, cGMP and MBS concentrations

Nitrate concentration from pulmonary arteries in non-hypoxemic and hypoxemic COPD groups was significantly lower than that in control group (19.68 ± 2.34 and 13.20 ± 2.30 vs 26.48 ± 3.66 $\mu\text{mol/ml}$; $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively) (**Fig. 3**). The difference in nitrate concentration between non-hypoxemic and hypoxemic COPD groups was still significant ($P < 0.01$).

Concentration of cGMP from pulmonary arteries in non-hypoxemic and hypoxemic COPD groups was significantly lower than that in control group (1.06 ± 0.11 and 0.78 ± 0.10 vs 1.77 ± 0.15 ng/ml ; $P < 0.005$ and $P < 0.001$, respectively) (**Fig. 3**). The difference in cGMP concentration between non-hypoxemic and hypoxemic COPD groups was still significant ($P < 0.05$).

The activity of Rho-kinase was evaluated by measuring the phosphorylated form of MBS. The relative amounts of phosphorylated MBS in pulmonary arteries in non-hypoxemic and hypoxemic COPD groups were significantly higher than those in control group ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively) (**Fig. 3**). The difference in MBS concentration between non-hypoxemic and hypoxemic COPD groups was still significant ($P < 0.01$).

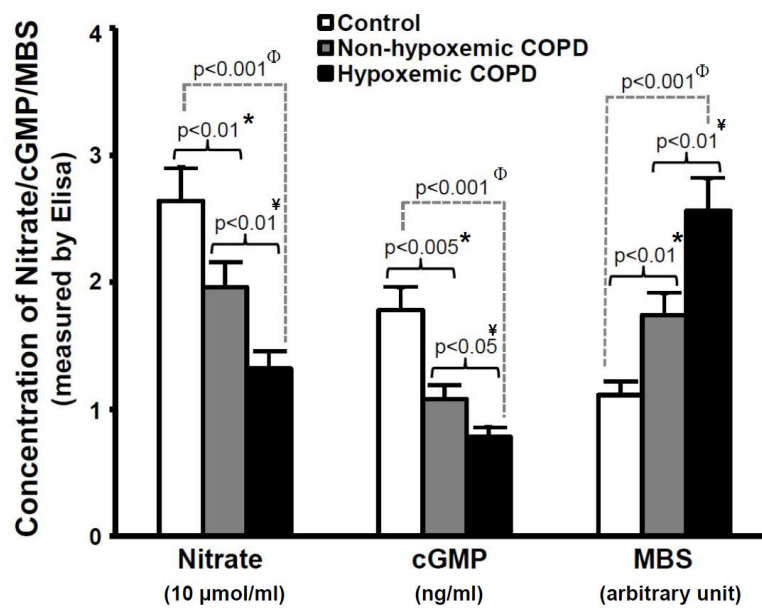


Fig. 3. Concentration of Nitrate, cGMP, and MBS in pulmonary arterial supernatants measured by Elisa. (*): control vs non-hypoxemic COPD; (Φ): control vs hypoxemic COPD; (\ddagger): non-hypoxemic COPD vs hypoxemic COPD. NS: no significant difference.

DISCUSSION

Although the upregulation of RhoA/Rho-kinase pathway in smokers with normal lung function has been demonstrated, the role of this pathway in patients with COPD has not been well studied. The results of the present study showed that: 1) patients with COPD had an impairment of endothelium-dependent relaxation, which was correlated with the reduction of eNOS activity; 2) RhoA/Rho-kinase activity in pulmonary arteries was increased in patients with COPD, which was correlated with tobacco consumption, hypoxemic status and ET-1 concentration; 3) increase of RhoA activity (GTP-RhoA) in patients with COPD was correlated with impairment of eNOS gene expression and activity; 4) all of these impairments were more severe in hypoxemic COPD compared with non-hypoxemic COPD; 5) eNOS gene and protein expressions were only decreased in patients with hypoxemic COPD.

In systemic circulation, endothelial cells play a crucial role in the regulation

of vascular tone. The endothelial dysfunction is principally related to the abnormality in synthesis and release of vasoactive mediators such as NO or ET-1, leading to the alteration of vasodilatation and vasoconstriction balance (Budhiraja et al., 2004). The endothelial dysfunction associated with cigarette smoke is considered as the initial event in the pathogenesis of PH in COPD, which even precedes the vascular structural changes and PH establishment (Barber à and Blanco, 2009). The results of the present study showed that endothelium-dependent relaxation was reduced in patients with COPD, while endothelium-independent relaxation was normal as compared to control subjects. Especially, the impairment of endothelium-dependent relaxation was even more severe in hypoxemic COPD in comparison to non-hypoxemic COPD (**Fig. 1**). Under the effect of cigarette smoke and chronic hypoxia, endothelial dysfunction can be present not only in severe COPD (Dinh-Xuan et al., 1991), but also in mild to moderate COPD (Peinado et al., 1998, 1999) and even in healthy smokers (Barber à et al., 2001; Duong-Quy et al., 2011).

In the present study, the impairment of endothelium-dependent relaxation of proximal pulmonary arteries was present in patients with COPD regardless of existence of hypoxemia, however, the reduction of eNOS protein and gene expressions were only significant in patients with hypoxemic COPD (**Fig. 2**). Our present results are inconsistent with previous studies, in which the decrease of eNOS expression has been demonstrated in patients with mild to moderate COPD and even in smokers with normal lung function (Barber à et al., 2001). These controversial results might be due to the different structures of pulmonary arteries studied: entire lung tissue or parenchymal pulmonary arteries (external diameter of 1.5 to 2 mm) in previous studies *versus* proximal pulmonary arteries (external diameter of 3 to 4 mm) in the present study. Our previous published study measuring proximal pulmonary arteries showed that endothelium-dependent relaxation is impaired in healthy smokers when compared with non-smokers, whereas eNOS protein expression is not significantly different between smokers and non-smokers (Duong-Quy et al., 2011). Thus, the results concerning the regulation of eNOS expression in healthy smokers or patients with mild to moderate COPD rest controversial, whereas the reduction of

eNOS expression in pulmonary arteries in severe COPD or in COPD with PH has already been confirmed (Peinado et al., 2008). However, in our present study, the mean pulmonary arterial pressure (mPAP) measured by transthoracic echography in small sample size of patients was not significantly different among three groups (**Table 1**).

In the present study, eNOS activity was evaluated by measuring the production of nitrate in pulmonary arterial supernatants, which was significantly reduced in patients with non-hypoxemic and hypoxemic COPD as compared with control subjects (**Fig. 3**). We then measured cGMP concentration, which represents NO bioavailability. The results showed that cGMP concentration in pulmonary arterial supernatants was also significantly reduced in patients with non-hypoxemic and hypoxemic COPD as compared with control subjects (**Fig. 3**), suggesting that the bioactivity of NO on soluble guanylate cyclase (sGC) in the formation of cGMP was impaired. Furthermore, the impairment of eNOS activity (nitrate concentration) as well as NO bioavailability (cGMP concentration) in pulmonary arteries was more severe in hypoxemic COPD than non-hypoxemic COPD (**Fig. 3**). Interestingly, the endothelium-dependent relaxation of pulmonary arterial rings was strongly correlated with nitrate and cGMP concentrations ($r = 0.87$, $P < 0.001$; $r = 0.91$, $P < 0.001$; respectively), however, it was weakly correlated with eNOS gene expression ($r = 0.35$, $P < 0.01$) (**Fig. 4A**). It may explain why eNOS gene and protein expressions were still normal, whereas the endothelium-dependent relaxation has already been impaired in non-hypoxemic COPD (**Fig. 1 and 2**). Hence, the results suggest that the endothelial dysfunction of proximal pulmonary arteries in patients with mild to moderate COPD in the present study might be principally related to reduced eNOS activity rather than eNOS expression.

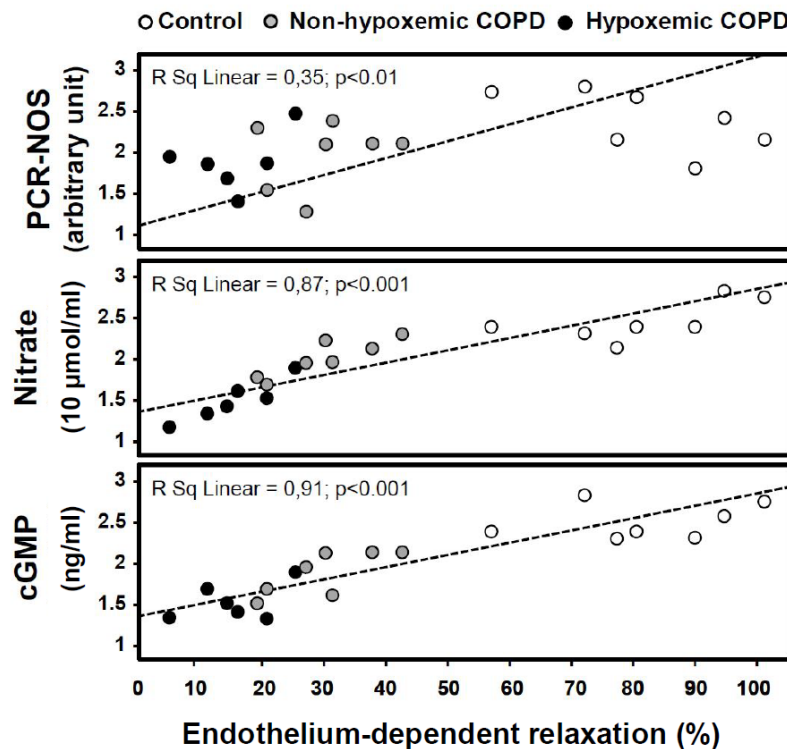


Fig. 4A. Correlations between endothelium-dependent relaxation and eNOS gene expression, nitrate and cGMP concentrations. There were strong correlations between percentage of relaxation (%) and nitrate and cGMP concentrations ($r = 0.87$, $P < 0.001$ and $r = 0.91$, $P < 0.001$; respectively). There was a weak correlation between percentage of relaxation (%) and eNOS gene expression ($r = 0.35$, $P < 0.01$).

Although the molecular mechanism by which eNOS expression and activity were negatively regulated in pulmonary arteries of COPD patients had not been studied in the present study, it might be due to the harmful effect of cigarette smoke on pulmonary endothelial cells via inflammatory mediators and free radicals as demonstrated previously (Raij et al., 2001; van der Vaart et al., 2004). Su *et al* showed that cigarette smoke extract (CSE) produces an irreversible inhibition of eNOS expression and activity in pulmonary arterial endothelial cells (Su et al., 1998). More recently, Zhang *et al* showed that CSE-induced reduction of eNOS activity and NO production / bioavailability is associated with the production of reactive oxygen

species (ROS) as well as an altered arginine metabolism in pulmonary arterial endothelial cells (Zhang et al., 2006). However, in the present study, among COPD patients (13 subjects), there were 3 former-smokers who had a hypoxemia and moderate COPD with an impairment of eNOS activity (low concentration of nitrate and cGMP), which suggests that besides harmful effect of cigarette smoke, there are also other intrinsic factors which may be involved in the impairment of eNOS expression and activity in patients with COPD.

The role of RhoA/Rho-kinase pathway in systemic endothelial dysfunction in smokers with normal lung function has already been demonstrated (Noma et al., 2005; Hidaka et al., 2010). Besides, the increase of RhoA/Rho-kinase activity in pulmonary arteries of smokers with normal lung function has also been confirmed by our previous published study (Duong-Quy et al., 2011). The activation of RhoA/Rho-kinase pathway plays important roles in regulating many cell functions, such as proliferation, migration, apoptosis, contraction, as well as gene expression and endothelial dysfunction (Loirand et al., 2006), which can be involved in the pathogenesis of COPD (Storck and Wojciak-Stothard, 2012). In the present study, we further investigated the regulation of RhoA/Rho-kinase pathway in patients with COPD. We first evaluated the activity of RhoA in pulmonary arteries by measuring the active form of RhoA (GTP-RhoA). The results showed that while total RhoA protein expression was similar among the three groups, GTP-RhoA protein expression was significantly increased in patients with COPD (**Fig. 2C**). The increase of RhoA activity was accompanied by an increase in Rho-kinase activity, confirmed by measuring the phosphorylated form of MBS (**Fig. 3**). Moreover, the activity of RhoA/Rho-kinase pathway in pulmonary arteries was even higher in patients with hypoxemic COPD than those with non-hypoxemic COPD, which suggests that hypoxia might play a potential role in the upregulation of RhoA/Rho-kinase pathway in COPD. The increase of RhoA/Rho-kinase activity associated with chronic hypoxia has already been demonstrated in animal models of PH (Nagaoka et al., 2004; Hyvelin et al., 2005). Although the mechanism by which RhoA/Rho-kinase pathway is activated in chronic hypoxia has not been well understood, previous studies indicate

that ROS are importantly involved in the activation of multiple intracellular signaling cascades including RhoA/Rho-kinase pathway (Jin et al., 2004). Recently, the role of ROS in the upregulation of RhoA/Rho-kinase pathway in chronic hypoxia-induced PH in rats has been demonstrated (Jernigan et al., 2008). In the present study, we tried to find out the potential factors involved in the pathogenesis of COPD, which could be responsible for the upregulation of RhoA/Rho-kinase pathway. Interestingly, the results showed that GTP-RhoA protein expression was strongly correlated with tobacco consumption ($r = 0.81$, $P < 0.001$), and was moderately correlated with hypoxemic status (PaO_2) and ET-1 concentration in pulmonary arterial supernatants, respectively ($r = 0.65$, $P < 0.001$ and $r = 0.56$, $P < 0.001$, respectively) (**Fig. 4B**), which suggests that tobacco consumption, chronic hypoxemic status and elevated ET-1 concentration might be important factors in the upregulation of RhoA/Rho-kinase activity in pulmonary arteries in patients with COPD. However, the mechanism by which the RhoA/Rho-kinase pathway is activated in COPD via these factors needs to be further studied.

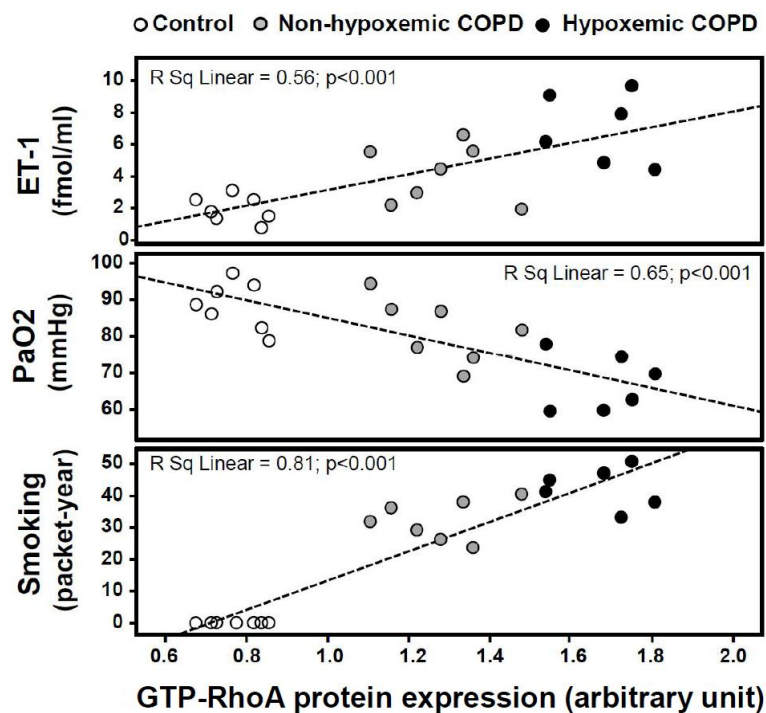


Fig. 4B. Correlations between GTP-RhoA protein expression and ET-1

concentration, PaO₂ and tobacco consumption. There was a strong correlation between GTP-RhoA protein expression and tobacco consumption ($r = 0.81$, $P < 0.001$). There were moderate correlations between GTP-RhoA protein expression and ET-1 concentration and PaO₂ ($r = 0.56$, $P < 0.001$ and $r = 0.65$, $P < 0.001$; respectively).

In the present study, the upregulation of RhoA/Rho-kinase activity was also associated with the down regulation of eNOS activity and gene expression in patients with COPD. Correlation analyses showed that the increase of GTP-RhoA protein expression in pulmonary arterial supernatants was significantly and strongly correlated with the reduction of nitrate and cGMP concentration ($r = 0.78$, $P < 0.001$ and $r = 0.90$, $P < 0.001$, respectively), whereas it was only moderately correlated with the impairment of eNOS gene expression ($r = 0.65$, $P < 0.001$) (**Fig. 4C**). These results reveal potential interaction between RhoA/Rho-kinase pathway and eNOS/NO/cGMP pathway in the pathogenesis of COPD. Previous studies showed that RhoA/Rho-kinase activation can negatively regulate eNOS expression and activity, as well as NO bioavailability, whereas RhoA/Rho-kinase inhibition can increase eNOS mRNA stability (Laufs and Liao, 1998; Laufs et al., 1999; Takemoto et al., 2002; Rikitake and Liao, 2005). Besides, Rho-kinase inhibitors can also enhance the phosphorylation and activation of transcriptional factors, leading to the increase in NO production (Wolfrum et al., 2004). However, the mechanism by which RhoA/Rho-kinase pathway interferes with eNOS expression and activity in pulmonary arteries of patients with COPD should be further clarified.

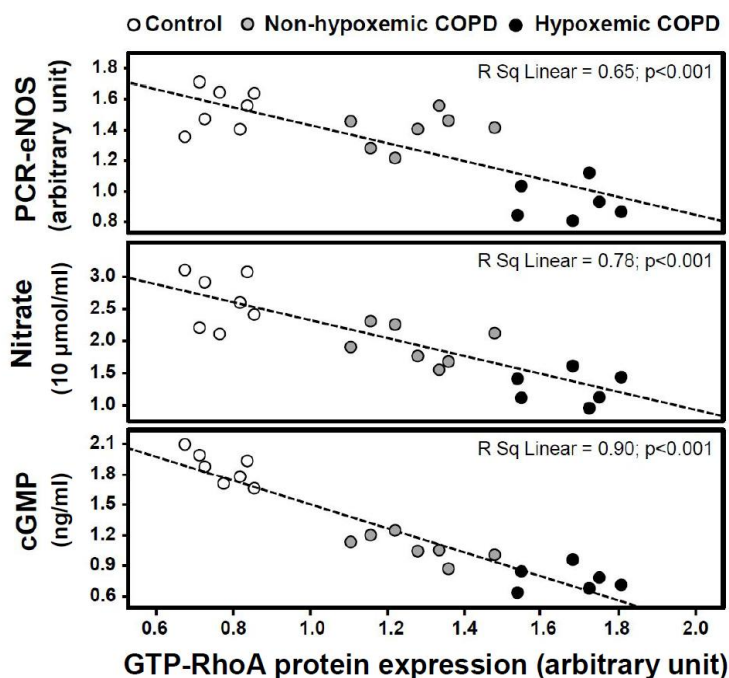


Fig. 4C. Correlations between GTP-RhoA protein expression and eNOS gene expression, nitrate and cGMP concentrations. There were strong correlations between GTP-RhoA protein expression and nitrate and cGMP concentrations ($r = 0.78$, $P < 0.001$ and $r = 0.90$, $P < 0.001$; respectively). There was a moderate correlation between GTP-RhoA protein expression and eNOS gene expression ($r = 0.65$, $P < 0.001$).

CONCLUSIONS

The present study demonstrates for the first time that endothelial dysfunction of pulmonary arteries in patients with COPD is principally related to down regulation of eNOS activity. The upregulation of RhoA/Rho-kinase activity in pulmonary arteries of patients with COPD might be associated with tobacco consumption, hypoxemic status and local ET-1 concentration. The interaction between RhoA/Rho-kinase pathway and eNOS/NO/cGMP pathway in endothelial dysfunction in the pathogenesis of COPD needs to be further studied.

REFERENCES

- Barberà J.A., and Blanco, I. (2009). Pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease: advances in pathophysiology and management. *Drugs* 69, 1153–1171.
- Barberà J.A., Peinado, V.I., and Santos, S. (2003). Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 21, 892–905.
- Barberà J.A., Peinado, V.I., Santos, S., Ramirez, J., Roca, J., and Rodriguez-Roisin, R. (2001). Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 709–713.
- Barberà J.A., Riverola, A., Roca, J., Ramirez, J., Wagner, P.D., Ros, D., Wiggs, B.R., and Rodriguez-Roisin, R. (1994). Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationships in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149, 423–429.
- Budhiraja, R., Tuder, R.M., and Hassoun, P.M. (2004). Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Circulation* 109, 159–165.
- Dinh-Xuan, A.T., Higenbottam, T.W., Clelland, C.A., Pepke-Zaba, J., Cremona, G., Butt, A.Y., Large, S.R., Wells, F.C., and Wallwork, J. (1991). Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 1539–1547.
- Duong-Quy, S., Dao, P., Hua-Huy, T., Guilluy, C., Pacaud, P., and Dinh-Xuan, A.T. (2011). Increased Rho-kinase expression and activity and pulmonary endothelial dysfunction in smokers with normal lung function. *Eur. Respir. J.* 37, 349–355.
- Frost, F.J., Petersen, H., Tollestrup, K., and Skipper, B. (2007). Influenza and COPD mortality protection as pleiotropic, dose-dependent effects of statins. *Chest* 131, 1006–1012.
- Hidaka, T., Hata, T., Soga, J., Fujii, Y., Idei, N., Fujimura, N., Kihara, Y., Noma, K., Liao, J.K., and Higashi, Y. (2010). Increased leukocyte rho kinase (ROCK) activity and endothelial dysfunction in cigarette smokers. *Hypertension Research* 33, 354–359.
- Hyvelin, J.-M., Howell, K., Nichol, A., Costello, C.M., Preston, R.J., and McLoughlin, P. (2005). Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. *Circ. Res.* 97, 185–191.
- Jernigan, N.L., Walker, B.R., and Resta, T.C. (2008). Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295, L515–529.

Jin, L., Ying, Z., and Webb, R.C. (2004). Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H1495–1500.

Laufs, U., Endres, M., and Liao, J.K. (1999). [Regulation of endothelial NO production by Rho GTPase]. *Med. Klin. (Munich)* 94, 211–218.

Laufs, U., and Liao, J.K. (1998). Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J. Biol. Chem.* 273, 24266–24271.

Loirand, G., Guérin, P., and Pacaud, P. (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ. Res.* 98, 322–334.

Lopez, A.D., Shibuya, K., Rao, C., Mathers, C.D., Hansell, A.L., Held, L.S., Schmid, V., and Buist, S. (2006). Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur. Respir. J.* 27, 397–412.

Murray, C.J., and Lopez, A.D. (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349, 1498–1504.

Nagaoka, T., Morio, Y., Casanova, N., Bauer, N., Gebb, S., McMurtry, I., and Oka, M. (2004). Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287, L665–672.

Noma, K., Goto, C., Nishioka, K., Hara, K., Kimura, M., Umemura, T., Jitsuiki, D., Nakagawa, K., Oshima, T., Chayama, K., et al. (2005). Smoking, endothelial function, and Rho-kinase in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2630–2635.

Peinado, V.I., Barberá J.A., Abate, P., Ramírez, J., Roca, J., Santos, S., and Rodriguez-Roisin, R. (1999). Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1605–1611.

Peinado, V.I., Barbera, J.A., Ramirez, J., Gomez, F.P., Roca, J., Jover, L., Gimferrer, J.M., and Rodriguez-Roisin, R. (1998). Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am. J. Physiol.* 274, L908–913.

Peinado, V.I., Pizarro, S., and Barberá J.A. (2008). Pulmonary vascular involvement in COPD. *Chest* 134, 808–814.

Raij, L., DeMaster, E.G., and Jaimes, E.A. (2001). Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. *J. Hypertens.* 19, 891–897.

Rikitake, Y., Kim, H.-H., Huang, Z., Seto, M., Yano, K., Asano, T., Moskowitz, M.A., and Liao, J.K. (2005). Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke* 36, 2251–2257.

- Rikitake, Y., and Liao, J.K. (2005). Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ. Res.* 97, 1232–1235.
- Santos, S., Peinado, V.I., Ramírez, J., Melgosa, T., Roca, J., Rodriguez-Roisin, R., and Barberà J.A. (2002). Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur. Respir. J.* 19, 632–638.
- Søyseth, V., Brekke, P.H., Smith, P., and Omland, T. (2007). Statin use is associated with reduced mortality in COPD. *Eur. Respir. J.* 29, 279–283.
- Storck, E.M., and Wojciak-Stothard, B. (2012). Rho GTPases in pulmonary vascular dysfunction. *Vascul. Pharmacol.*
- Su, Y., Han, W., Giraldo, C., De Li, Y., and Block, E.R. (1998). Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 819–825.
- Takemoto, M., Sun, J., Hiroki, J., Shimokawa, H., and Liao, J.K. (2002). Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106, 57–62.
- Van der Vaart, H., Postma, D.S., Timens, W., and Ten Hacken, N.H.T. (2004). Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 59, 713–721.
- Vestbo, J., Hurd, S.S., Agustí, A.G., Jones, P.W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P.J., Fabbri, L.M., Martínez, F.J., Nishimura, M., et al. (2012). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, GOLD Executive Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*
- Wolfrum, S., Dendorfer, A., Rikitake, Y., Stalker, T.J., Gong, Y., Scalia, R., Dominiak, P., and Liao, J.K. (2004). Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1842–1847.
- Zhang, W.-Z., Venardos, K., Chin-Dusting, J., and Kaye, D.M. (2006). Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension* 48, 278–285.

II. Deuxième étude:

Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la FP et l'HTP dans un modèle murin de PID induite par instillation intratrachéale de bléomycine

Etat de la question

L'HTP associée à la FP (HTP-FP) est une complication grave de la PID. Elle est également synonyme de mauvais pronostic en clinique. Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement spécifique et efficace de l'HTP-FP et les essais cliniques évaluant les traitements conventionnels chez les patients atteints de l'HTP-FP, tels que les prostacyclines, les antagonistes des récepteurs d'ET-1 et les inhibiteurs de PDE-5 sont encore trop peu nombreux pour que nous puissions adopter une attitude pratique consensuelle (Behr and Ryu, 2008).

La voie RhoA/ROCK est impliquée dans la physiopathologie de l'HTP (Loirand et al., 2006). Le fasudil, un inhibiteur sélectif des ROCK, a été largement étudié dans les modèles animaux de l'HTP, utilisant la MCT ou l'hypoxie chronique comme stimulus inducteur (Guilluy et al., 2005; Abe et al., 2006; Jiang et al., 2007; Tawara et al., 2007; Mouchaers et al., 2010). Par ailleurs, l'effet antifibrosant du fasudil dans la fibrose rénale ou hépatique a été également mis en évidence (Satoh et al., 2002; Ikeda et al., 2007; Takeda et al., 2010). Néanmoins, il existe peu de données sur l'effet à long terme du fasudil dans le développement de l'HTP-FP.

Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de la FP avec ou sans HTP a surtout été étudié chez les souris ayant reçu des injections de bléomycine. Les études précédentes ont montré que l'activation de la voie RhoA/ROCK joue un rôle important dans le développement de la FP induite par la bléomycine chez la souris, et que l'inhibition de cette voie (par simvastatine ou Y-27632) améliore la FP (Shimizu et al., 2001; Ou et al., 2008). L'injection de bléomycine peut aussi induire l'HTP chez les rongeurs durant la phase tardive, où l'activation de la voie RhoA/ROCK a déjà été mise en évidence au niveau du poumon (Hemnes et al., 2008; McNamara et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que le traitement à long

terme par le fasudil peut atténuer la FP induite par l'instillation intratrachéale de bléomycine chez la souris (Jiang et al., 2012). Néanmoins, l'effet à long terme du fasudil dans la prévention de la survenue d'une FP associée à une HTP induite par la bléomycine ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas encore été étudiés.

Parmi de nombreux médiateurs pro-fibrosants, le TGF- β 1 joue un rôle physiopathologique dans la réponse inflammatoire et fibrosante au cours de la FP, via une signalisation dépendante et/ou indépendante de Smad2/3 (Biernacka et al., 2011). La voie RhoA/ROCK peut, d'une part, être activée via la voie TGF- β 1 Smad2/3-indépendante, et d'autre part, interférer avec la phosphorylation de Smad2/3 dans la voie TGF- β 1 Smad2/3-dépendante (Kamaraju and Roberts, 2005; Chen et al., 2006).

Le but de ce travail est d'évaluer l'effet à long terme du fasudil, un inhibiteur des ROCK, dans la physiopathologie de la FP et l'HTP induites par la bléomycine intratrachéale chez la souris, et d'étudier l'interaction entre la voie RhoA/ROCK et la voie TGF- β 1/Smad2/3.

Matériels et méthodes

Nous avons induit la FP et l'HTP par une seule instillation intratrachéale de bléomycine (3.3 U/kg, Bléomycine Bellon, Sanofi-Aventis) à jour 0 (J0). Les souris C57BL/6 étaient réparties de façon aléatoire dans 3 groupes : 1) Groupe témoin (une seule instillation intratrachéale de sérum physiologique) ; 2) Groupe bléomycine (BLM) et 3) Groupe bléomycine traité par fasudil (BLM + fasudil). Le traitement par le fasudil (30 mg/kg/jour) a été effectué par injection intrapéritonéale quotidienne jusqu'au jour du sacrifice. Les souris ont été sacrifiées au bout de 7, 14 et 21 jours (J7, J14 et J21), afin d'analyser la cinétique de la fibrose et de l'HTP induites par la bléomycine au fil du temps.

Au jour du sacrifice, la pression systolique du ventricule droit (PSVD) était

mesuré par ponction directe du VD *in vivo*. Le cœur a été prélevé puis disséqué pour isoler le VD du ventricule gauche (VG) avec le septum (S). L'hypertrophie du VD était évaluée par le rapport du poids VD/(VG+S). Les poumons gauches ont été utilisés pour l'analyse histopathologique, tandis que les poumons droits ont été utilisés pour le dosage du collagène ou l'extraction de protéine.

La coloration hématoxyline-éosine (H-E) ou picro-sirius rouge (PSR) a été réalisée pour l'analyse histopathologique du poumon. Le profil des cellules inflammatoires était évalué par des immunomarquages pour les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes T (CD3) ou les lymphocytes B (CD20). L'hypertrophie de la média vasculaire et la néomuscularisation des artérioles pulmonaires étaient évaluées par un immun marquage anti α -SMA. Le dosage du collagène était fait par colorimétrie quantitative (Sircol Soluble Collagen Assay, Biocolor Ltd). L'activité de RhoA était mesurée par colorimétrie quantitative (G-lisa RhoA Activation Assay, Cytoskeleton). L'expression protéique de pMYPT-1 et de MYPT-1 était semi-quantifiée par Western blot et l'activité des ROCK était déterminée par le rapport de l'expression pMYPT-1/MYPT-1. L'expression protéique de TGF- β 1 et de pSmad2/3 était mesurée par Western blot.

Principaux Résultats

L'instillation intratrachéale de bléomycine entraînait une réponse inflammatoire pulmonaire, confirmée par une infiltration notable de neutrophiles, macrophages, lymphocytes T et lymphocytes B au niveau du tissu pulmonaire, avec un pic à J7 et une régression à J21. L'infiltration des neutrophiles et des macrophages était essentiellement visible dans l'espace alvéolaire de J7 à J14, tandis que l'infiltration des lymphocytes T et B prédominait dans l'espace périvasculaire de J14 à J21. Le fasudil atténuait significativement la réponse inflammatoire pulmonaire à J14, et diminuait en particulier l'infiltration des neutrophiles et des macrophages à J7 et à J14, respectivement.

La bléomycine induisait une augmentation progressive et significative de la

quantité de collagène dans les poumons, culminant à J21, confirmé de plus par l'analyse histopathologique par la coloration au PSR. Le fasudil diminuait significativement la quantité de collagène dans les poumons à J7, J14 et J21.

La bléomycine induisait une augmentation significative de la PSVD et une hypertrophie du VD à J14 et J21. Ces deux paramètres étaient significativement améliorés par le fasudil. On trouvait un épaississement de la média vasculaire et une néomuscularisation des artérioles pulmonaires dès J7, qui restaient significatifs jusqu'à J21. Le fasudil améliorait significativement ces deux formes de remodelage vasculaire à J7, J14 et J21.

L'activité de RhoA et des ROCK était significativement élevée à partir de J7 et J21, respectivement. Le fasudil diminuait significativement cette augmentation de l'activité de RhoA et des ROCK à J21. Il y avait une augmentation progressive et significative de l'expression protéique de TGF- β 1 et de pSmad2/3 à J7, J14 et J21. Le fasudil diminuait significativement la surexpression de pSmad2/3, sans diminuer celle de TGF- β 1.

Conclusions

Les résultats de cette deuxième étude montrent que la FP et l'HTP induites par la bléomycine sont associées à une activation de la voie RhoA/ROCK au niveau du poumon. Le fasudil non seulement inhibe la réponse inflammatoire, mais aussi améliore la FP et l'HTP induites par la bléomycine, via l'inhibition de la phosphorylation de Smad2/3 dans la voie TGF- β 1.

Long-term treatment with fasudil improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension via inhibition of Smad2/3 phosphorylation

Yihua Bei (1,2), Thôn̄g Hua-Huy (1), Sy Duong-Quy (1), Viet-Ha Nguyen (1), Weihua Chen (1,2), Carole Nicco (3), Frédéric Batteux (3), Anh Tuan Dinh-Xuan (1,2)*.

(1) Paris Descartes University, Medical School, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Service de Physiologie, EA 2511. Hôpital Cochin, 27 rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

(2) Clinical and Translational Research Center, Tongji University School of Medicine and Shanghai East Hospital, 150 Jimo Road, Shanghai, 200120, China

(3) Paris Descartes University, Medical School, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Laboratoire d'Immunologie, EA 1833. Hôpital Cochin, 27 rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

Author for correspondence:

Anh Tuan Dinh-Xuan, MD, PhD

Service de Physiologie – Explorations Fonctionnelles

Hôpital Cochin, Université Paris Descartes

27, Rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

Tel: 33 158412341; Fax: 33 158412345

E-mail: anh-tuan.dinh-xuan@cch.aphp.fr

Running head: Fasudil improves bleomycin-induced lung injuries in mice

ABSTRACT

Pulmonary hypertension (PH) associated with pulmonary fibrosis (PF) considerably worsens prognosis of interstitial lung diseases (ILD). RhoA/Rho-kinases (ROCK) pathway is implicated in high pulmonary vascular tone and pulmonary fibrosis but the effect of ROCK inhibitors on PH associated with PF is not known. We therefore aimed to determine whether long-term treatment with fasudil, a selective ROCK inhibitor, could attenuate PF and PH induced by bleomycin in mice. Male C57BL/6 mice received a single dose of intratracheal bleomycin (3.3 U/kg) to induce PF. Treatment with fasudil (30 mg kg⁻¹ day⁻¹) was given intraperitoneally for 7, 14 or 21 days until mice underwent hemodynamic measurements. Right ventricular systolic pressure (RVSP) and RV/(LV+S) ratio were assessed. Lung inflammatory cells profiles, including macrophages, neutrophils, lymphocytes B and lymphocytes T were assessed by immunohistochemistry. Lung fibrosis was evaluated by histological and biochemical methods. Pulmonary arteriole muscularization and medial wall thickness (MWT) were evaluated by immunohistochemical staining for α -SMA. Bleomycin induced severe PF and PH in mice, associated with an increased RhoA/ROCK activity in the lung. Fasudil reduced lung inflammation and lung collagen content, and attenuated the increased RVSP, RV hypertrophy, and pulmonary vascular remodeling in bleomycin-intoxicated mice. Fasudil inhibited the increased activity of RhoA/ROCK pathway, and partly altered bleomycin-associated activation of TGF- β 1/Smad pathway, via inhibition of Smad2/3 phosphorylation. The efficacy of long-term treatment with fasudil suggests that the blockade of RhoA/ROCK pathway may be a promising therapy for patients with ILD-associated PH.

Keywords: RhoA, Rho-kinases, bleomycin, pulmonary hypertension, pulmonary fibrosis

INTRODUCTION

Pulmonary hypertension (PH) associated with pulmonary fibrosis (PF) considerably worsens prognosis of chronic interstitial lung diseases (ILDs). The most common ILDs causing PF and PH include idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), connective tissue disorders (CTDs) and sarcoidosis. To date, no specific treatment for PH associated with PF is available. On the other hand, high-quality clinical trials investigating current conventional therapies such as prostacyclins, endothelin-1 (ET-1) receptor antagonists and phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors are scarce in patients with ILD-associated PH (3), thus highlighting the need for finding new therapies for these patients.

There is increasing evidence to suggest that the RhoA/Rho-kinase (ROCK) pathway is involved in various vascular disorders in the systemic and the pulmonary circulations (10). RhoA, one of the best-known members of Rho GTPases, and its effector proteins, ROCKs, are strongly implicated in a wide range of cell functions, such as migration, proliferation, apoptosis, differentiation and contraction (27). RhoA/ROCK pathway plays a pivotal role in the pathogenesis of PH as its abnormal activation either causes or worsens endothelial dysfunction, sustained vasoconstriction, vascular remodeling and inflammation (2). Fasudil, one of the inhibitors of ROCKs, has been extensively studied in animal models of PH over the past decade, notably in monocrotaline- or chronic hypoxia- induced PH (1, 15, 22, 31, 44). A small number of clinical trials also reported effective effects of acute administration of fasudil either intravenously or by inhalation in patients with severe PH (13, 14, 20, 26). However, little is known about the effects of long-term treatment with fasudil in PH secondary to PF neither in animal models nor in humans.

Bleomycin, a chemotherapeutic antibiotic produced from *Streptomyces verticillus*, is extensively used in rodent models of PF. Intratracheal instillation of bleomycin causes oxidative stress and triggers sequential increased production of lung pro-inflammatory cytokines, activation of lung fibroblasts that eventually leads to PF (29). Altering RhoA/ROCK signaling pathway, either by treatment with simvastatin or direct inhibition by the ROCK inhibitor, Y-27632, lowers inflammatory cell numbers

in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and decreases lung hydroxyproline content (HPC) thereby attenuating bleomycin-induced PF in mice (36, 42). Intratracheal instillation of bleomycin also induces PH in rodents at late time-points (18, 35, 40) whereas a single intraperitoneal bolus of ROCK inhibitors (Y-27632 or fasudil) completely normalizes pulmonary vascular resistance (PVR) in bleomycin-induced PH in rats (28). Furthermore, sildenafil treatment in bleomycin-intoxicated mice reduces pulmonary hypertension and right ventricular (RV) hypertrophy through inhibition of RhoA/ROCK pathway (18).

Although long-term treatment with fasudil has been shown to attenuate bleomycin-induced PF in mice (23), the effect of fasudil on the occurrence of both PH and PF in the same mice intoxicated by bleomycin has not yet been investigated nor the underlying mechanisms fully deciphered. Prior studies have suggested that TGF- β 1/Smad pathway activation plays a crucial role in the initiation and the development of inflammatory and fibrotic responses in PF (5). It has been recently demonstrated that the protective effect of simvastatin may be mediated by reduced inflammatory response and TGF- β 1 production in animals with bleomycin-induced PF (36). On the other hand, there is evidence to suggest possible interactions between RhoA/ROCK activation and Smad2/3 phosphorylation in TGF- β 1 family signaling (8, 24).

The aims of the present study were to determine whether long-term treatment with fasudil could reduce occurrence and/or severity of both PF and PH induced by bleomycin, and if so whether this could be attributable to inhibition of TGF- β 1/Smad pathway.

METHODS

Animal model. Eight week-old male C57BL/6 mice (Harlan, Gannat, France) were used in the present study according to animals guidelines for biomedical research applied in our institution. All mice were housed in autoclaved ventilated cages with a 12 h day–night cycle and free access to water and food.

Mice were randomly divided into 3 groups for each time-point: 1) saline

control (n=8); 2) bleomycin (n=20); 3) bleomycin + fasudil (n=20). Mice were anesthetized with intraperitoneal ketamine (50 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg), and then received a single intratracheal dose of either saline (50 μ L) or bleomycin (3.3 U/kg, dissolved in 50 μ L saline; bleomycin Bellon, Sanofi-Aventis, Paris, France) on day 0. Briefly, the trachea was exposed via a midline neck incision and a blunt dissection. After a 22-gauge cannula was inserted into the trachea, 50 μ L saline or bleomycin was instilled into the trachea followed by 150 μ L fresh air, which facilitated bleomycin delivery into distal air spaces. The cannula was then removed and the skin incision was sutured. In order to investigate the kinetics of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis, mice were sacrificed at three time-points: day 7, 14 and 21. Daily treatment with fasudil (30 mg kg^{-1} day^{-1} , dissolved in PBS with a dilution of 2 mg/mL, LC laboratories, Woburn, MA) or vehicle was given intraperitoneally until the day of sacrifice. Mice were weighed every day and fasudil doses were calculated according to their body weights.

On day 7, 14 and 21, right ventricular systolic pressure (RVSP) was measured *in vivo*. After hemodynamic evaluation, the thorax was opened. Heart samples were removed for RV hypertrophy measurement. Left lungs were perfused with 10% formalin for histopathological analysis. Right lungs were stored at -80 $^{\circ}\text{C}$ until use for collagen content quantification or protein extraction.

Hemodynamic measurement and RV hypertrophy. At the end of each time-point, RVSP was measured in all mice via a closed-chest technique as previously described (33). Briefly, mice were anesthetized with intraperitoneal ketamine (50 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg). A 25-gauge needle attached to a pressure transducer was introduced directly into the RV. Pressure curve was gained by a 4-channel data acquisition system (Lab-Trax-4, World Precision Instruments, UK) and recorded simultaneously by running the software Labscribe2.

After hemodynamic measurement, the thorax was opened and the heart was removed. The RV was dissected from the left ventricle (LV) plus septum (S). The ratio of RV / (LV + S) weight was calculated to assess RV hypertrophy.

Lung Histopathology. Left lungs in paraffin-embedded blocks were cut into

5 μm -thick sections, and stained with hematoxylin-eosin for routine examination or picro-sirius red for lung fibrosis evaluation. Slides were examined with a light microscope at a 100-fold magnification (Leica DC300, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Morphometric analysis of pulmonary vessels. To evaluate vascular structural alterations, immunohistochemical staining was carried out with a mouse monoclonal antibody against smooth muscle α -Actin (α -SMA) (Santa Cruz, sc-32251). Briefly, 5 μm -thick lung sections were deparaffinized in xylene and rehydrated with descending concentrations of ethanol. Endogenous peroxidase activity was blocked by 0.3% H_2O_2 in methanol for 30 minutes. Antigen retrieval was performed by protease for 30 minutes. Sections were washed and blocked by 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS-Tween (0.05%) for 1 hour and then incubated with mouse anti- α -SMA antibody (1:200 in 1% BSA) for 1 hour. After washing with PBS-Tween (0.05%), sections were incubated with biotinylated horse anti-mouse IgG secondary antibody (1:200 in 1% BSA, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) for 1 hour. After incubation with avidin-biotinylated enzyme complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector laboratories) for 30 minutes, staining was finally visualized by using diaminobenzidine (DAB). Sections were then counterstained by hematoxylin and dehydrated with increasing concentrations of ethanol.

Fully muscularization of pulmonary distal arterioles (outside diameter between 10 and 50 μm) was determined if $> 75\%$ of the circumference was α -SMA positive. For each animal, at least 25 fields per lung section were examined at a 100-fold magnification and the number of fully muscularized pulmonary arterioles per field was counted. To evaluate the medial wall thickness (MWT), about 15 to 20 pulmonary arteries (outside diameter between 50 and 150 μm) were examined at a 200-fold magnification in each lung section. The relative MWT was defined as (external diameter - internal diameter) / external diameter. These observations were made by two of the authors “blinded” to conditions and treatments and the results were presented by the average values obtained from five to six separate animals per group.

Lung inflammatory cells profiles. To evaluate lung inflammatory cells profiles, we performed immunohistochemical staining on serial adjacent 5 μm -thick lung sections with antibodies against macrophage (1:100, Santa Cruz, sc-101447), neutrophil (1:1000, Santa Cruz, sc-71674), lymphocyte T (CD3) (1:400, Santa Cruz, sc-101442) and lymphocyte B (CD20) (1:250, Santa Cruz, sc-7735), respectively. The main steps were performed exactly as described above. For analysis, about 20 to 30 fields of each lung section were consecutively chosen and microscopically photographed with a 100-fold magnification. For sections from bleomycin-injected mice, fields were exclusively chosen in fibrosis part. For each type of inflammatory cells described above, the presence of peribronchial, perivascular and alveolar inflammatory infiltration was scored, respectively, by two “blind” observers on the following scale: 0, none; 1, mild; 2, moderate; 3, marked; and 4, severe. An increment of 0.5 was used when the inflammation fell between two levels (43). The sum of peribronchial, perivascular and alveolar inflammation scores was used to evaluate the infiltration of each inflammatory cell. Finally, total lung inflammation for each animal was determined by the sum of inflammation scores from all of these four inflammatory cells: macrophages, neutrophils, lymphocytes T and lymphocytes B.

Collagen contents in lung. Collagen contents in lung were determined by the quantitative dye-binding sircol method (Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK) (41). Right lung tissues were diced into small pieces and then mixed with pepsin (1:10 weight ratio) and 0.5 M acetic acid at room temperature for one week. After centrifugation at 1,500 rpm for 15 minutes, 150 μL of supernatant was incubated with 1 mL of sirius red reagent at room temperature for 30 minutes. Tubes were then centrifugated at 20,000 g at room temperature for 20 minutes. The supernatant was discarded and 1 ml of 0.5 M NaOH was added to the collagen-dye pellets. Absorbance was read at 540 nm on a microplate reader versus a standard range of bovine collagen type I concentrations. Results were presented as μg of collagen/mg of lung tissue.

RhoA and ROCK activity. RhoA activity was measured in whole right lung lysates by 96-well G-LISA RhoA Activation Assay (Cytoskeleton, Denver, CO, USA). Briefly, lung tissues were homogenized in ice cold RIPA lysis buffer (Cell Signaling,

#9806), added with protease and phosphatase inhibitor tablets (Thermo, 88664), and were centrifugated at 15,000 rpm at 4 °C for 20 minutes. Protein concentrations were measured by Precision Red Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton, ADV02) and were finally equalized with ice cold lysis buffer to 0.7 mg/ml. Equalized lung homogenates, containing 17.5 µg of total protein, were transferred to a Rho-GTP-binding protein precoated plate. The plate was placed on a cold orbital shaker at 200 rpm for 30 minutes, and then incubated with anti-RhoA primary antibody (1/250), followed by secondary antibody (1/62.5) on a microplate shaker at 200 rpm at room temperature for 45 minutes each. The plate was then incubated with HRP detection reagent at 37 °C for 15 minutes. After HRP stop buffer was added, absorbance was read at 490 nm.

ROCK activity was quantified by MYPT1 phosphorylation on Thr-696 in protein extracts from the right lung, relative to total MYPT1 expression by western blot analyses. Briefly, 50 µg of total protein was subjected to electrophoreses on 7.5%-4% SDS-Page gels, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with rabbit anti-phospho-MYPT1 (Thr-696) antibody (1:500, Upstate, ABS45) overnight. Goat anti-rabbit IgG-HRP (1:5000, Santa Cruz, sc-2004) was used as secondary antibody. Protein bands were developed on Hyperfilm (Amersham) by using enhanced chemiluminescence (ECL plus reagent, Amersham). Membranes were then stripped and reblotted with rabbit anti-MYPT1 (H-130) antibody (1:1000, Santa Cruz, sc-25618) overnight at 4 °C. Goat anti-rabbit IgG-HRP (1:20,000) was used as secondary antibody. ROCK activity was presented as the ratio of p-MYPT1 (Thr-696) / total MYPT1 density using densitometric analysis with ImageJ software.

Western Blot Analyses of TGF-β1 and phospho-Smad2/3 expression in lung. To evaluate TGF-β1 and phospho-Smad2/3 expression, 50 µg of total protein in right lung homogenates was subjected to electrophoreses on 12%-6% SDS-Page gels, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with rabbit anti-TGF-β1 antibody (1:250, Santa Cruz, sc-146) or goat anti-p-Smad2/3 antibody (1:500, Santa Cruz, sc-11769) overnight at 4 °C, respectively. Membranes were then incubated with HRP conjugated goat anti-rabbit IgG or rabbit anti-goat IgG secondary antibody

(1:10,000, Santa Cruz) for 45 minutes at room temperature. Protein bands were developed on Hyperfilm by using ECL as described above. Membranes were then stripped and reblotted for rabbit anti- α -Tubulin antibody (1:30,000, Millipore, EP1332Y) overnight at 4 °C, followed by incubation with HRP conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:20,000, Santa Cruz) for 45 minutes. Loading volume of each sample was normalized by α -Tubulin protein band density.

Statistical analysis. All analyses were performed using SPSS (Version 18.0). Data are expressed as mean \pm SEM. Different experimental groups were compared by the non-parametric Kruskal–Wallis test, followed by Mann–Whitney U test. *P*-value < 0.05 was considered significant. Figures are presented using GraphPad Prism 5 software.

RESULTS

Fasudil decreased acute lung inflammation induced by bleomycin instillation. To investigate bleomycin-associated lung inflammation, macrophages, neutrophils, lymphocytes T and lymphocytes B were immunohistochemically stained and analyzed in peribronchial, perivascular and alveolar structures, respectively. Total lung inflammation for each animal was defined as the sum of inflammation scores for the 4 types of inflammatory cells as described above. As shown in Fig. 1, bleomycin caused significant lung inflammation at all three time-points, which peaked on day 7, maintained on day 14 and then reduced on day 21 (BLM vs. Saline, *P* < 0.01). Treatment with fasudil reduced inflammatory infiltration on day 14 (8.67 ± 0.47 vs. 11.83 ± 0.74 , *P* < 0.05) (Fig. 1). As for the distribution of inflammatory cells, neutrophils and macrophages infiltrated largely in alveolar spaces especially at earlier time-points (day 7 and day 14) (Fig. 2b and 2e), whereas lymphocyte B infiltration was apparent not only in alveolar spaces but also around blood vessels (Fig. 2h). During the first 2 weeks after bleomycin instillation, lymphocyte T infiltration was relatively minor compared with macrophages, neutrophils and lymphocytes B (data not shown). However, lymphocyte T infiltration was found evident around blood vessels by day 21 (Fig. 2k). By immunohistochemical scoring, fasudil exhibited a

significant decrease in neutrophil infiltration on day 7 (1.94 ± 0.15 vs. 2.54 ± 0.10 , $P < 0.01$) (Fig. 2c), and markedly reduced macrophage infiltration on day 14 (2.18 ± 0.11 vs. 3.67 ± 0.31 , $P < 0.05$) (Fig. 2f). On day 21, total lung inflammation regressed and there was no significant difference in inflammatory infiltration between group BLM and BLM plus fasudil (8.95 ± 1.07 vs. 7.66 ± 0.64 , $P > 0.05$) (Fig. 1).

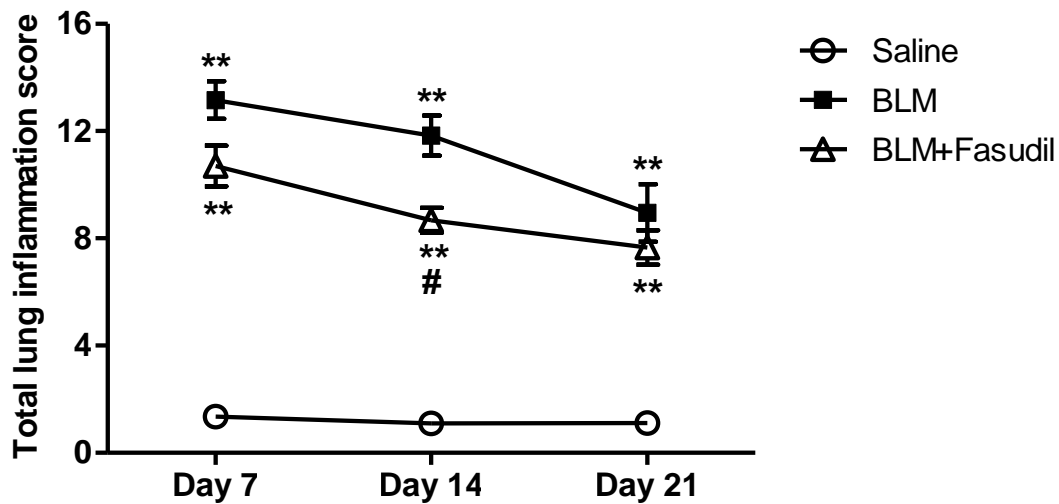


Fig. 1. Bleomycin induced lung inflammation, which was partly reduced by fasudil treatment on day 14. Total lung inflammation was defined as the sum of immunohistochemical scorings comprising neutrophils, macrophages, lymphocytes B and lymphocytes T, as described in METHODS. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$ to 6 mice per group). ** $P < 0.01$ vs. Saline; # $P < 0.05$ vs. BLM alone.

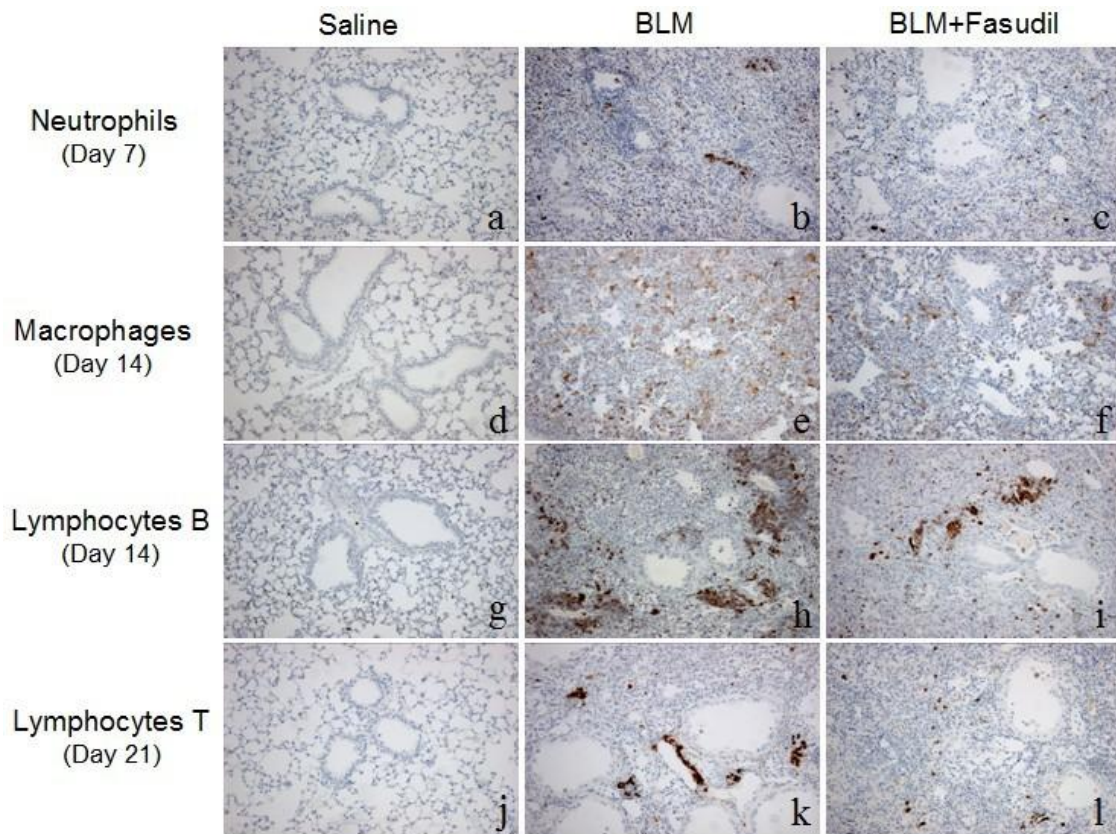


Fig. 2. Neutrophils, macrophages, lymphocytes B and lymphocytes T were immunohistochemically stained to evaluate inflammatory infiltrations in peribronchial, perivascular and alveolar structures, respectively. Neutrophils and macrophages infiltrated largely in alveolar spaces after bleomycin instillation (Fig. 2b and 2e), whereas lymphocyte B and lymphocyte T infiltrations were apparent around blood vessels (Fig. 2h and 2k). Treatment with fasudil significantly improved neutrophil and macrophage infiltration on day 7 and day 14, respectively (Fig. 2c and 2f). About 20 to 30 images were analyzed for each lung section, with $n = 5$ to 6 mice per group. Original magnification: 100 x.

Fasudil reduced bleomycin-induced lung fibrosis. Bleomycin administration caused significant lung fibrosis in mice, as measured by lung collagen content with the quantitative dye-binding sircol method. The time course of bleomycin-induced lung fibrosis was studied. As shown in Fig. 3, lung collagen content in bleomycin-instilled mice was significantly increased on day 7 (8.58 ± 0.62 vs. 4.29 ± 0.15 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.001$), and was further increased on day 14 (15.82 ± 1.44

vs. $3.97 \pm 0.21 \mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.01$) and day 21 (31.19 ± 2.16 vs. $5.29 \pm 0.30 \mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.01$), when compared with saline control.

Fasudil treatment significantly reduced lung collagen content by 19.42% on day 7 (6.92 ± 0.52 vs. $8.58 \pm 0.62 \mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.05$), by 29.27% on day 14 (11.19 ± 0.69 vs. $15.82 \pm 1.44 \mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.05$) and by 50.15% on day 21 (15.55 ± 1.08 vs. $31.19 \pm 2.16 \mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.01$), compared with mice treated with bleomycin alone (Fig. 3). Histopathological analysis of lung tissues stained with picro-sirius red confirmed the reduction in lung fibrosis in mice treated with fasudil (Fig. 4).

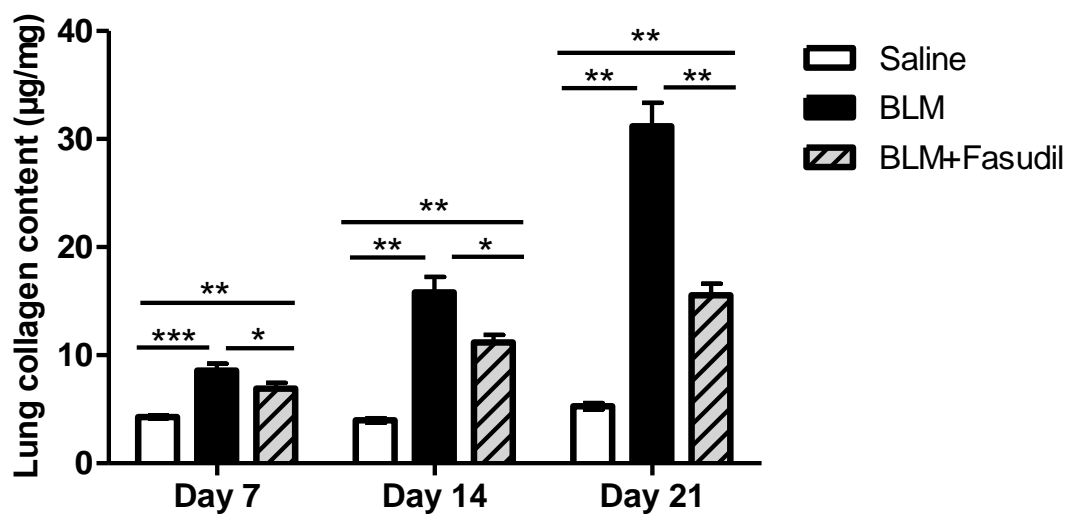


Fig. 3. Bleomycin induced a progressive increase in collagen content in lung, which was significantly reduced by fasudil treatment ($n = 4$ mice in Saline group, $n = 5$ to 6 mice in BLM or BLM + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

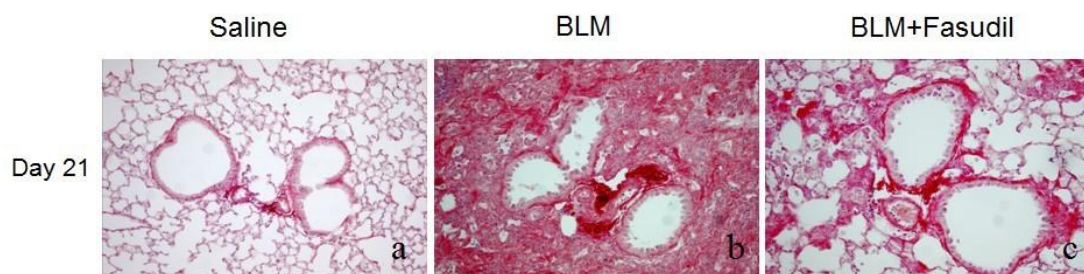


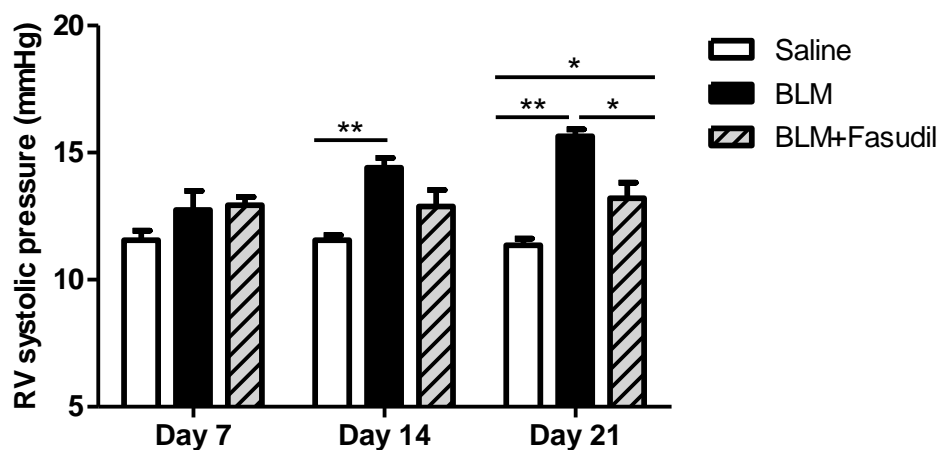
Fig. 4. Representative images of lung collagen deposition by picro-sirius red staining from mice treated with saline, bleomycin or bleomycin plus fasudil on day 21.

Bleomycin caused severe damages of lung architectures, shown by evident fibrotic changes of alveolar septa, collagen deposition in lung interstitium and even obliteration of alveolar spaces (Fig. 4b). Fasudil significantly improved these fibrotic changes and reduced collagen deposition (Fig. 4c). Original magnification: 100 x.

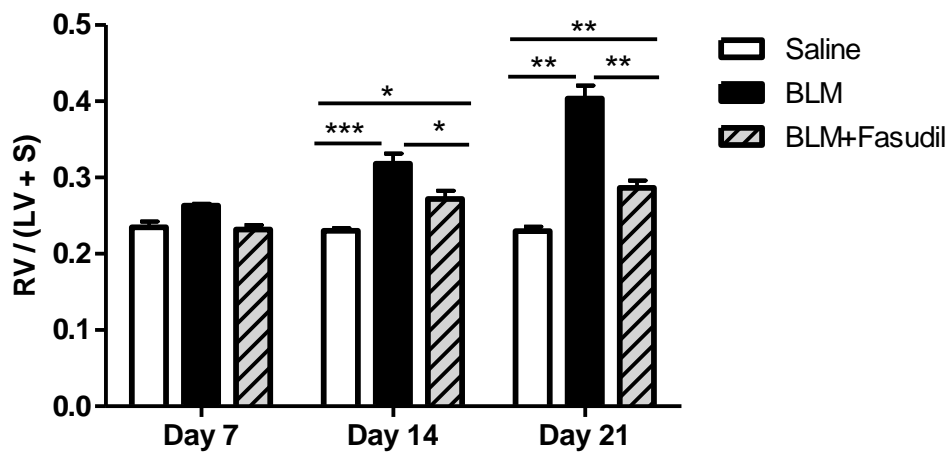
Fasudil attenuated bleomycin-induced PH and reduced RV hypertrophy.

Bleomycin gradually increased RVSP. This increase became significant on day 14 (14.41 ± 0.39 vs. 11.56 ± 0.19 mmHg, $P < 0.01$), and peaked by day 21 (15.64 ± 0.28 vs. 11.35 ± 0.27 mmHg, $P < 0.01$), when compared with saline control (Fig. 5A). Elevated RVSP on day 14 was accompanied by a marked RV hypertrophy, as indicated by the increased ratio of RV / (LV + S) (0.32 ± 0.01 vs. 0.23 ± 0.00 , $P < 0.001$), that further increased by day 21 (0.40 ± 0.02 vs. 0.23 ± 0.01 , $P < 0.01$) (Fig. 5B).

In comparison with bleomycin alone, treatment with fasudil trended to attenuate the increase in RVSP on day 14 ($P = 0.16$), with a significantly reduced RV hypertrophy caused by bleomycin (0.27 ± 0.01 vs. 0.32 ± 0.01 , $P < 0.05$). RVSP was also lower in animals treated with fasudil (12.88 ± 0.6 mmHg) as compared with bleomycin-treated animals (14.41 ± 0.39 mmHg) but this reduction did not reach statistical significance. On day 21, fasudil significantly reduced both RVSP (13.21 ± 0.60 vs. 15.64 ± 0.28 mmHg, $P < 0.05$) and RV hypertrophy (0.29 ± 0.01 vs. 0.40 ± 0.02 , $P < 0.01$) (Fig. 5A and 5B).



A.



B.

Fig. 5. Bleomycin instillation caused an increase in RVSP and RV / (LV+S) ratio on day 14 and day 21. This increase was attenuated by fasudil treatment. (A) RVSP measurement in mice. (B) Right ventricular hypertrophy, as indicated by RV / (LV + S) ratio (n = 5 to 6 mice in Saline group, n = 8 to 10 mice in BLM or BLM + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fasudil attenuated bleomycin-induced vascular remodeling. Vascular remodeling was evaluated by pulmonary arteriole muscularization as well as medial wall thickness (MWT) in sections of lung tissues stained with α -SMA. Instillation of bleomycin caused an increase in the number of fully muscularized pulmonary arterioles ($P < 0.05$) as well as an increase in MWT ($P < 0.05$), which appeared on day 7 (Fig. 6A and 6B). The medial wall thickening was present and persistent on day 14 and day 21 (Fig. 6B), whereas the number of fully muscularized pulmonary arterioles continued to increase on day 14 and then reduced on day 21 (Fig. 6A). Treatment with fasudil significantly reduced pulmonary arteriole muscularization and attenuated the increase in MWT (Fig. 6A and 6B). Representative images of lung sections stained with α -SMA (day 21) are presented in Fig. 6C.

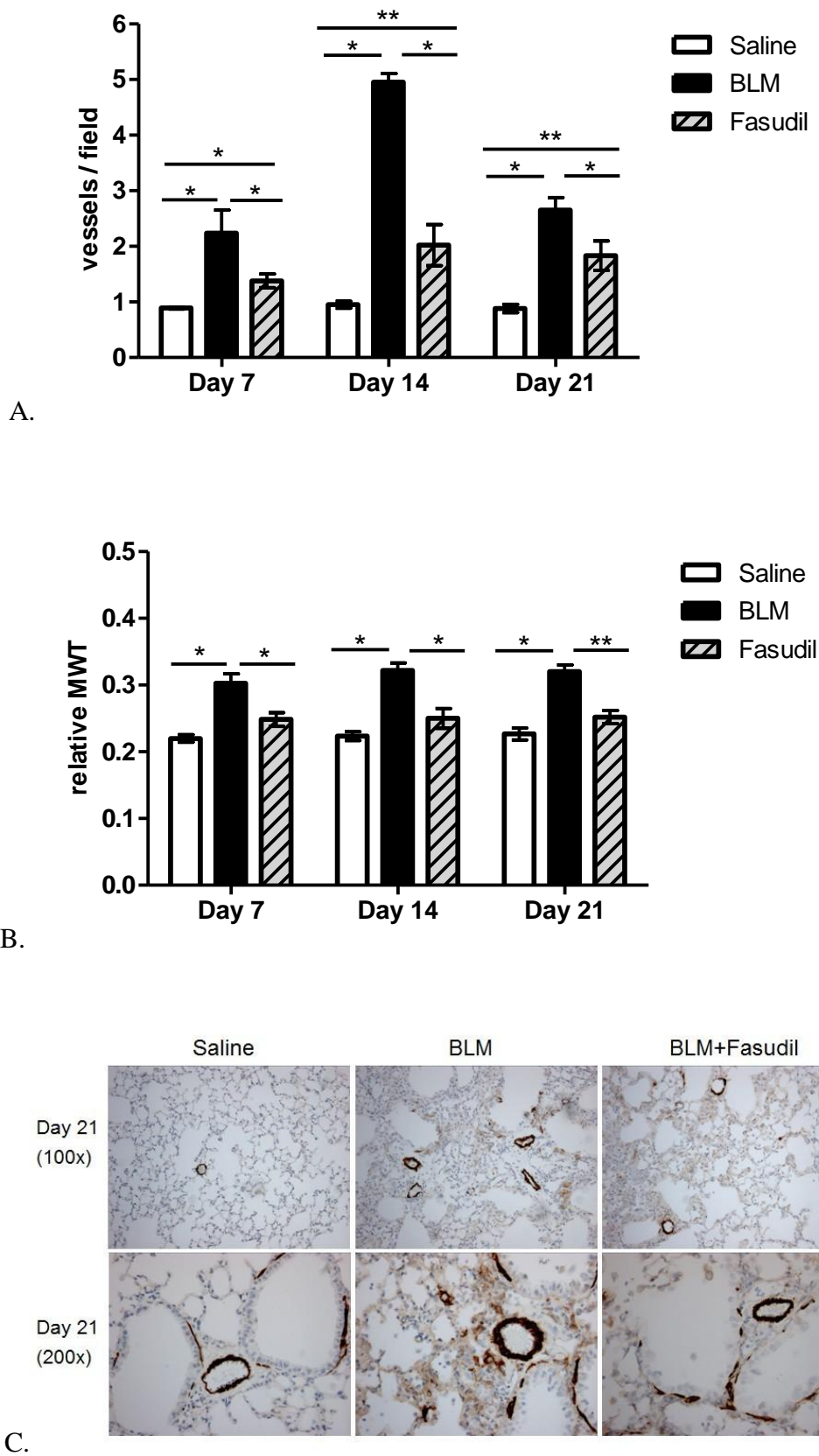


Fig. 6. Bleomycin instillation caused a significant vascular remodeling in mice, as

evaluated by the muscularization of distal pulmonary arterioles and the medial wall thickening, which was ameliorated by treatment with fasudil. (A) Morphometric analysis of the number of α -SMA-positive vessels per field. (B) Morphometric analysis of the relative medial wall thickness as measured by (external diameter – internal diameter) / external diameter. (C) Representative images of lung tissues stained with α -SMA from mice treated with saline, bleomycin or bleomycin plus fasudil on day 21. The muscularization of distal arterioles and the medial wall thickening are presented at a 100-fold and 200-fold magnification, respectively. (n = 5 to 6 mice per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Bleomycin activated lung RhoA/ROCK pathway. We measured RhoA activity in lung homogenates to assess the activation of RhoA/ROCK pathway. Bleomycin administration resulted in a progressive and significant increase in RhoA activity in the lung, with an 1.90-fold increase on day 7 (0.33 ± 0.03 vs. 0.17 ± 0.01 OD, $P < 0.05$), an 2.32-fold increase on day 14 (0.43 ± 0.03 vs. 0.18 ± 0.01 OD, $P < 0.01$) and an 3.17-fold increase on day 21 (0.54 ± 0.07 vs. 0.17 ± 0.01 OD, $P < 0.05$) (Fig. 7A). We then evaluated ROCK activity, as indicated by the ratio of p-MYPT1 / total MYPT1, by western blot analyses (Fig. 7B and 7C). On day 7 and day 14, there was no significant difference in ROCK activity between bleomycin- and saline-instilled mice. On day 21, however, ROCK activity was markedly increased in bleomycin-instilled mice compared with saline control (density ratio = 0.45 ± 0.04 vs. 0.16 ± 0.02 , $P < 0.01$). In comparison with bleomycin alone, treatment with fasudil attenuated both the increase in RhoA activity (0.37 ± 0.03 vs. 0.54 ± 0.07 OD, $P < 0.05$) and ROCK activity (density ratio = 0.29 ± 0.03 vs. 0.45 ± 0.04 , $P < 0.05$) on day 21 (Fig. 7).

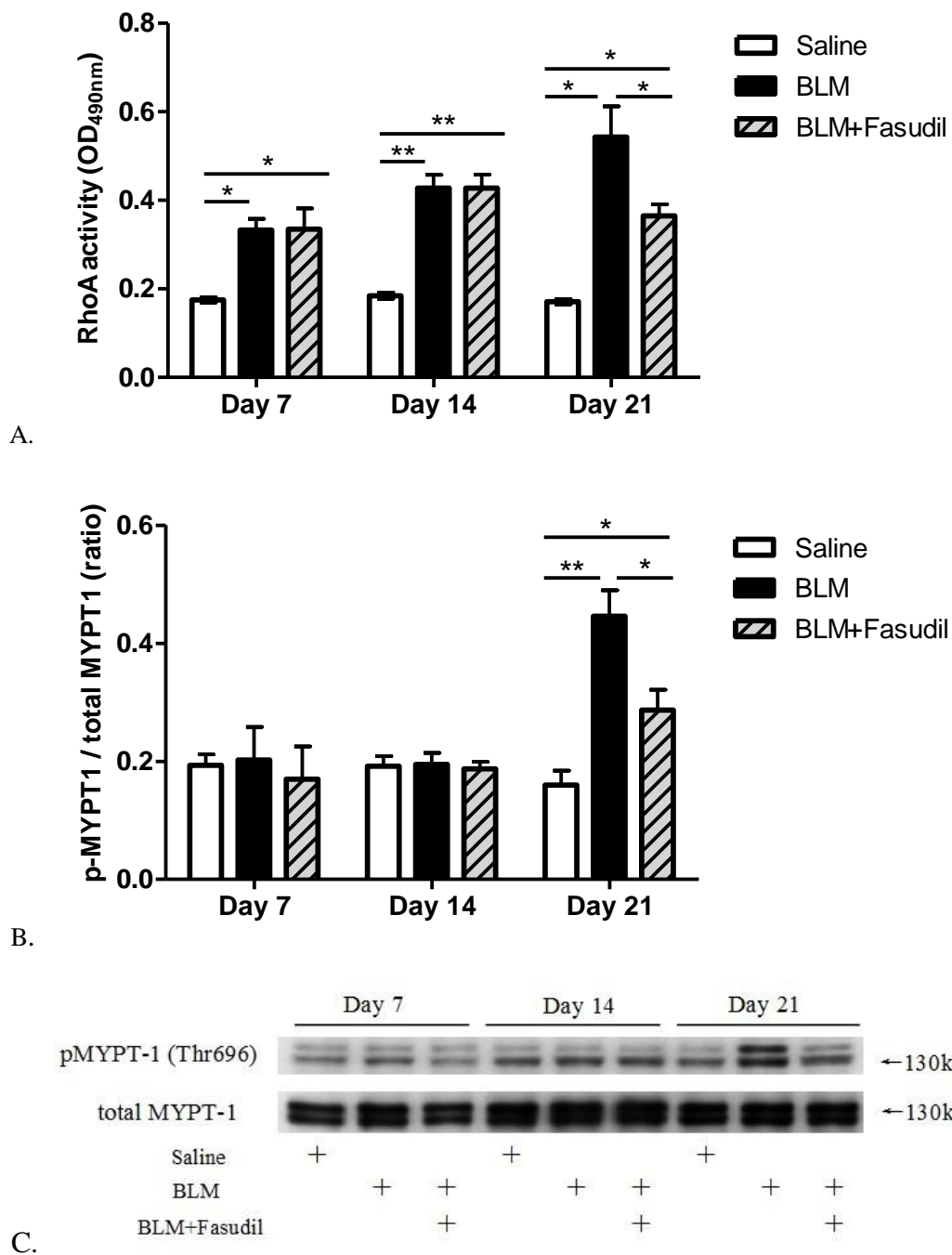
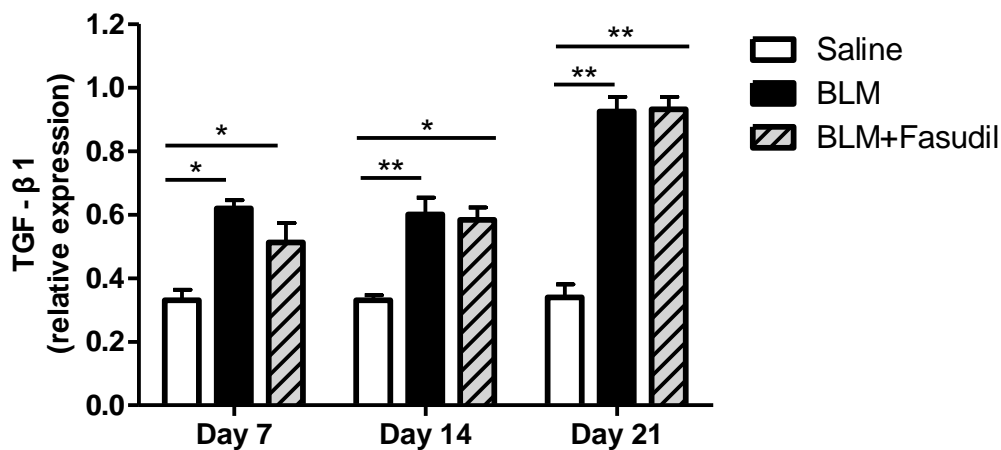


Fig. 7. Lung RhoA activity was progressively increased in mice treated with bleomycin, and ROCK activity was increased on day 21. Fasudil treatment significantly reduced both the increase in RhoA activity and ROCK activity on day 21. (A) RhoA activity in lung homogenates. (B) ROCK activity, as indicated by the ratio of p-MYPT1 / total MYPT1 measured by Western blot. (C) Western blot showing representative protein bands for p-MYPT1 and total MYPT1 in lung homogenates (n

= 4 in Saline group, n = 5 to 6 in BLM or BLM + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fasudil inhibited phosphorylation of Smad2/3. We next studied whether fasudil could inhibit the activation of TGF- β 1/Smad pathway associated with bleomycin instillation. As shown in Fig. 8A and 8B, bleomycin-instilled mice displayed a markedly higher protein expression of both TGF- β 1 and p-Smad2/3 in the lung at all three time-points, with the peak on day 21 (2.73-fold increase for TGF- β 1, $P < 0.01$ vs. Saline; 5.58-fold increase for p-Smad2/3, $P < 0.01$ vs. Saline). In comparison to bleomycin alone, fasudil significantly inhibited the upregulation of p-Smad2/3 protein expression by 19.77% on day 7 ($P < 0.05$), by 17.07% on day 14 ($P < 0.01$) and by 41.04% on day 21 ($P < 0.01$) (Fig. 8B). Nevertheless, bleomycin-associated upregulation of TGF- β 1 was not normalized by treatment with fasudil (Fig. 8A). Representative protein bands for TGF- β 1 and p-Smad2/3 are shown in Fig. 8C.



A.

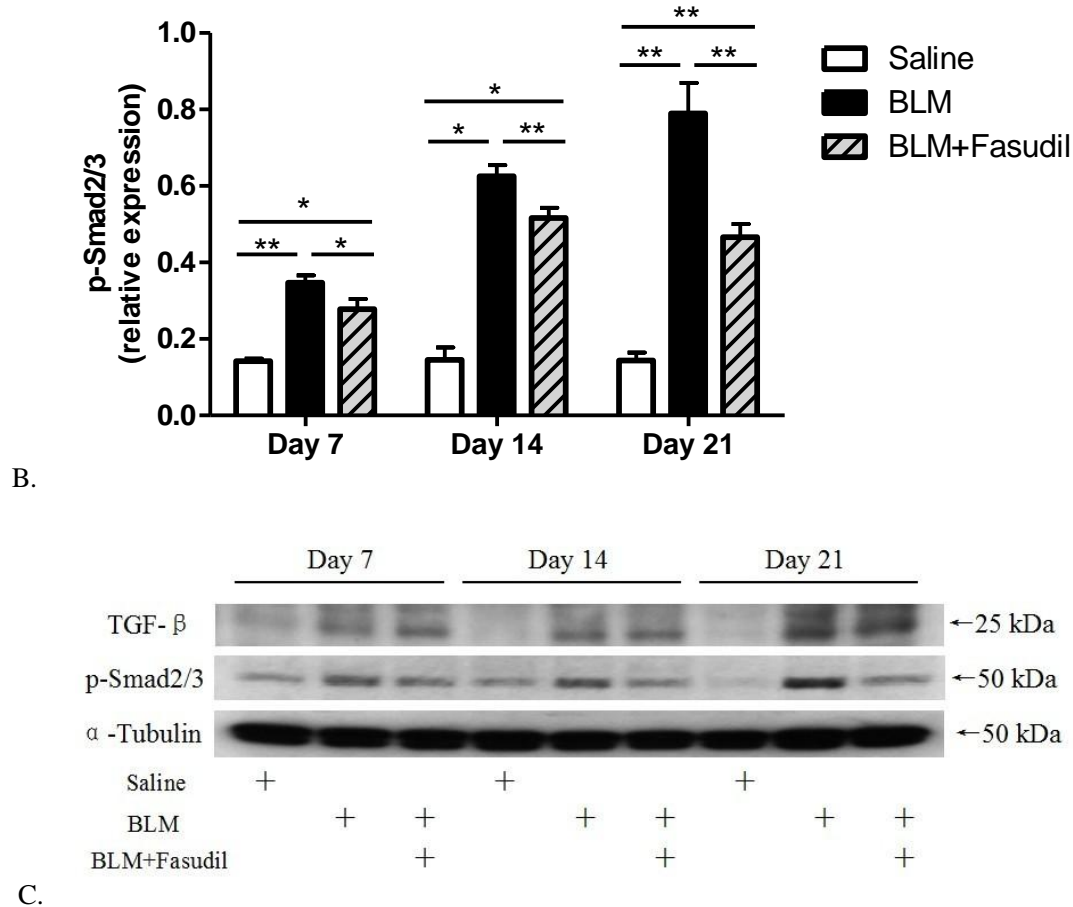


Fig. 8. Bleomycin induced the activation of TGF- β 1/Smad pathway in the lung, and fasudil inhibited the upregulated protein expression of p-Smad2/3. (A) Western blot analyses for relative protein expression of TGF- β 1 normalized by α -Tubulin in lung. (B) Western blot analyses for relative protein expression of p-Smad2/3 normalized by α -Tubulin in lung. (C) Western blot showing representative protein bands for TGF- β 1, p-Smad2/3 and α -Tubulin in lung homogenates ($n = 4$ in Saline group, $n = 5$ to 6 in BLM or BLM + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

DISCUSSION

In this study, we showed that long-term treatment with fasudil had protective effects against bleomycin-associated lung inflammation, PF and PH in mice, by reducing lung inflammatory cell infiltration, decreasing lung collagen content and fibrosis, lowering high RVSP, and impeding pulmonary vascular remodeling and RV

hypertrophy. Furthermore, we showed that bleomycin-associated TGF- β 1/Smad activation was partly altered by treatment with fasudil, through inhibition of Smad2/3 phosphorylation. To our knowledge, this is the first study demonstrating that long-term blockade of RhoA/ROCK pathway with fasudil improved bleomycin-induced lung inflammation, PF and PH, at least in part, via inhibition of Smad2/3 phosphorylation in TGF- β 1 signaling.

In intratracheal bleomycin-instilled rodent model, lung inflammatory response occurs within a short period of time. The recruitment of various types of inflammatory cells in airspaces and lung interstitium and their activation lead to the secretion of numerous pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 α , IL-6, etc.) and pro-fibrogenic markers (TGF- β 1, CTGF, etc.), that in turn cause myofibroblast activation and collagen deposition (6, 29). In the present study, bleomycin caused significant lung inflammation that peaked on day 7, sustained on day 14 and then regressed on day 21. Infiltration of neutrophils and macrophages in alveolar spaces was predominant at earlier time-points (day 7 and day 14) whereas lymphocytes B and lymphocytes T infiltration prevailed, notably around blood vessels, at later time-points (day 14 and day 21). Previous studies demonstrated that bleomycin-associated lung inflammatory response starts with an acute infiltration of neutrophils, followed by macrophages and lymphocytes infiltration (21, 25). Our findings of marked recruitment of lymphocytes B and lymphocytes T around blood vessels were intriguing, the significance of which might have been to date more or less underestimated by cells number count in BALF.

Anti-inflammatory effect of RhoA/ROCK blockade has been reported in various diseases, including rheumatoid arthritis, renal tubulointerstitial fibrosis and lung fibrosis (17, 32, 34, 42). In the present study, long-term treatment with fasudil significantly reduced total lung inflammation score on day 14. The anti-inflammatory effect of RhoA/ROCK blockade with fasudil in our study is consistent with results from previous studies, which showed that treatment with either Y-27632 or fasudil decreased total inflammatory cell numbers, including neutrophils and macrophages in BALF in mice (23, 42). In addition, Y-27632 also inhibited the migration of

neutrophils and macrophages *in vitro* (42). Different members of the Ras small G proteins superfamily, including RhoA, can activate multiple signaling pathways leading to the activation of transcription factors such as nuclear factor- κ B (NF- κ B) (30). Recent studies showed that Y-27632 or fasudil exhibits an anti-inflammatory effect in rheumatoid arthritis via inhibition of NF- κ B signaling (17, 34). In addition, evidence suggested that NF- κ B activation was implicated in lung inflammation in murine model of bleomycin-induced PF (16). The potential interaction between RhoA/ROCK pathway and NF- κ B signaling in bleomycin-associated inflammatory response needs to be further studied.

Lung fibrosis caused by bleomycin, as evidenced by the progressive increase in lung collagen content from day 7 to day 21, was significantly reduced by fasudil in the present study. Murine lung fibroblasts (MLF) obtained from bleomycin-treated mice expressed characteristic of myofibroblasts, and the ROCK inhibitor Y-27632 impeded migration of MLF as a result of inhibition of ROCK activation *in vitro* (42). Recent evidence suggests that myofibroblast contractility is closely related to persistent and progressive fibrosis (19, 46). RhoA/ROCK inactivates myosin light chain phosphatase (MLCP), leading to increased MLC phosphorylation and sustained myofibroblast contraction (37, 45). Relaxin causes dephosphorylation of MLC via inactivation of RhoA/ROCK pathway, that in turn alters myofibroblast contractility and prevents occurrence of lung fibrosis (19).

TGF- β 1/Smad3 pathway plays a key role to initiate and enhance tissue fibrosis (5). Development of fibrosis in the lung and in other tissues is less severe in Smad3 deficiency mice as compared with wild type animals (7, 12, 39, 48). Thus, Smad3 is believed to play a pivotal role in the mechanisms leading to fibrosis during tissue injury. There is evidence to suggest biological links between RhoA/ROCK activation and Smad2/3 phosphorylation. Kamaraju et al. showed that the linker region phosphorylation of Smad2/3 is affected by RhoA/ROCK pathway in human breast carcinoma cells (24). More recently, Chen et al. demonstrated that RhoA signaling regulates Smad activation during TGF- β 1-induced smooth muscle cell (SMC) differentiation (8). Long-term treatment with fasudil attenuates

bleomycin-induced PF by reducing TGF- β 1 mRNA and protein expression (23). In the present study, intratracheal bleomycin caused severe PF, whilst significantly upregulating protein expression of TGF- β 1 and p-Smad2/3 in the lung. Fasudil significantly reduced phosphorylation of Smad2/3, but did not modify TGF- β 1 protein expression in our study. Thus, in the present study, the anti-fibrotic effect of fasudil was at least partly due to its inhibition of Smad2/3 phosphorylation, even if TGF- β 1 protein expression was not modified.

In addition to Smad-dependent pathway, TGF- β 1 can also activate RhoA and its effector protein ROCK, via a Smad-independent signaling (9). The activation of RhoA/ROCK pathway is involved in TGF- β 1-induced changes in cytoskeletal organization and epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EMT), and the latter provides other sources of myofibroblasts other than resident fibroblasts during tissue fibrosis (4, 47). Rho-dependent activation of JNK also contributes to Smad activation (11). As a whole, in the present study, the protective effect of fasudil against PF may be related to both Smad-dependent and Smad-independent pathway in TGF- β 1 signaling, as well as the complex interaction between RhoA/ROCK activation and Smad2/3 phosphorylation.

According to previous studies, a single intratracheal instillation of bleomycin can also induce PH in rodents after the development of acute lung inflammatory response and subsequent lung fibrosis (18, 35, 40). In these studies, certain compounds, such as Enalapril (angiotensin-converting enzyme inhibitor), Sildenafil (PDE5 inhibitor) and Bosentan (ET-1 receptor antagonist) were proven effective to improve both PF and PH in bleomycin-instilled rodents. Hennes et al. indicated that PDE5A inhibition improves bleomycin-induced PF and PH via inhibition of RhoA/ROCK activation in both lung and RV tissues (18). McNamara et al. demonstrated that a single intraperitoneal bolus of either Y-27632 or fasudil normalizes PVR in neonatal rats treated with daily intraperitoneal bleomycin (28). However, effect of long-term treatment with fasudil in bleomycin-induced PF plus PH has never been reported before. To our knowledge, the present study is the first to demonstrate the beneficial effect of long-term treatment with fasudil in

bleomycin-induced PF and PH in mice.

In our study, bleomycin-associated vascular remodeling appeared before PH, as shown by the significant increase in pulmonary arteriole muscularization and medial wall thickening on day 7. The relative reduced pulmonary arteriole muscularization on day 21 may probably be related to vessels loss associated with lung structural alterations during tissue fibrosis, contributing to overall reduction of vessel density and elevated PVR (38). Treatment with fasudil significantly reduced vascular remodeling, RV hypertrophy and increased RVSP associated with bleomycin instillation. MYPT1, one of the downstream substrates of ROCK, has been largely studied in various cardiovascular diseases, including PH. The RhoA/ROCK activation associated phosphorylation of MYPT1 is responsible for the repression of MLCP activity, causing an increased level of phospho-MLC and sustained SMC contraction (27). In the present study, lung ROCK activity, as indicated by the ratio of p-MYPT1 / total MYPT1, was markedly increased on day 21, simultaneously with the enhanced gravity of PH and RV hypertrophy in bleomycin-instilled mice. Thus, the protective effect of fasudil against the aggravation of bleomycin-induced PH was due to the inhibition of lung RhoA/ROCK activation as indicated by reduced expression of p-MYPT1. In our study the ROCK activity was augmented only by day 21, whereas the protective effect of fasudil against PF and PH occurred earlier than day 21. One explanation is the involvement of different downstream effectors in RhoA signaling, distinct from MYPT1. It is unlikely that the phosphorylation of MYPT1 by RhoA/ROCK activation mediates all of its biological effects. In the present study, lung RhoA activity was significantly increased at all three designed time-points in bleomycin-instilled mice. Furthermore, we showed that the antifibrotic effect of fasudil was related to the inhibition of Smad2/3 phosphorylation in TGF- β 1 signaling. Thus, other potential downstream effectors of the RhoA/ROCK pathway, as well as their interactions with other pathways need to be further studied concerning the development of PF and PH.

In conclusion, the present study shows that long-term treatment with fasudil exhibits protective effects against bleomycin-associated lung inflammation, PF and

PH in mice. Moreover, fasudil leads to the inhibition of Smad2/3 phosphorylation in TGF- β 1 signaling, thus linking the two pathways in PF and PH due to bleomycin instillation. The encouraging results of this study suggest that fasudil may be a promising treatment for PH secondary to PF.

REFERENCES

1. **Abe K, Tawara S, Oi K, Hizume T, Uwatoku T, Fukumoto Y, Kaibuchi K, Shimokawa H.** Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 48: 280–285, 2006.
2. **Barman SA, Zhu S, White RE.** RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 5: 663–671, 2009.
3. **Behr J, Ryu JH.** Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* 31: 1357–1367, 2008.
4. **Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL.** Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 12: 27–36, 2001.
5. **Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG.** TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29: 196–202, 2011.
6. **Bringardner BD, Baran CP, Eubank TD, Marsh CB.** The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Antioxidants & Redox Signaling* 10: 287–302, 2008.
7. **Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, Wang X-F, Frangogiannis NG.** Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation* 116: 2127–2138, 2007.
8. **Chen S, Crawford M, Day RM, Briones VR, Leader JE, Jose PA, Lechleider RJ.** RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 281: 1765–1770, 2006.
9. **Derynck R, Zhang YE.** Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577–584, 2003.
10. **Duong-Quy S, Bei Y, Liu Z, Dinh-Xuan AT.** Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. *Pharmacology & Therapeutics* 137: 352–364, 2013.
11. **Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL.** Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 274:

- 37413–37420, 1999.
12. **Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, Major C, Deng C, Russo A, Mitchell JB, Roberts AB.** Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am. J. Pathol.* 160: 1057–1068, 2002.
 13. **Fujita H, Fukumoto Y, Saji K, Sugimura K, Demachi J, Nawata J, Shimokawa H.** Acute vasodilator effects of inhaled fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart Vessels* 25: 144–149, 2010.
 14. **Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, Abe K, Takeshita A, Shimokawa H.** Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart* 91: 391–392, 2005.
 15. **Guilluy C, Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Gu érin P, Sagan C, Pacaud P, Loirand G.** Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway is involved in the beneficial effect of sildenafil on pulmonary hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 146: 1010–1018, 2005.
 16. **Gurujeyalakshmi G, Wang Y, Giri SN.** Taurine and niacin block lung injury and fibrosis by down-regulating bleomycin-induced activation of transcription nuclear factor-kappaB in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293: 82–90, 2000.
 17. **He Y, Xu H, Liang L, Zhan Z, Yang X, Yu X, Ye Y, Sun L.** Antiinflammatory effect of Rho kinase blockade via inhibition of NF-kappaB activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 58: 3366–3376, 2008.
 18. **Hemnes AR, Zaiman A, Champion HC.** PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294: L24–33, 2008.
 19. **Huang X, Gai Y, Yang N, Lu B, Samuel CS, Thannickal VJ, Zhou Y.** Relaxin regulates myofibroblast contractility and protects against lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* 179: 2751–2765, 2011.
 20. **Ishikura K, Yamada N, Ito M, Ota S, Nakamura M, Isaka N, Nakano T.** Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ. J.* 70: 174–178, 2006.
 21. **Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R.** Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 83: 111–119, 2002.
 22. **Jiang BH, Tawara S, Abe K, Takaki A, Fukumoto Y, Shimokawa H.** Acute vasodilator effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 49: 85–89, 2007.
 23. **Jiang C, Huang H, Liu J, Wang Y, Lu Z, Xu Z.** Fasudil, a rho-kinase inhibitor, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Int J Mol Sci* 13: 8293–8307, 2012.

24. **Kamaraju AK, Roberts AB.** Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J. Biol. Chem.* 280: 1024–1036, 2005.
25. **Kamata H, Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Shinoda H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Ishii M, Hasegawa N, Takamiya R, Fujishima S, Takano H, Ishizaka A.** Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 236: 315–324, 2011.
26. **Li F, Xia W, Yuan S, Sun R.** Acute inhibition of Rho-kinase attenuates pulmonary hypertension in patients with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 30: 363–366, 2009.
27. **Loirand G, Guérin P, Pacaud P.** Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ. Res.* 98: 322–334, 2006.
28. **McNamara PJ, Murthy P, Kantores C, Teixeira L, Engelberts D, van Vliet T, Kavanagh BP, Jankov RP.** Acute vasodilator effects of Rho-kinase inhibitors in neonatal rats with pulmonary hypertension unresponsive to nitric oxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294: L205–213, 2008.
29. **Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M.** The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 362–382, 2008.
30. **Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC.** Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J. Biol. Chem.* 273: 12779–12785, 1998.
31. **Mouchaers KTB, Schaliij I, de Boer MA, Postmus PE, van Hinsbergh VWM, van Nieuw Amerongen GP, Vonk Noordegraaf A, van der Laarse WJ.** Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: comparison with bosentan and sildenafil. *Eur. Respir. J.* 36: 800–807, 2010.
32. **Nagatoya K, Moriyama T, Kawada N, Takeji M, Oseto S, Murozono T, Ando A, Imai E, Hori M.** Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 61: 1684–1695, 2002.
33. **Nozik-Grayck E, Suliman HB, Majka S, Albietz J, Van Rheen Z, Roush K, Stenmark KR.** Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295: L422–430, 2008.
34. **Okamoto H, Yoshio T, Kaneko H, Yamanaka H.** Inhibition of NF-kappaB signaling by fasudil as a potential therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 62: 82–92, 2010.
35. **Ortiz LA, Champion HC, Lasky JA, Gambelli F, Gozal E, Hoyle GW, Beasley MB,**

- Hyman AL, Friedman M, Kadowitz PJ.** Enalapril protects mice from pulmonary hypertension by inhibiting TNF-mediated activation of NF-kappaB and AP-1. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282: L1209–L1221, 2002.
36. **Ou X, Feng Y, Wen F, Huang X, Xiao J, Wang K, Wang T.** Simvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chin. Med. J.* 121: 1821–1829, 2008.
37. **Parizi M, Howard EW, Tomasek JJ.** Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase. *Exp. Cell Res.* 254: 210–220, 2000.
38. **Renzone EA, Walsh DA, Salmon M, Wells AU, Sestini P, Nicholson AG, Veeraraghavan S, Bishop AE, Romanska HM, Pantelidis P, Black CM, Du Bois RM.** Interstitial vascularity in fibrosing alveolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167: 438–443, 2003.
39. **Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A.** Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest.* 112: 1486–1494, 2003.
40. **Schroll S, Arzt M, Sebah D, Nüchterlein M, Blumberg F, Pfeifer M.** Improvement of bleomycin-induced pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis by the endothelin receptor antagonist Bosentan. *Respir Physiol Neurobiol* 170: 32–36, 2010.
41. **Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, Vuiblet V, Guillevin L, Mouthon L, Weill B, Batteux F.** Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J. Immunol.* 182: 5855–5864, 2009.
42. **Shimizu Y, Dobashi K, Iizuka K, Horie T, Suzuki K, Tukagoshi H, Nakazawa T, Nakazato Y, Mori M.** Contribution of small GTPase Rho and its target protein rock in a murine model of lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: 210–217, 2001.
43. **Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R, Klinman DM.** Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 162: 6284–6293, 1999.
44. **Tawara S, Fukumoto Y, Shimokawa H.** Effects of combined therapy with a Rho-kinase inhibitor and prostacyclin on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50: 195–200, 2007.
45. **Tomasek JJ, Vaughan MB, Kropp BP, Gabbiani G, Martin MD, Haaksma CJ, Hinz B.** Contraction of myofibroblasts in granulation tissue is dependent on Rho/Rho kinase/myosin light chain phosphatase activity. *Wound Repair Regen* 14: 313–320, 2006.
46. **Wipff P-J, Rifkin DB, Meister J-J, Hinz B.** Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 179: 1311–1323, 2007.

47. **Xu J, Lamouille S, Derynck R.** TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19: 156–172, 2009.
48. **Zhao J, Shi W, Wang Y-L, Chen H, Bringas P Jr, Datto MB, Frederick JP, Wang X-F, Warburton D.** Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282: L585–593, 2002.

III. Troisième étude:

Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la fibrose cutanée et l'atteinte pulmonaire (FP et/ou HTP) dans un modèle murin de ScS induite par injection intradermique d'HOCl

Etat de la question

La ScS est une maladie hétérogène du tissu conjonctif, caractérisée par un désordre du système immunitaire, un dysfonctionnement endothélial et une fibrose progressive non seulement de la peau mais aussi des principaux organes internes dont le tube digestif, et notamment l'œsophage, les reins, le cœur et les poumons (Gabrielli et al., 2009). L'atteinte pulmonaire a deux expressions cliniques : la FP et l'HTP, qui peuvent exister soit isolément, soit associée l'une à l'autre. Ensemble, ces deux complications pulmonaires de la ScS représentent actuellement la principale cause de mortalité liée à la ScS (Steen and Medsger, 2007). L'inefficacité relative des agents immunosuppresseurs et antifibrotiques devant l'évolution de la maladie justifie pleinement les efforts actuels pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

En plus de son rôle dans l'HTP, la voie RhoA/ROCK est aussi impliquée dans la physiopathologie de certaines maladies fibrotiques, comme la fibrose myocardique, pulmonaire, rénale et hépatique, où le traitement par le fasudil montre des effets protecteurs contre l'inflammation et la fibrose (Ikeda et al., 2007; Ishimaru et al., 2007; Satoh et al., 2002; Shimizu et al., 2001). Les mécanismes par lesquels l'inhibition de la voie RhoA/ROCK améliore la fibrose tissulaire ne sont pas encore clairement compris. Les études précédentes ont suggéré que cela pourrait être lié au rôle de la voie RhoA/ROCK dans les fonctions cellulaires basales, comme la migration, la prolifération, la différenciation et la contraction, surtout celles des fibroblastes et des myofibroblastes (Akhmetshina et al., 2008; Huang et al., 2011; Parizi et al., 2000; Tomasek et al., 2006; Watts and Spiteri, 2004; Watts et al., 2005). Le TGF- β est un facteur de croissance jouant un rôle central dans la fibrogenèse de la ScS, en régulant l'activation des fibroblastes et la production du collagène (Biernacka

et al., 2011; Ihn, 2008; Verrecchia et al., 2006). La voie RhoA/ROCK peut d'une part être activée par le TGF- β , de façon indépendante des molécules Smad2/3, et d'autre part, interférer avec la phosphorylation de Smad2/3 induite par le TGF- β (Biernacka et al., 2011; Varga and Abraham, 2007). Une étude récente a montré que l'activation de la voie RhoA/ROCK favorise la différenciation et la production *in vitro* de la MEC au niveau des fibroblastes cutanés des patients atteints de ScS, et que l'effet du TGF- β est dépendant de l'activation des ROCK (Akhmetshina et al., 2008).

Un modèle murin de ScS induite par injection intradermique d'HOCl a été récemment décrit, dans lequel la fibrose cutanée ainsi que la FP se développent chez la souris ayant reçu des injections d'HOCl (Batteux et al., 2011). Malgré la mise en évidence de la FP due aux effets toxiques d'HOCl, nous ne savons pas si le stress oxydatif induit par ce dernier est aussi capable d'induire une HTP chez la souris. De plus, le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de la fibrose cutanée et de l'atteinte pulmonaire associées à la ScS dans ce modèle n'a pas encore été étudié.

Le but de ce travail est d'étudier le rôle de la voie RhoA/ROCK, ainsi que son interaction avec la voie TGF- β , dans la physiopathologie de la fibrose cutanée et de l'atteinte pulmonaire (FP et/ou HTP) dans un modèle murin de ScS induite par injection intradermique d'HOCl et d'observer les conséquences de l'inhibition de la voie RhoA/ROCK par le fasudil sur les atteintes précitées.

Matériels et méthodes

L'injection intradermique d'HOCl a été réalisée pour induire la ScS expérimentale chez les souris selon le protocole décrit par l'équipe du Pr Batteux (Servettaz et al., 2009; Batteux et al., 2011). Les souris étaient réparties de façon aléatoire en 3 groupes: 1) Groupe PBS (n = 5) ; 2) Groupe HOCl (n = 6) ; 3) Groupe HOCl + fasudil (n = 6). 500 μ l d'HOCl a été injecté par voie intradermique sur les deux côtés du bas du dos rasé de la souris (250 μ l/côté) cinq jours par semaine pendant 8 semaines. Les animaux témoins ont reçu des injections intradermiques de 500 μ l de PBS. Le traitement avec le fasudil (30 mg/kg/jour) ou le véhicule a été

administré par gavage 5 jours par semaine jusqu'à la veille du sacrifice. L'épaisseur du pli cutané a été mesurée au niveau du site d'injection une fois par semaine. Au jour du sacrifice, la pression systolique du ventricule droit (PSVD) et l'hypertrophie du VD ont été mesurés. Après sacrifice, la fibrose cutanée et la FP ont été évalués par des techniques biochimique et histopathologique. Les profils des cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages, lymphocytes B et T), ainsi que l'expression pulmonaire de la NOS-2, étaient évalués par immunomarquages. Les expressions protéiques cutanées et pulmonaires de 3-Nitrotyrosine (3-NT), α -SMA, TGF- β 1, pSmad2/3 et pERK1/2 ont été mesurées par Western blot. Les activités de RhoA et de ROCK ont été mesurées par colorimétrie quantitative (G-LISA RhoA Activation Assay, Cytoskeleton) ou par Western blot dans les fibroblastes cutanés primaires et les biopsies pulmonaires.

Principaux Résultats

L'injection intradermique d'HOCl induisait la fibrose cutanée et la FP chez la souris. L'inhibition de la voie RhoA/ROCK par le fasudil diminuait significativement la quantité de collagène dans les biopsies cutanées et pulmonaires. L'HOCl n'induisait pas d'augmentation de la PSVD ou de l'hypertrophie du VD chez la souris.

Une infiltration importante de neutrophiles et de macrophages dans les tissus interstitiels pulmonaires a été notée. Cet infiltrat inflammatoire s'accompagnait d'une surexpression de la NOS-2 au niveau de l'épithélium bronchiolaire. Le fasudil améliorait l'infiltration de neutrophiles et de macrophages, et diminuait l'expression de NOS-2 dans les poumons.

L'activité des ROCK, indiquée par une phosphorylation de MYPT1, était significativement élevée au niveau des fibroblastes cutanés. L'HOCl augmentait de façon significative l'expression de 3-NT, α -SMA et TGF- β 1, ainsi que la phosphorylation de Smad2/3 et de ERK1/2 dans les biopsies cutanées. Le traitement avec le fasudil diminuait significativement l'expression de 3-NT et de α -SMA, et

inhibait la phosphorylation de Smad2/3 et des protéines ERK1/2.

Conclusions

Les résultats de cette troisième étude montrent que la fibrose cutanée induite par l'HOCl est associée à une activation de la voie RhoA/ROCK au niveau de la peau. L'atteinte cutanée est améliorée par un traitement avec le fasudil, agissant via l'inhibition de la phosphorylation de Smad2/3 et d'ERK1/2. Le fasudil montre un effet protecteur contre la fibrose cutanée et la FP dans ce modèle de souris sclérodermique.

Fasudil Prevents Skin and Lung Fibrosis in HOCl-Induced Systemic Sclerosis in Mice

Yihua Bei¹, Thong Hua-Huy¹, Sy Duong-Quy¹, Carole Nicco², Christiane Chéreau², Frédéric Batteux², and Anh Tuan Dinh-Xuan¹.

¹ Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Laboratoire de Physiologie Respiratoire, EA 2511, 24 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

² Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Laboratoire d'Immunologie Biologique, EA 1833, Hôpital Cochin, 27 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

Corresponding Author

Anh Tuan Dinh-Xuan, MD, PhD, Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles, Hôpital Cochin, 27 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

E-mail: anh-tuan.dinh-xuan@cch.aphp.fr

Key words: RhoA, Rho-kinases, fasudil, systemic sclerosis, fibrosis.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterized by vascular injury, immune system disorders, and excessive fibrosis of skin and internal organs. Previous studies have shown that the RhoA/Rho-kinases (ROCK) pathway is implicated in various fibrogenic diseases. We investigated whether fasudil, a selective ROCK inhibitor, could reduce skin and lung fibrosis in a mouse model of SSc. Female C57BL/6 mice received daily intradermal injection of HOCl for 8 weeks to induce SSc, with and without daily treatment with fasudil ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) by oral gavage. HOCl induced higher levels of ROCK activity in the skin fibroblasts from mice. Treatment with fasudil reduced dermal thickness, collagen contents, and α -SMA and nitrotyrosine expression in the fibrotic skin of HOCl-mice, through inhibition of phosphorylation of Smad2/3 and ERK1/2. Moreover, fasudil reduced lung interstitial infiltration of neutrophils and macrophages, and prevented lung fibrosis in HOCl-mice. These observations have suggested that RhoA/ROCK pathway is involved in the pathogenesis of SSc. Fasudil, a ROCK inhibitor, might be a promising therapeutic approach in the treatment of SSc.

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a heterogeneous connective tissue disease characterized by vascular injury, immune system disorders, and excessive fibrosis of skin and a variety of internal organs (Gabrielli et al., 2009). Pulmonary complications, including pulmonary fibrosis (PF) and pulmonary hypertension (PH), represent two main causes of death in SSc patients (Steen and Medsger, 2007). SSc is considered incurable, and current immunosuppressive and anti-fibrotic agents failed to prevent disease progression in patients, highlighting the need to clarify the pathogenesis of SSc and to identify novel therapeutic targets.

The small GTPase RhoA, and its effector proteins, Rho-kinases (ROCK), play a crucial role in actin formation and organization and cytoskeleton rearrangement. Apart from or through these effects, the RhoA/ROCK pathway is strongly involved in a wide range of cell functions, such as migration, differentiation, proliferation and contraction (Loirand et al., 2006). The abnormal activation of this pathway plays an essential role in the development of PH, by causing and worsening endothelial dysfunction, vasoconstriction and vascular remodeling (Duong-Quy et al., 2013). Recent studies have shown that the RhoA/ROCK pathway is also implicated in fibrogenic diseases, such as myocardial, pulmonary, renal and hepatic fibrosis, in which, fasudil, an selective inhibitor of ROCK, has been shown to reduce inflammatory and fibrotic changes (Ikeda et al., 2007; Ishimaru et al., 2007; Satoh et al., 2002; Shimizu et al., 2001). The mechanism underlying the role of RhoA/ROCK pathway in tissue fibrosis remains unclear. Previous studies have suggested that it might be related to its effects on basal cell functions, such as migration, proliferation, differentiation and contraction, especially those of fibroblasts and myofibroblasts, the major cell types in fibrotic lesions (Akhmetshina et al., 2008; Huang et al., 2011; Parizi et al., 2000; Shimizu et al., 2001; Tomasek et al., 2006; Watts and Spiteri, 2004; Watts et al., 2005). Increasing evidence suggests that transforming growth factor- β (TGF- β) is a central mediator of fibrogenesis in SSc, by enhancing myofibroblast activation and collagen production (Biernacka et al., 2011; Ihn, 2008; Verrecchia et al., 2006). The RhoA/ROCK pathway can be triggered by TGF- β , either mediating

Smad-independent TGF- β responses or regulating Smad phosphorylation in TGF- β signaling (Biernacka et al., 2011; Varga and Abraham, 2007). One recent study has shown that ROCK stimulates myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in SSc fibroblasts *in vitro*, and that TGF- β activates ERK in a ROCK-dependent manner (Akhmetshina et al., 2008).

These observations have encouraged us to test fasudil, an ROCK inhibitor, in a mouse model of SSc induced by intradermal injection of hypochlorous acid (HOCl) that produces skin and lung fibrosis.

METHODS

Animal model. Six-week-old female C57BL/6 mice were purchased from Harlan (Harlan, Gannat, France). All mice were housed in autoclaved ventilated cages with a 12 h day–night cycle and free access to water and food according to animals guidelines for biomedical research applied in our institution.

Mice were randomly divided into 3 groups: 1) PBS control (n=5); 2) HOCl (n=6); 3) HOCl + Fasudil (n=6). Daily intradermal injection of substances generating hypochlorous acid (HOCl) was used to induce SSc in mice as previously described (Servettaz et al., 2009). HOCl was prepared by adding NaClO solution (9.6% active chlorine) to KH₂PO₄ solution (100 mM, pH 6.2) just before the injection every day. HOCl concentration was determined by measuring the optical density (OD) at 280 nm and then adjusted to an OD between 0.7 to 0.9. A total of 500 μ L of HOCl was injected intradermally into 2 sites of the back of mice (250 μ L per site) 5 days per week for 8 weeks (HOCl-mice). Control group received daily injections of 500 μ L of PBS (PBS-mice). Treatment with fasudil (30 mg kg⁻¹ day⁻¹, dissolved in PBS with a dilution of 2 mg/mL, LC laboratories, Woburn, MA) or vehicle was administrated by gavage 5 days per week until the day of sacrifice.

Three days after the end of injections, mice were anesthetized with intraperitoneal ketamine (100 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg), and right ventricular systolic pressure (RVSP) was measured *in vivo*. After hemodynamic evaluation, the thorax was opened and heart samples were removed for right ventricular (RV)

hypertrophy measurement. Left lungs were perfused with 10% formalin for histopathological analysis and right lungs were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skin biopsies were obtained from the injection sites with a punch (6 mm in diameter). Right lung samples and skin biopsies were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use for collagen content quantification or protein extraction.

Hemodynamic measurement. On the day of sacrifice, RVSP was measured in all mice via a closed-chest technique as previously described (Nozik-Grayck et al., 2008). Briefly, mice were anesthetized with intraperitoneal ketamine (100 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg). A 25-gauge needle attached to a pressure transducer was punctured directly into the RV. Pressure curve was gained by a 4-channel data acquisition system (Lab-Trax-4, World Precision Instruments, UK) and recorded simultaneously by running the software Labscribe2.

After hemodynamic measurement, the abdominal aorta was cut and the thorax was opened. Heart sample was removed and the RV was dissected from the left ventricle (LV) plus septum (S) and the ratio of $\text{RV} / (\text{LV} + \text{S})$ weight was calculated to evaluate RV hypertrophy.

Dermal thickness. The dermal thickness within the injection sites was measured with a caliper and expressed in millimeters (mm). Measurements were performed before the first injection and then once a week until the day of sacrifice by the same operator.

Collagen content in skin and lung. Collagen content in skin and lung was determined by the quantitative dye-binding sircol method (Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK) as previously described. Briefly, skin biopsies from the injection regions (6 mm in diameter) and right lung tissues were diced into small pieces and then mixed with pepsin (1:10 weight ratio) and 0.5 M acetic acid at room temperature for one week. After centrifugation at 1,500 rpm for 15 minutes, 1 mL of sirius red reagent was added into 50 μL of skin sample supernatant and 200 μL of lung tissue supernatant, respectively. Tubes were rocked during the incubation at room temperature for 30 minutes and then centrifugated at 20,000 g at room temperature for 20 minutes. The supernatant was discarded and 1 ml of 0.5 M NaOH was added to the

collagen-dye pellets. Absorbance was read at 540 nm on a microplate reader versus a standard range of bovine collagen type I concentrations. Results were presented as μg of collagen/punch biopsy for skin, and μg of collagen/lobe lung tissue, respectively.

Lung histopathological analysis. Left lungs were embedded in paraffin. A series of 5 μm -thick sections were prepared from the mid-portion of paraffin-embedded tissue, and stained with hematoxylin-eosin for routine examination and picro-sirius red for lung fibrosis analysis. Slides were examined with a light microscope at a 100-fold magnification (Leica DC300, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Immunohistochemical staining for inflammatory cells and iNOS expression in lung. To evaluate lung inflammatory cells profiles, macrophages, neutrophils, lymphocytes T (CD3) and lymphocytes B (CD20) were immunohistochemically stained with macrophage marker antibody (1:100, Santa Cruz, sc-101447), neutrophil marker antibody (1:1000, Santa Cruz, sc-71674), CD3 antibody (1:400, Santa Cruz, sc-101442) and CD20 antibody (1:250, Santa Cruz, sc-7735), respectively. Briefly, 5 μm -thick sections of lung tissues were deparaffinised in xylene and rehydrated with descending concentrations of ethanol. Endogenous peroxidase activity was blocked by 0.3% H_2O_2 in methanol for 30 minutes. Antigen retrieval was performed by protease for 30 minutes. Sections were washed and blocked by 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS-Tween (0.05%) for 1 hour and then incubated with one of the four antibodies as described above, diluted in 1% BSA for 2 hours. After washed with PBS-Tween (0.05%), sections were incubated with biotinylated goat anti-rat or horse anti-goat IgG antibody (1:200 in 1% BSA, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) for 1 hour. After incubation with avidin-biotinylated enzyme complex (Vectastain ABC kit, Vector laboratories) for 30 minutes, staining was finally visualized by using diaminobenzidine (DAB). Sections were then counterstained by hematoxylin and dehydrated with increasing concentrations of ethanol. For analysis of each inflammatory cell, about 20 to 25 fields of each lung section were randomly chosen and microscopically photographed with a 200-fold magnification. The number of lung interstitial inflammatory cells in

each photographed field was counted by two “blind” observers. The results were presented as the number of each inflammatory cell per photographed field (200x), and calculated from the mean of 5 to 6 animals per group.

To evaluate iNOS expression in lung tissues, we further performed immunohistochemical staining on the same lung sections for iNOS (1:100, Santa Cruz, sc-651). Main steps were performed as described above except that antigen retrieval was realized with sodium citrate buffer (10 mM, pH 6.0) heated in microwave for 10 minutes. For analysis, about 20 fields of each lung section were microscopically photographed with a 200-fold magnification and then analyzed by two “blind” observers. Semi-quantitative evaluation for iNOS expression in bronchial and bronchiolar epithelium was scored according to the following scale: (0) no staining; (1) focal staining; (2) diffuse weak staining; (3) diffuse moderate staining; and (4) diffuse strong staining. The results were presented as the mean score of 5 to 6 animals per group.

Western Blot analyses of 3-NT, α -SMA, TGF- β 1, p-Smad2/3, pERK1/2 in skin and lung. Skin biopsies from the injection regions (6 mm in diameter), as well as lung samples, were homogenized in ice cold RIPA lysis buffer (Cell Signaling, #9806) supplemented with protease and phosphatase inhibitor tablets (Thermo, 88664), and then centrifugated at 15,000 rpm at 4 °C for 20 minutes.

Protein extracts (30 μ g per tissue sample) were subjected to electrophoreses on SDS-Page gels (7.5% for 3-NT, α -SMA and p-ERK1/2; 12% for TGF- β 1 and p-Smad2/3), and then transferred to nitrocellulose membranes. Blots were blocked with 5% milk and then incubated with mouse anti-Nitrotyrosine antibody (1:100, Santa Cruz, sc-32731), rabbit anti- α -SMA antibody (1:500, Santa Cruz, sc-130619), goat anti-p-ERK1/2 antibody (1:500, Santa Cruz, sc-16982), rabbit anti-TGF- β 1 antibody (1:250, Santa Cruz, sc-146) and goat anti-p-Smad2/3 antibody (1:500, Santa Cruz, sc-11769) overnight at 4 °C, respectively. Membranes were then incubated with HRP-conjugated secondary antibody (1:10,000, Santa Cruz) for 45 minutes at room temperature. Protein bands were developed on Hyperfilm (Amersham) by using enhanced chemiluminescence (ECL plus reagent, Amersham). Densitometric analysis

of protein bands were performed using ImageJ software. Membranes were then stripped and reblotted for mouse anti- β -actin antibody (1:5000, Santa Cruz, sc-47778), mouse anti-ERK1/2 antibody (1:500, Santa Cruz, sc-135900), and goat anti-Smad2/3 antibody (1:250, Santa Cruz, sc-6202) overnight at 4 °C, followed by incubation with HRP-conjugated goat anti-mouse or rabbit anti-goat IgG secondary antibody (1:10,000, Santa Cruz) for 45 minutes. Loading volume of each sample was normalized by β -actin protein band density. Relative phosphorylation of ERK1/2 and Smad2/3 was normalized by total ERK1/2 and Smad2/3 protein expression, respectively.

RhoA and ROCK activity in lung and primary skin fibroblasts. RhoA activity was measured by 96-well G-LISA RhoA Activation Assay (Cytoskeleton, Denver, CO, USA). Briefly, protein extracts from lung tissues were quickly prepared as described above. For the isolation of skin fibroblasts, skin fragments were collected from the injection sites and then digested with Liver Digest Medium (Invitrogen, 17703-034) for 4 hours at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After three washes in complete medium, cells were seeded into sterile 75 cm² flasks and cultured in DMEM/Glutamax-High glucose (Invitrogen, 32430-027) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (100 IU/mL penicillin, 100 IU/mL streptomycin and 0.25 μ g/mL fungizone). Primary skin fibroblasts were washed three times, lysed with ice cold RIPA containing protease and phosphatase inhibitor tablets, and then centrifugated at 15,000 rpm at 4 °C for 20 minutes. Protein concentrations were then measured by Precision Red Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton, ADV02) and were finally equalized with ice cold lysis buffer to 0.7 mg/ml for lung and 0.4 mg/ml for skin fibroblasts. Equalized homogenates, containing 17.5 μ g of total protein for lung and 10 μ g of total protein for skin fibroblasts, were transferred to a Rho-GTP-binding protein precoated plate. The plate was placed on a cold orbital shaker at 200 rpm for 30 minutes, and then incubated with anti-RhoA primary antibody (1/250), followed by secondary antibody (1/62.5) on a microplate shaker at 200 rpm at room temperature for 45 minutes each. The plate was then incubated with HRP detection reagent at 37 °C for

15 minutes. After HRP stop buffer was added, absorbance was read at 490 nm.

ROCK activity was quantified by MYPT1 phosphorylation on Thr-696, relative to total MYPT1 expression by Western blot analyses in protein extracts of lung and skin fibroblasts. Briefly, protein extracts (50 µg per lung sample and 20 µg per cell sample) were subjected to electrophoreses on 7.5%-4% SDS-Page gels, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with rabbit anti-phospho-MYPT1 (Thr-696) antibody (1:500, Upstate, ABS45) overnight. Goat anti-rabbit IgG-HRP (1:5000, Santa Cruz, sc-2004) was used as secondary antibody. Protein bands were developed on Hyperfilm (Amersham) by using enhanced chemiluminescence (ECL plus reagent, Amersham). Membranes were then stripped and reblotted with rabbit anti-MYPT1 (H-130) antibody (1:1000, Santa Cruz, sc-25618) overnight at 4 °C. Goat anti-rabbit IgG-HRP (1:20,000) was used as secondary antibody. ROCK activity was presented as the ratio of p-MYPT1 (Thr-696) / total MYPT1 protein band density using densitometric analysis with ImageJ software.

Statistical analysis. All analysis were performed using SPSS (Version 18.0). Data are expressed as mean \pm SEM. Different experimental groups were compared by a non-parametric Kruskal–Wallis test, followed by a Mann–Whitney U test. The P -value < 0.05 was considered significant. Figures are presented using GraphPad Prism 5 software.

RESULTS

Fasudil reduced dermal thickness and skin fibrosis in HOCl-injected mice.

Intradermal injection of HOCl induced a significant dermal thickness in mice compared with injection of PBS (1.39 ± 0.05 vs. 0.57 ± 0.03 mm, $P < 0.01$) (Fig. 1A). As quantified by dye-binding sircol method, collagen content in skin biopsy was significantly increased in HOCl-mice (109.9 ± 6.2 vs. 60.5 ± 2.7 µg / punch biopsy, $P < 0.01$) (Fig. 1B). Fasudil significantly reduced both dermal thickness (1.00 ± 0.05 vs. 1.39 ± 0.05 mm, $P < 0.01$) (Fig. 1A) and collagen content in skin (68.6 ± 4.0 vs. 109.9 ± 6.2 µg / punch biopsy, $P < 0.01$) (Fig. 1B) in HOCl-mice when compared with

untreated HOCl-mice.

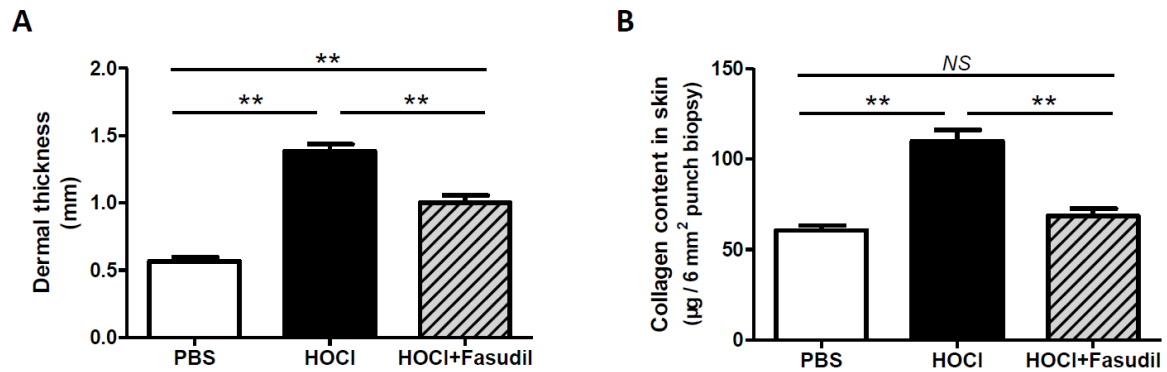


Fig. 1. Effects of fasudil on skin fibrosis in HOCl-mice. (A) Dermal thickness, measured with a caliper in the injection sites in mice. (B) Collagen content in skin, as measured by dye-binding sircol method ($n = 5$ in PBS group, $n = 6$ in HOCl or HOCl + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *NS* = not significant.

Fasudil reduced lung fibrosis in HOCl-injected mice.

In addition to skin fibrosis, HOCl injection caused significant lung fibrosis in mice compared with PBS injection, as measured by quantitative dye-binding sircol method (117.6 ± 11.2 vs. 88.4 ± 4.2 μg / lobe of lung, $P < 0.05$) (Fig. 2A). Fasudil significantly reduced the accumulation of lung collagen in HOCl-mice compared with untreated HOCl-mice (94.5 ± 3.1 vs. 117.6 ± 11.2 μg / lobe of lung, $P < 0.05$) (Fig. 2A). Histopathological analysis of lung tissues stained with picro-sirius red evidenced the reduction of lung collagen deposition in mice treated with fasudil (Fig. 2B). In contrast, HOCl injection did not cause a significant increase in RVSP or the ratio of RV / (LV+S) weight in mice (data not shown).

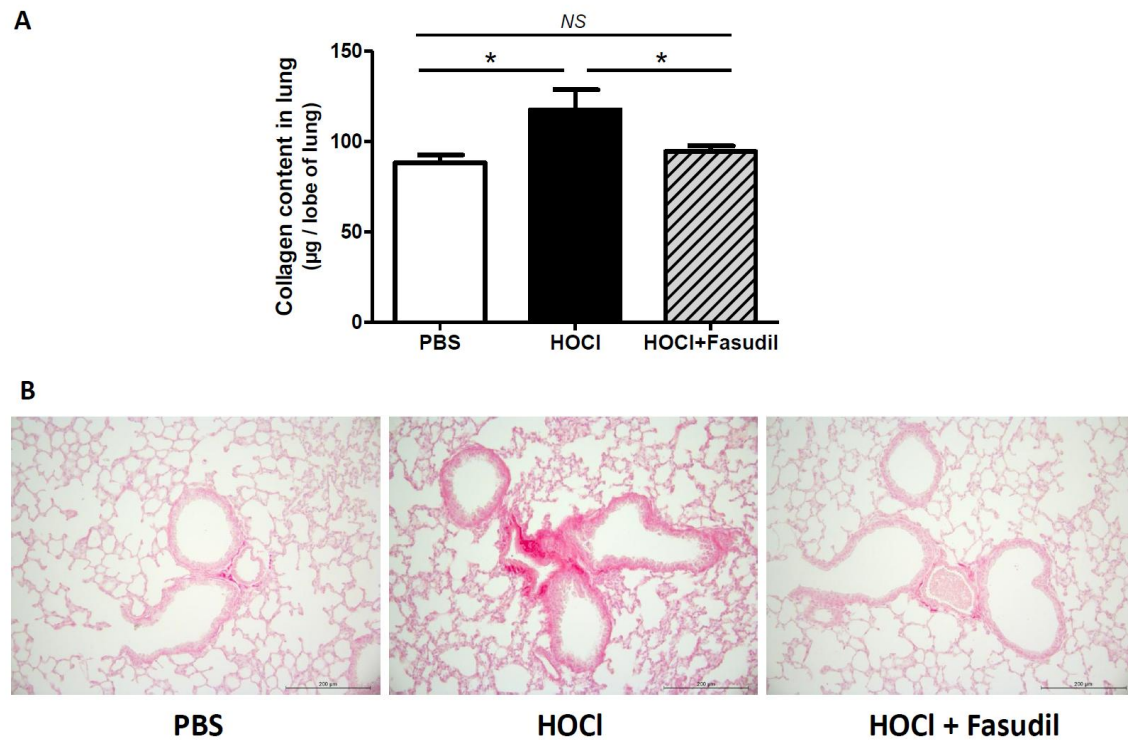


Fig. 2. Effects of fasudil on lung fibrosis in HOCl-mice. (A) Collagen content in lung, as measured by dye-binding sircol method. (B) Representative images showing collagen deposition in lung tissues stained with picro-sirius red (100-fold magnification) (n = 5 in PBS group, n = 6 in HOCl or HOCl + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.

Fasudil attenuated infiltration of macrophages and neutrophils, and reduced iNOS expression in the lung of HOCl-injected mice.

Analysis of lung inflammatory cells profiles showed a significant increase in lung interstitial infiltration of macrophages (7.24 ± 0.49 vs. 1.24 ± 0.21 cell number / field, $P < 0.01$) (Fig. 3A) and neutrophils (28.46 ± 5.15 vs. 15.41 ± 0.92 cell number / field, $P < 0.05$) (Fig. 3B) in HOCl-mice, which was significantly attenuated by treatment with fasudil (2.95 ± 0.33 cell number / field, $P < 0.01$, and 15.13 ± 2.51 cell number / field, $P < 0.05$, respectively). Representative images of immunohistochemistry of lung sections stained for macrophages and neutrophils are shown in Fig. 3C, respectively. No significant difference was found in lung infiltration of lymphocytes T or lymphocytes B in HOCl-mice compared with PBS-mice (data not shown).

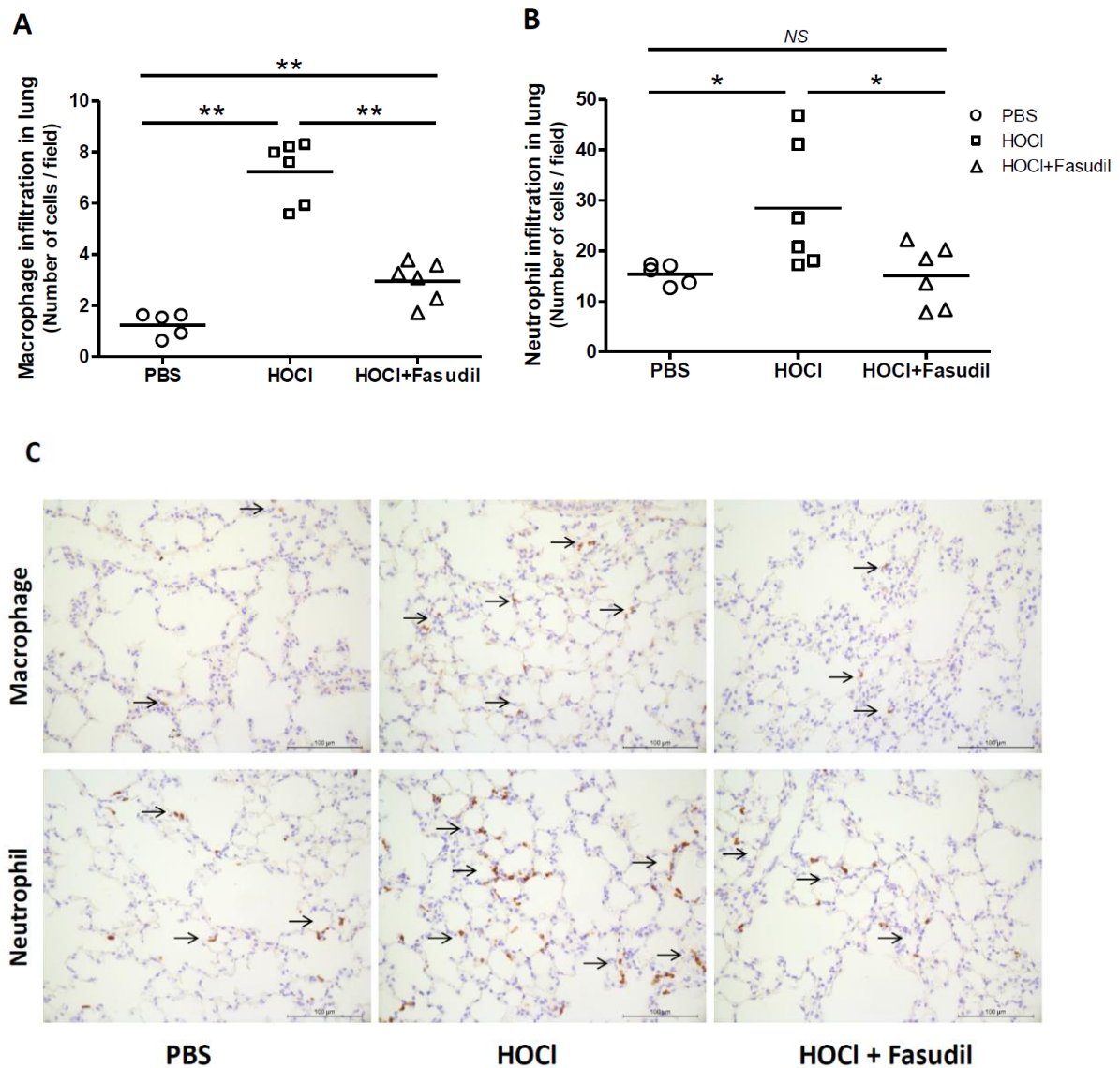


Fig. 3. Fasudil reduced infiltration of macrophages and neutrophils in the lung of HOCl-mice. (A) Numbers of infiltrated macrophages per field (200-fold magnification) in lung sections immunohistochemically stained. (B) Numbers of infiltrated neutrophils per field (200-fold magnification) in lung sections immunohistochemically stained. (C) Immunohistochemistry of lung sections stained for macrophages and neutrophils, respectively (200-fold magnification) (n = 5 in PBS group, n = 6 in HOCl or HOCl + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.

Immunohistochemistry showed that the expression of iNOS, a useful marker of inflammation, was significantly higher in bronchial epithelium in HOCl-mice

compared with PBS-mice (3.16 ± 0.19 vs. 2.20 ± 0.07 , $P < 0.01$) (Fig. 4A and 4B). The number of iNOS-positive cells in the lung of HOCl-mice was increased when compared with PBS-mice (Fig. 4B). Fasudil attenuated the increase in iNOS expression in the lung of HOCl-mice compared with untreated HOCl-mice (2.19 ± 0.07 vs. 3.16 ± 0.19 , $P < 0.01$) (Fig. 4A and 4B).

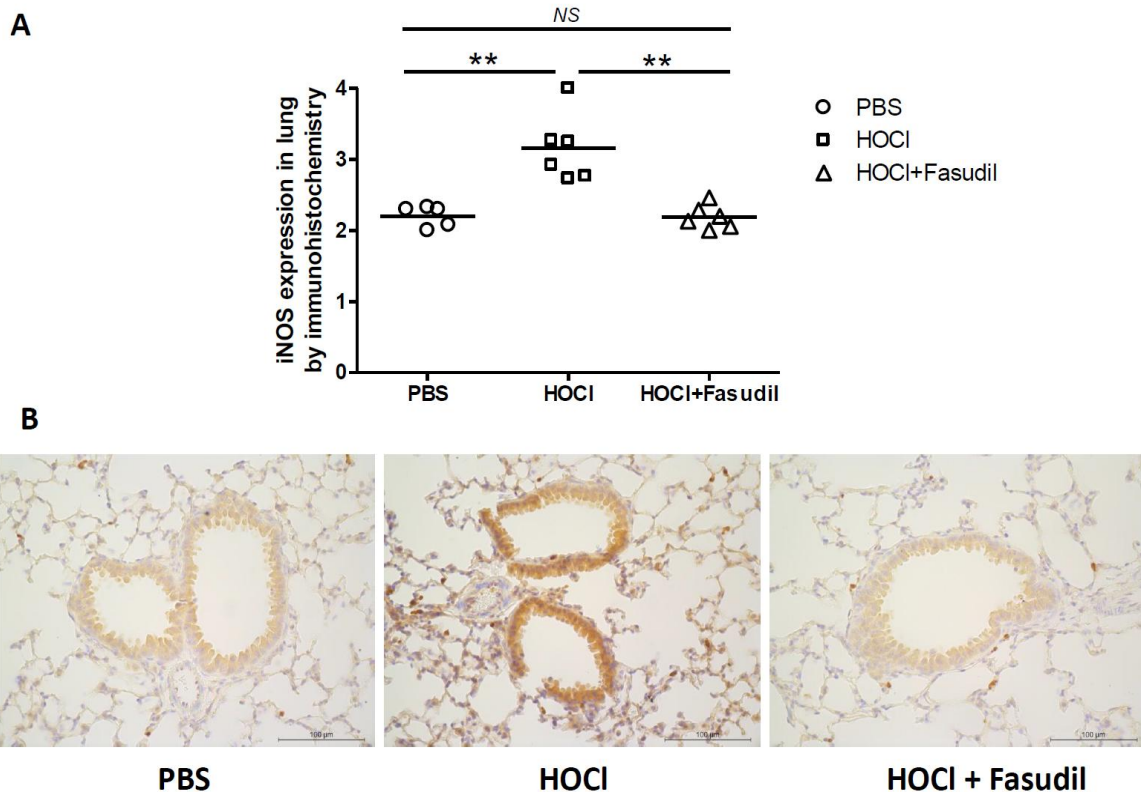
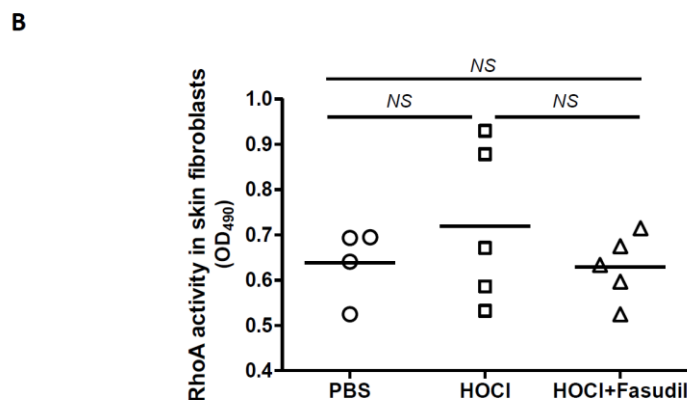
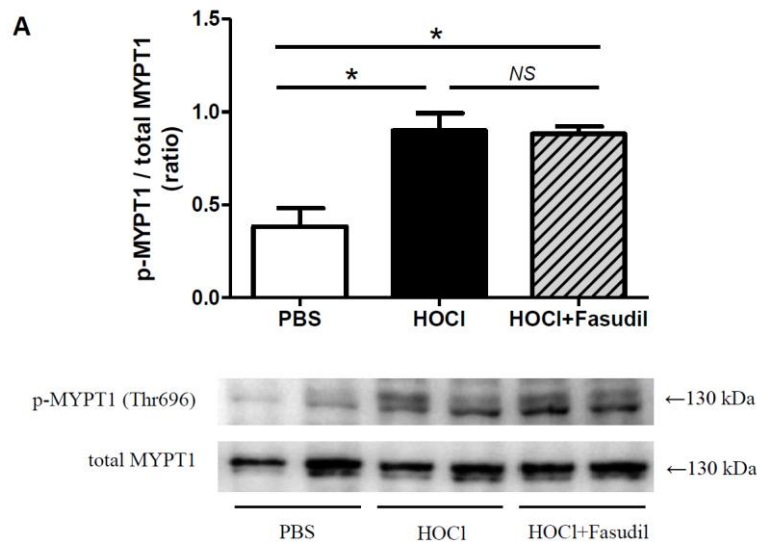


Fig. 4. Fasudil reduced iNOS expression in the lung of HOCl-mice. (A) Semi-quantitative scoring for iNOS expression in lung sections immunohistochemically stained. (B) Representative images of immunohistochemistry of lung sections stained for iNOS (200-fold magnification) ($n = 5$ in PBS group, $n = 6$ in HOCl or HOCl + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.

High level of ROCK activity in the skin fibroblasts from HOCl-injected mice.

To evaluate ROCK activity in the fibrotic skin of HOCl-mice, the relative protein expression of phosphorylated MYPT1 (p-MYPT1) to total MYPT1 was measured by Western blot by using protein extracts from the primary skin fibroblasts from mice. Higher amounts of p-MYPT1 were found in the skin fibroblasts from

HOCl-mice *versus* PBS-mice (density ratio = 0.90 ± 0.09 vs. 0.38 ± 0.10 , $P < 0.05$) (Fig. 5A). *In vivo* treatment with fasudil did not reduce the increased ratio of p-MYPT1 / MYPT1 expression in the primary skin fibroblasts (density ratio = 0.82 ± 0.07 vs. 0.90 ± 0.09 , $P = NS$) (Fig. 5A). We then measured RhoA activity and ROCK protein expression in the skin fibroblasts from mice, by using G-LISA RhoA activation assay and Western blot, respectively. There was no significant difference in RhoA activity or ROCK expression in the skin fibroblasts from mice (Fig. 5B and 5C). The activity of RhoA and ROCK, as well as the expression of ROCK were also assessed in the lung tissues of mice, whereas no significant difference was found (data not shown).



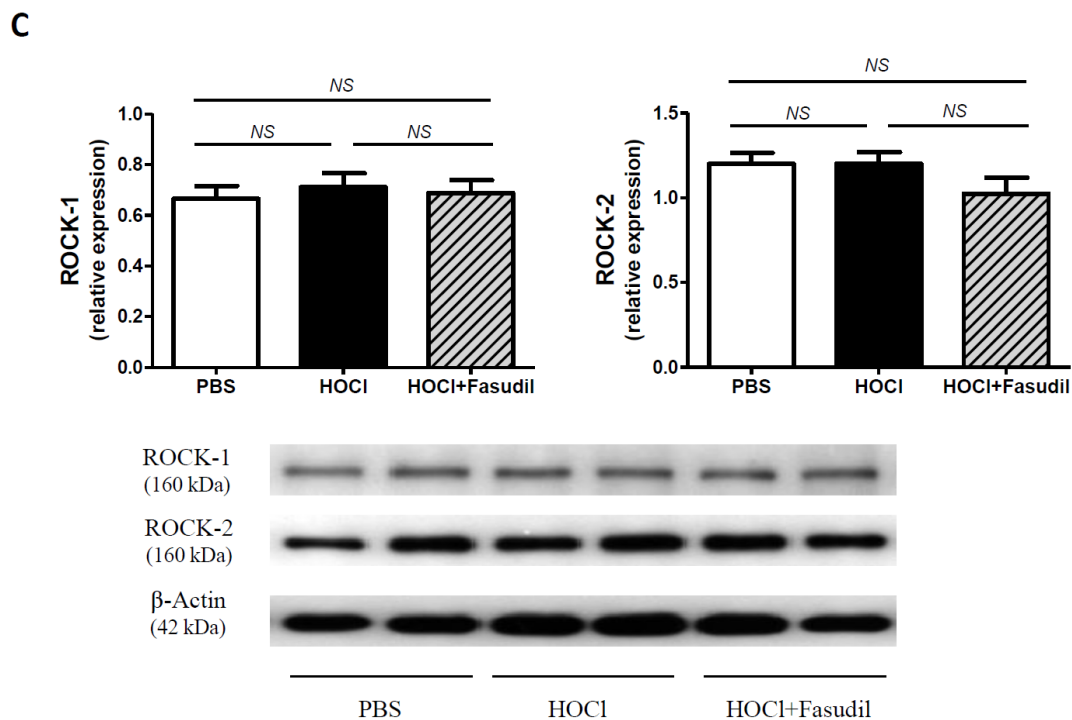


Fig. 5. Increased ROCK activity in the skin fibroblasts from HOCl-mice. (A) ROCK activity, as indicated by the ratio of p-MYPT1 / total MYPT1 measured by Western blot. (B) RhoA activity in the skin fibroblasts. (C) ROCK expressions in the skin fibroblasts measured by Western blot ($n = 4$ in PBS group, $n = 5$ in HOCl or HOCl + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.

Fasudil reduced 3-NT expression in the skin of HOCl-injected mice.

The tissular expression of 3-NT, used as a marker of nitrosative stress *in vivo*, was markedly increased in the skin of HOCl-mice than that in PBS-mice, as measured by Western blot (density ratio = 1.30 ± 0.17 vs. 0.29 ± 0.08 , $P < 0.05$), which was significantly attenuated by treatment with fasudil (density ratio = 0.34 ± 0.06 vs. 1.30 ± 0.17 , $P < 0.05$) (Fig. 6).

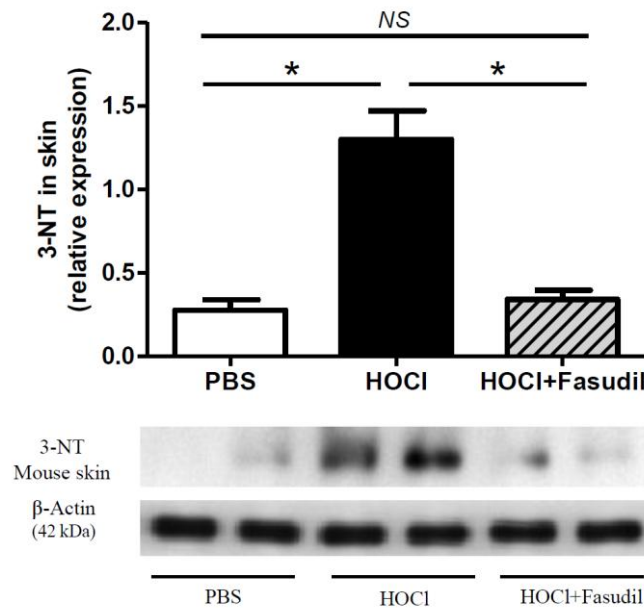


Fig. 6. Fasudil reduced 3-NT expression in the skin of HOCl-mice. Western blot analyses for 3-NT expression in the skin ($n = 5$ in PBS group, $n = 6$ in HOCl or HOCl + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.

Fasudil reduced the expression of α -SMA and inhibited the phosphorylation of Smad2/3 and ERK1/2 in the skin of HOCl-injected mice.

The expression of α -SMA in the fibrotic skin of HOCl-mice was higher than that in PBS-mice (density ratio = 0.80 ± 0.07 vs. 0.45 ± 0.06 , $P < 0.05$), which was significantly attenuated by treatment with fasudil (0.50 ± 0.08 vs. 0.45 ± 0.06 , $P < 0.05$) (Fig. 7A). The expression of TGF- β 1 in the skin of HOCl-mice was significantly higher than that in PBS-mice (density ratio = 0.81 ± 0.13 vs. 0.32 ± 0.07 , $P < 0.05$), whereas fasudil did not reduce the increased expression of TGF- β 1 in the skin of HOCl-mice (0.67 ± 0.13 vs. 0.81 ± 0.13 , $P = NS$) (Fig. 7B). Higher amounts of pSmad2/3 (density ratio = 1.36 ± 0.20 vs. 0.70 ± 0.09 , $P < 0.05$) and pERK1/2 (density ratio = 1.20 ± 0.20 vs. 0.33 ± 0.08 , $P < 0.05$) were found in the skin of HOCl-mice *versus* PBS-mice, respectively (Fig. 7C and 7D). The increased phosphorylation of Smad2/3 and ERK1/2 in the skin of HOCl-mice was significantly reduced by treatment with fasudil (density ratio = 0.63 ± 0.09 vs. 1.36 ± 0.20 , $P < 0.05$, and density ratio = 0.65 ± 0.09 vs. 1.20 ± 0.20 , $P < 0.05$, respectively) (Fig. 7C

and 7D).

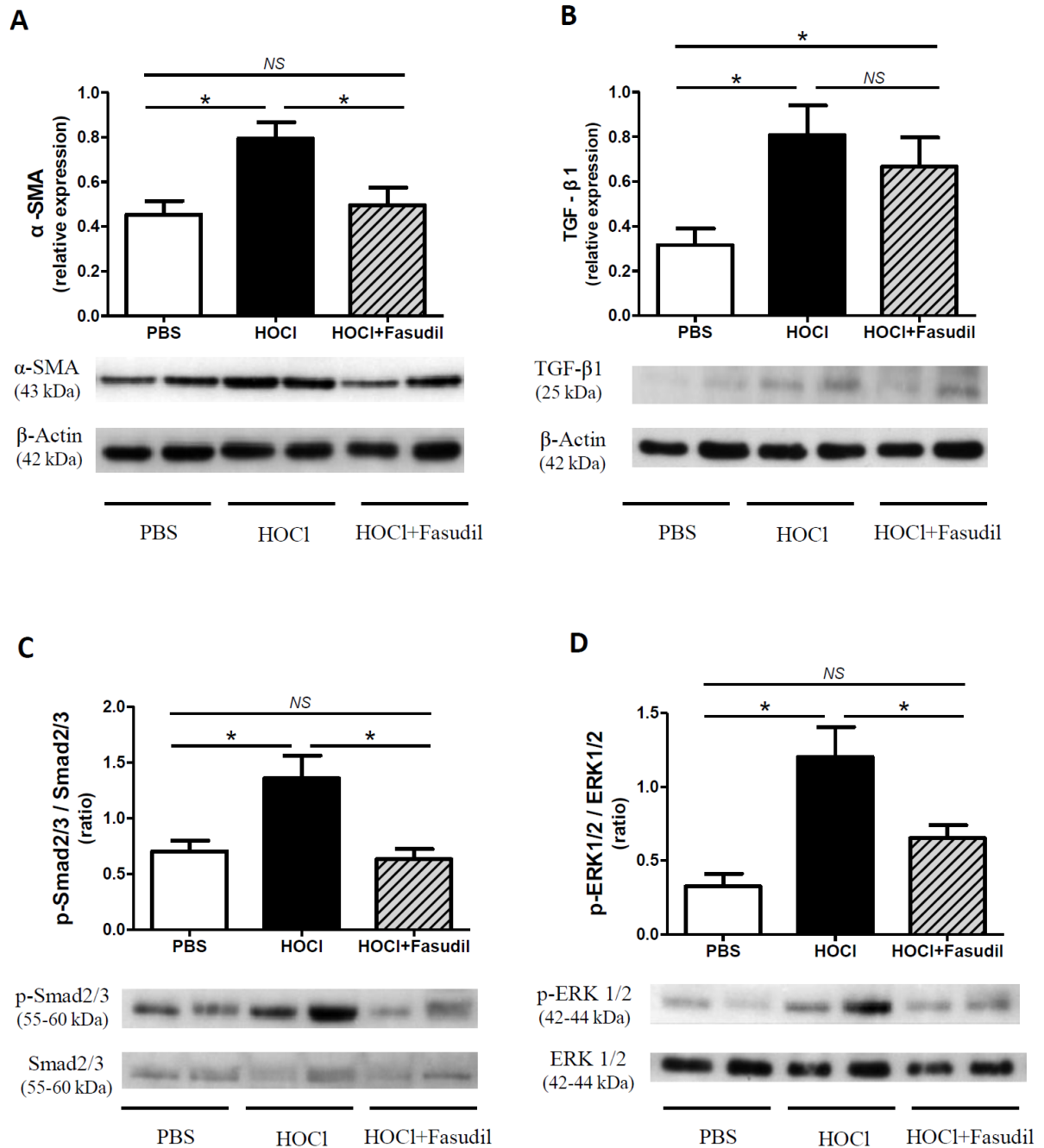


Fig. 7. Fasudil reduced the expression of α -SMA and inhibited the phosphorylation of Smad2/3 and ERK1/2 in the skin of HOCl-mice. (A) Western blot for α -SMA expression in the skin. (B) Western blot for TGF- β 1 expression in the skin. (C) Western blot showing relative phosphorylation of Smad2/3 in the skin. (D) Western blot showing relative phosphorylation of ERK1/2 in the skin ($n = 5$ in PBS group, $n = 6$ in HOCl or HOCl + Fasudil group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.

DISCUSSION

In this study, we showed that fasudil, an ROCK inhibitor, prevented both skin and lung fibrosis in a mouse model of SSc induced by HOCl. We further demonstrated that fasudil reduced skin fibrosis by inhibiting phosphorylation of Smad2/3 and ERK1/2 in the TGF- β 1 signaling.

The RhoA/ROCK pathway plays a critical role in actin formation and cytoskeleton rearrangement, and controls a variety of cell functions, such as migration, proliferation, differentiation and contraction (Loirand et al., 2006). Apart from its role in the pathophysiology of cardiovascular disorders like atherosclerosis and PH, the abnormal activation of RhoA/ROCK pathway is also implicated in various fibrogenic diseases, involving myocardial, pulmonary, renal and hepatic fibrosis (Ikeda et al., 2007; Ishimaru et al., 2007; Satoh et al., 2002; Shimizu et al., 2001). Fasudil, a selective inhibitor of ROCK, has been shown to reduce both inflammatory and fibrotic changes in these diseases.

Recent studies have reported that ROCK potently stimulate myofibroblast differentiation and extracellular matrix (ECM) production in scleroderma fibroblasts in the presence or absence of TGF- β 1 *in vitro* (Akhmetshina et al., 2008). Otherwise, the role of RhoA/ROCK pathway in fibrosis in SSc has not yet been fully studied. In the present study, we showed the presence of higher activity of ROCK in skin fibroblasts from HOCl-mice, and that treatment with fasudil prevented both skin and lung fibrosis in mice with SSc. We further demonstrated that the reduction of skin fibrosis by treatment with fasudil is consecutive to the decreased expression of α -SMA and the inhibition of phosphorylation of Smad2/3 and ERK1/2 in TGF- β 1 signaling in the fibrotic skin from HOCl-mice. To our knowledge, this is the first study showing the beneficial effect of fasudil to prevent skin and lung fibrosis in a mouse model of SSc *in vivo*.

Among multiple cytokines implicated in SSc, TGF- β 1 is a key mediator of tissue fibrosis by enhancing cell migration, proliferation, differentiation and ECM synthesis (Biernacka et al., 2011; Ihn, 2008; Verrecchia et al., 2006). Previous data have reported higher levels of circulating TGF- β 1 in patients with SSc and increased

phosphorylation and nuclear translocation of Smad2/3 in skin fibroblasts obtained from patients with SSc (Denton and Abraham, 2001; Mori et al., 2003). In the present study, we showed higher expression of TGF- β 1 and increased phosphorylation of Smad2/3 in the fibrotic skin of HOCl-mice, that is in coordination with previous study showing that TGF- β 1/Smad pathway plays a critical role in skin fibrosis in SSc (Verrecchia et al., 2006).

In addition to Smad-dependant activation, TGF- β 1 can signal in a Smad-independent manner, by activating protein kinases, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK), and lipid kinases (Moustakas and Heldin, 2005; Varga and Abraham, 2007). TGF- β 1 can also trigger the RhoA/ROCK pathway, leading to TGF- β 1-induced cytoskeleton reorganization and transcriptional regulation of ECM synthesis (Derynck and Zhang, 2003; Moustakas and Heldin, 2005; Varga and Abraham, 2007). Previous data has shown that the activation of RhoA/ROCK pathway interacts with Smad proteins in TGF- β 1 signaling by regulating the linker region phosphorylation of Smad2/3 in human breast carcinoma cells (Kamaraju and Roberts, 2005). It has also been reported that RhoA signaling regulates Smad activation during TGF- β 1-induced smooth muscle cell (SMC) differentiation, and that blockade of ROCK inhibits Smad2/3 phosphorylation and nuclear translocation, and reduces Smad-binding element (SBE) promoter activity (Chen et al., 2006). In the present study, the increased phosphorylation of Smad2/3 in the fibrotic skin of HOCl-mice was reduced by treatment with fasudil, showing that the complex interaction between RhoA/ROCK activation and Smad2/3 phosphorylation in TGF- β 1 signaling is critically involved in the pathogenesis of skin fibrosis in mice with SSc.

Excess of reactive oxygen species (ROS) plays a critical role in the pathogenesis of SSc (Gabielli et al., 2012). An autoamplification loop linking ROS, Ras and ERK1/2, has been shown to enhance cell responses to growth factors, and lead to DNA damage and collagen synthesis in SSc skin fibroblasts (Svegliati et al., 2005). Intradermal HOCl is supposed to stimulate ROS production in local fibroblasts, leading to Ras protein activation and ERK1/2 phosphorylation (Batteux et al., 2011). In the present study, we showed increased phosphorylation of ERK1/2 in the fibrotic

skin of HOCl-mice, which is consistent with these previous observations. We then demonstrated that fasudil significantly reduced ERK1/2 phosphorylation in the skin of HOCl-mice, further showing a cross-talk between RhoA/ROCK activation and ERK1/2 phosphorylation in the pathogenesis of skin fibrosis. Recent reports have shown that TGF- β 1 activates ERK1/2 in a ROCK-dependant manner, and that ERK1/2 phosphorylation mediates in part the stimulatory effects of ROCK on myofibroblast differentiation and ECM synthesis in SSc fibroblasts (Akhmetshina et al., 2008). Thus, the reduced phosphorylation of ERK1/2 in the fibrotic skin might account for the beneficial effect of fasudil against dermal fibrosis in HOCl-mice.

Apart from ROS, excessive reactive nitrogen species (RNS), are also importantly involved in the pathogenesis of SSc (Urtasun et al., 2008). Nitrotyrosine (3-NT), formed in the presence of metabolite of NO, is used as a marker of inflammation and nitrosative stress in SSc (Cotton et al., 1999; Liu et al., 2001; Takagi et al., 2003). High levels of 3-NT in diseased tissue are responsible for vascular injury and fibrogenic response (Urtasun et al., 2008). In our study, the increased expression of 3-NT in the fibrotic skin of HOCl-mice was significantly reduced by treatment with fasudil, which partly explained the therapeutic effect of fasudil in skin fibrosis in SSc. The implication of RhoA/ROCK pathway in inflammation and oxidative stress has already been shown. The RhoA/ROCK pathway augments inflammation by inducing proinflammatory molecules, such as IL-6 and monocyte chemoattractant protein 1 (Funakoshi et al., 2001; Radeff et al., 2004). The RhoA/ROCK pathway also upregulates endothelial NADP(H) oxidases and increases AngiotensinII-induced ROS production (Higashi et al., 2003). Whereas the role of RhoA/ROCK pathway in nitrosative stress and the mechanism underlying the anti-nitrosative effect of fasudil in diseased skin of HOCl-mice needs to be further studied.

PF and PH represent two main causes of death in SSc patients (Steen and Medsger, 2007). In the present study, HOCl induced significant lung fibrosis, whereas PH was not developed. The pathophysiological mechanism underlying HOCl-induced PF has not yet been well understood. Our previous study has demonstrated that it is

closely related to chronic pulmonary inflammation in HOCl-mice, and that pulmonary inflammation precedes the development of lung fibrosis. In that study, an increased lung interstitial infiltration of neutrophils and macrophages, as well as higher expression of NOS-2 in bronchial epithelium have been shown in HOCl-mice. In the present study, we further demonstrated that the increased infiltration of neutrophils and macrophages, as well as higher NOS-2 expression in the lung, could be significantly reduced by fasudil in HOCl-mice. Inflammatory cells are implicated in the production of various pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines and chemokines, which lead to the activation of fibroblasts, thus inducing their migration, proliferation and differentiation, and excessive production of collagen in PF (Bringardner et al., 2008). Increased numbers of inflammatory cells and mediators are also present in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in SSc patients complicated with interstitial lung disease, associated with ongoing inflammation and progressive PF (Behr et al., 1996; Bolster et al., 1997). In addition, the recruitment of inflammatory cells in the lung and the secretion of cytokines and chemokines are responsible to stimulate NOS-2 expression, and in turn increase the production of nitric oxide (NO) in the lung, which is suggested to be a marker of the presence of lung inflammation even before the occurrence of lung fibrosis in SSc (Tiev et al., 2009). Thus, the reduction of lung fibrosis in fasudil-treated mice might be related to decreased lung inflammation changes. Although no increased activity of RhoA/ROCK pathway was found in the lung from HOCl-mice (data not shown), the protective effect of fasudil against lung inflammation and lung fibrosis is supposed to be secondary to its efficacy in reducing local skin fibrosis. Previous studies demonstrated abnormal activation of immune cells, autoantibodies and inflammatory mediators in HOCl-mice, which link local fibrosis and systemic fibrosis (Batteux et al., 2011). Further study is required to explore the effect of fasudil in systemic inflammatory and immune responses in HOCl-mice.

In conclusion, blockade of ROCK by fasudil prevents skin fibrosis and lung fibrosis in mice with SSc. Fasudil reduces skin fibrosis through inhibition of phosphorylation of Smad2/3 and ERK1/2 in TGF- β 1 signaling. The RhoA/ROCK

pathway might be a novel therapeutic cible in the treatment of SSc.

REFERENCES

Akhmetshina, A., Dees, C., Pileckyte, M., Szucs, G., Spriewald, B.M., Zwerina, J., Distler, O., Schett, G., and Distler, J.H.W. (2008). Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 58, 2553–2564.

Batteux, F., Kavian, N., and Servettaz, A. (2011). New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology* 23, 511–518.

Behr, J., Vogelmeier, C., Beinert, T., Meurer, M., Krombach, F., König, G., and Fruhmann, G. (1996). Bronchoalveolar lavage for evaluation and management of scleroderma disease of the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 400–406.

Biernacka, A., Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N.G. (2011). TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29, 196–202.

Bolster, M.B., Ludwicka, A., Sutherland, S.E., Strange, C., and Silver, R.M. (1997). Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 40, 743–751.

Bringardner, B.D., Baran, C.P., Eubank, T.D., and Marsh, C.B. (2008). The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 287–301.

Chen, S., Crawford, M., Day, R.M., Briones, V.R., Leader, J.E., Jose, P.A., and Lechleider, R.J. (2006). RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 281, 1765–1770.

Cotton, S.A., Herrick, A.L., Jayson, M.I., and Freemont, A.J. (1999). Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. *J. Pathol.* 189, 273–278.

Denton, C.P., and Abraham, D.J. (2001). Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 13, 505–511.

Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584.

Duong-Quy, S., Bei, Y., Liu, Z., and Dinh-Xuan, A.T. (2013). Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. *Pharmacol. Ther.* 137, 352–364.

Funakoshi, Y., Ichiki, T., Shimokawa, H., Egashira, K., Takeda, K., Kaibuchi, K., Takeya, M., Yoshimura, T., and Takeshita, A. (2001). Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 38, 100–104.

Gabrielli, A., Avvedimento, E.V., and Krieg, T. (2009). Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* 360, 1989–2003.

Gabrielli, A., Svegliati, S., Moroncini, G., and Amico, D. (2012). New insights into the role of oxidative stress in scleroderma fibrosis. *Open Rheumatol J* 6, 87–95.

Higashi, M., Shimokawa, H., Hattori, T., Hiroki, J., Mukai, Y., Morikawa, K., Ichiki, T., Takahashi, S., and Takeshita, A. (2003). Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ. Res.* 93, 767–775.

Huang, X., Gai, Y., Yang, N., Lu, B., Samuel, C.S., Thannickal, V.J., and Zhou, Y. (2011). Relaxin Regulates Myofibroblast Contractility and Protects against Lung Fibrosis. *The American Journal of Pathology* 179, 2751–2765.

Ihn, H. (2008). Autocrine TGF-beta signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. *J. Dermatol. Sci.* 49, 103–113.

Ikeda, H., Kume, Y., Tejima, K., Tomiya, T., Nishikawa, T., Watanabe, N., Ohtomo, N., Arai, M., Arai, C., Omata, M., et al. (2007). Rho-kinase inhibitor prevents hepatocyte damage in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G911–G917.

Ishimaru, K., Ueno, H., Kagitani, S., Takabayashi, D., Takata, M., and Inoue, H. (2007). Fasudil attenuates myocardial fibrosis in association with inhibition of monocyte/macrophage infiltration in the heart of DOCA/salt hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50, 187–194.

Kamaraju, A.K., and Roberts, A.B. (2005). Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 1024–1036.

Liu, J.S., Zhao, M.L., Brosnan, C.F., and Lee, S.C. (2001). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* 158, 2057–2066.

Loirand, G., Guérin, P., and Pacaud, P. (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ. Res.* 98, 322–334.

Mori, Y., Chen, S.-J., and Varga, J. (2003). Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 48, 1964–1978.

- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell. Sci.* *118*, 3573–3584.
- Nozik-Grayck, E., Suliman, H.B., Majka, S., Albietz, J., Van Rheen, Z., Roush, K., and Stenmark, K.R. (2008). Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *295*, L422–430.
- Parizi, M., Howard, E.W., and Tomasek, J.J. (2000). Regulation of LPA-Promoted Myofibroblast Contraction: Role of Rho, Myosin Light Chain Kinase, and Myosin Light Chain Phosphatase. *Experimental Cell Research* *254*, 210–220.
- Radeff, J.M., Nagy, Z., and Stern, P.H. (2004). Rho and Rho kinase are involved in parathyroid hormone-stimulated protein kinase C alpha translocation and IL-6 promoter activity in osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* *19*, 1882–1891.
- Satoh, S., Yamaguchi, T., Hitomi, A., Sato, N., Shiraiwa, K., Ikegaki, I., Asano, T., and Shimokawa, H. (2002). Fasudil attenuates interstitial fibrosis in rat kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Eur. J. Pharmacol.* *455*, 169–174.
- Servettaz, A., Goulvestre, C., Kavian, N., Nicco, C., Guilpain, P., Chéreau, C., Vuiblet, V., Guillevin, L., Mouthon, L., Weill, B., et al. (2009). Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J. Immunol.* *182*, 5855–5864.
- Shimizu, Y., Dobashi, K., Iizuka, K., Horie, T., Suzuki, K., Tukagoshi, H., Nakazawa, T., Nakazato, Y., and Mori, M. (2001). Contribution of small GTPase Rho and its target protein rock in a murine model of lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *163*, 210–217.
- Steen, V.D., and Medsger, T.A. (2007). Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 940–944.
- Svegliati, S., Canello, R., Sambo, P., Luchetti, M., Paroncini, P., Orlandini, G., Discepoli, G., Paterno, R., Santillo, M., Cuzzo, C., et al. (2005). Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *280*, 36474–36482.
- Takagi, K., Kawaguchi, Y., Hara, M., Sugiura, T., Harigai, M., and Kamatani, N. (2003). Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin. Exp. Immunol.* *134*, 538–544.
- Tiev, K.P., Le-Dong, N.-N., Duong-Quy, S., Hua-Huy, T., Cabane, J., and Dinh-Xuan, A.T. (2009). Exhaled nitric oxide, but not serum nitrite and nitrate, is a marker of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Nitric Oxide* *20*, 200–206.

Tomasek, J.J., Vaughan, M.B., Kropp, B.P., Gabbiani, G., Martin, M.D., Haaksma, C.J., and Hinz, B. (2006). Contraction of myofibroblasts in granulation tissue is dependent on Rho/Rho kinase/myosin light chain phosphatase activity. *Wound Repair and Regeneration* 14, 313–320.

Urtasun, R., Conde de la Rosa, L., and Nieto, N. (2008). Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin Liver Dis* 12, 769–790, viii.

Varga, J., and Abraham, D. (2007). Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J. Clin. Invest.* 117, 557–567.

Verrecchia, F., Mauviel, A., and Farge, D. (2006). Transforming growth factor-beta signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 5, 563–569.

Watts, K.L., and Spiteri, M.A. (2004). Connective tissue growth factor expression and induction by transforming growth factor- β is abrogated by simvastatin via a Rho signaling mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L1323–L1332.

Watts, K.L., Sampson, E.M., Schultz, G.S., and Spiteri, M.A. (2005). Simvastatin Inhibits Growth Factor Expression and Modulates Profibrogenic Markers in Lung Fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32, 290–300.

DISCUSSION

I. Première étude: Activation de la voie RhoA/ROCK et dysfonctionnement endothélial pulmonaire dans la BPCO

1. Dysfonctionnement endothélial pulmonaire dans la BPCO

Le dysfonctionnement endothélial dû au tabagisme est considéré comme un événement initial qui survient précocement dans l'histoire naturelle de l'HTP associé à la BPCO. Ce dysfonctionnement endothélial précède souvent le remodelage vasculaire pulmonaire et l'apparition formelle de l'HTP dans la BPCO (Barberà and Blanco, 2009). Ainsi, le rôle de la voie RhoA/ROCK dans le dysfonctionnement endothélial dans la circulation systémique (Noma et al., 2005; Hidaka et al., 2010) et pulmonaire (Duong-Quy et al., 2011) a été mis en évidence chez les sujets fumeurs indemnes de toute affection respiratoire détectable par la mesure de la fonction pulmonaire. Notre première étude consiste à évaluer la régulation de la voie RhoA/ROCK et celle du NO, ainsi que leur interaction dans le dysfonctionnement endothélial au niveau des artères pulmonaires chez les patients atteints de BPCO avec ou sans hypoxémie.

Il a été auparavant montré qu'il existe une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires des patients atteints de BPCO sévère (Dinh-Xuan et al., 1991). Les études suivantes ont précisé que ce dysfonctionnement endothélial existe non seulement dans les formes sévères, hypoxémiques (Dinh-Xuan et al., 1991) mais aussi dans les formes plus modérées de la BPCO (Peinado et al., 1998, 1999) voire chez les fumeurs ayant encore une fonction respiratoire normale (Barberà et al., 2001; Duong-Quy et al., 2011). Ce dysfonctionnement endothélial pourrait être lié à une diminution de l'expression et/ou l'activité de la NOS-3 et une réduction de la biodisponibilité du NO (Su et al., 1998; Barberà et al., 2001; Zhang et al., 2006). Nous avons montré dans notre étude une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires proximales chez les patients atteints de BPCO par rapport aux sujets sains, la diminution étant également plus importante dans le groupe des patients hypoxémiques

par rapport aux patients n'ayant pas d'hypoxémie. Nous avons aussi montré que cette altération de la relaxation dépendante de l'endothélium est fortement corrélée avec une diminution de l'activité enzymatique de la NOS-3 et de la biodisponibilité du NO au niveau des artères pulmonaires. L'ensemble de nos résultats sont cohérents avec ceux des études précédemment citées tout en apportant des résultats supplémentaires au niveau de l'activité de la NOS-3.

Dans notre étude, l'expression génique ou protéique de la NOS-3 au niveau des artères pulmonaires proximales n'est diminuée que dans le groupe BPCO hypoxémique, alors qu'elle reste comparable dans le groupe des patients témoins et celui des BPCO non-hypoxémiques. Cette absence de la diminution de l'expression de la NOS-3 dans le groupe BPCO non-hypoxémique diffère des résultats des études précédentes (Barber et al., 2001). La discordance des résultats entre ces deux études pourrait être liée à l'origine topographique des tissus pulmonaires et la taille des artères pulmonaires : tissu pulmonaire entier et artères pulmonaires distales (diamètre externe de 1.5 à 2 mm) dans les études précédentes *versus* artères pulmonaires proximales (diamètre externe de 3 à 4 mm) dans notre étude. Nous avons aussi montré que la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium est davantage liée à une diminution de l'activité de la NOS-3 et/ou une réduction de la biodisponibilité du NO plutôt qu'une diminution quantitative de l'expression génique ou protéique de la NOS-3.

En tant que principal facteur de risque de la BPCO, la fumée de cigarette est susceptible d'entraîner un dysfonctionnement endothélial au niveau des vaisseaux pulmonaires et systémiques (Celermajer et al., 1993, 1996). Nous n'avons pas pu étudier les mécanismes responsables de l'inhibition de l'activité de la NOS-3 des artères pulmonaires des patients BPCO. De précédentes études ont suggéré un rôle délétère possible de la fumée de cigarette sur la circulation pulmonaire via des médiateurs pro-inflammatoires et/ou des ERO (Raij et al., 2001; van der Vaart et al., 2004). Dans une étude *in vitro*, Su et al ont trouvé que l'exposition à l'extrait de fumée de cigarette (EFC) cause une diminution irréversible de l'expression génique et

protéique de la NOS-3 de même que son activité enzymatique dans les CE pulmonaires (Su et al., 1998). Plus récemment, Zhang *et al* ont montré que la réduction de l'activité de la NOS-3 ainsi que l'inhibition de la production et la biodisponibilité du NO sont associées à une hyperproduction d'ERO et à une altération du métabolisme de l'arginine dans les CE des artères pulmonaires exposés à l'EFC (Zhang et al., 2006).

2. Activation de la voie RhoA/ROCK dans les artères pulmonaires des patients BPCO

L'importance physiopathologique de la voie RhoA/ROCK dans le dysfonctionnement endothélial a été étudiée dans la circulation systémique des sujets fumeurs sans atteinte de la fonction respiratoire (Noma et al., 2005; Hidaka et al., 2010). De plus, l'activité de la voie RhoA/ROCK est également augmentée dans les artères pulmonaires des sujets fumeurs n'ayant pas de BPCO. Cette augmentation est associée à une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires et une diminution de l'activité de la NOS-3 (Duong-Quy et al., 2011). Notre étude a confirmé ces résultats et, de plus, précisé que l'activité de la voie RhoA/ROCK au niveau des artères pulmonaires est significativement augmentée chez les patients atteints de BPCO par rapport aux patients non-BPCO, et que cette augmentation est plus importante chez les patients hypoxémiques par rapport aux patients sans hypoxémie. De plus, cette activation de la voie RhoA/ROCK est d'autant plus forte que l'hypoxémie chronique, la consommation de tabac et la concentration d'ET-1 dans les artères pulmonaires sont importantes.

De précédentes études ont montré que l'activation de la voie RhoA/ROCK dans l'HTAP induite par l'hypoxie chronique (Nagaoka et al., 2004; Hyvelin et al., 2005; Jernigan et al., 2008) était liée à une hyperproduction d'ERO (Killilea et al., 2000; Jin et al., 2004; Wu et al., 2007; Jernigan et al., 2008). Nous avons trouvé une corrélation significative entre l'activité de la RhoA et la PaO₂, suggérant que l'hypoxie chronique pourrait jouer un rôle important dans l'activation de la voie

RhoA/ROCK dans les artères pulmonaires dans le développement de la BPCO.

De plus, nous avons montré que l'activité de la RhoA est fortement corrélée avec la consommation de tabac, ce qui correspond à notre étude précédente où l'activation de la voie RhoA/ROCK au niveau des artères pulmonaires a déjà été mise en évidence chez les fumeurs sans BPCO (Duong-Quy et al., 2011). La fumée de cigarette est capable d'induire un stress oxydatif et une production excessive d'ERO, qui participent de manière importante à l'activation de la voie RhoA/ROCK (Noma et al., 2007). Par exemple, Richen *et al* ont montré que la fumée de cigarette diminue la clairance des cellules apoptotiques, associé à une activation de la voie RhoA/ROCK par l'intermédiaire du stress oxydatif (Richens et al., 2009). Bien que nous n'ayons pas pu évaluer la production des ERO dans les artères pulmonaires, il est probable que les ERO soient en tout ou partie impliqués dans les mécanismes responsables de l'activation de la voie RhoA/ROCK via la fumée de cigarette.

Nous avons également observé que l'activité de la RhoA était significativement corrélée avec la concentration d'ET-1 dans les artères pulmonaires. La surexpression d'ET-1 dans les artères pulmonaires ou les CE vasculaires, sous l'effet de la fumée de cigarette, a été montrée par de nombreuses études *in vivo* (Wright et al., 2002, 2004) et *in vitro* (Lee et al., 2001; Milara et al., 2010). Les données cliniques montrent également l'augmentation de la concentration plasmatique d'ET-1 chez les sujets tabagiques par rapport aux témoins (Haak et al., 1994; Goerre et al., 1995). De même, les concentrations plasmatiques et dans le LBA d'ET-1 sont augmentées chez les patients atteints de BPCO avec ou sans HTP (Bacakoğlu et al., 2003). L'ET-1 est l'un des nombreux agonistes possibles de la voie RhoA/ROCK, et peut activer cette voie de signalisation principalement via le récepteur ET-A (Jernigan et al., 2008). L'activation de la voie RhoA/ROCK via l'ET-1 a été montrée lors de l'hypoxie chronique (Weigand et al., 2006; Homma et al., 2007; Jernigan et al., 2008).

Nous formons ainsi l'hypothèse d'une activation de la voie RhoA/ROCK dans les artères pulmonaires proximales des patients atteints de BPCO avec ou sans

hypoxémie, ou simplement chez des sujets fumeurs sans atteinte de la fonction respiratoire. L'activation de la voie RhoA/ROCK est probablement liée à une activation de la voie d'ET-1, sans que l'on sache laquelle de ces deux voies est activée en amont de l'autre.

3. Corrélation entre l'activation de la voie RhoA/ROCK et le dysfonctionnement endothélial pulmonaire des patients BPCO

La voie RhoA/ROCK peut interférer avec la voie du NO, en inhibant l'expression et/ou l'activité de la NOS-3, ou en diminuant la biodisponibilité du NO (Laufs et al., 1999; Rikitake and Liao, 2005). A l'inverse, l'inhibition de la voie RhoA/ROCK peut augmenter la stabilité de l'ARN messager de la NOS-3 (Laufs and Liao, 1998). Dans notre première étude, nous avons analysé la corrélation entre l'activité de la RhoA et l'expression/activité de la NOS-3. Les résultats montrent que l'activité de la RhoA est fortement corrélée avec l'activité de la NOS-3, tandis que sa corrélation avec l'expression génique de la NOS-3 est relativement faible. Au regard des études précédentes ainsi que notre analyse statistique de corrélation, l'interaction entre la voie RhoA/ROCK et la voie du NO dans le dysfonctionnement endothélial dans la BPCO reste encore à être étudié.

En résumé, cette première étude montre d'une part une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium des artères pulmonaires, corrélée avec une diminution de l'activité de la NOS-3, et d'autre part, une activation de la voie RhoA/ROCK au niveau des artères pulmonaires, corrélée avec la PaO₂, la consommation de tabac ainsi que la concentration d'ET-1, chez les patients atteints de BPCO par rapport aux patients non-BPCO. Il existe une corrélation entre l'activité de la RhoA et l'expression génique/activité de la NOS-3. Toutes ces modifications sont plus marquées dans la BPCO hypoxémique que dans la BPCO non-hypoxémique. Les mécanismes responsables de l'activation de la voie RhoA/ROCK ainsi que son interaction avec la voie du NO dans le dysfonctionnement endothélial pulmonaire dans la BPCO méritent d'être davantage explorés.

II. Deuxième étude: Rôle de la voie RhoA/ROCK dans l'atteinte pulmonaire dans un modèle murin de PID induite par instillation intratrachéale de bléomycine

1. Effet du fasudil dans l'inflammation pulmonaire induite par la bléomycine

De nombreux arguments sont en faveur d'un rôle essentiel des médiateurs de l'inflammation dans les phénomènes initiateurs de la FPI (Crystal et al., 1984; Hunninghake et al., 1981), les mécanismes exacts liant les premiers aux seconds restent encore discutés (Gauldie, 2002; Strieter, 2002). Les raisons de cette controverse tiennent aux constatations d'une part de l'absence d'infiltrations importantes des cellules inflammatoires dans les zones pulmonaires fibrotiques et, d'autre part, de l'inefficacité relative des traitements anti-inflammatoires et/ou immunosuppresseurs chez les patients atteints de FPI (Selman et al., 2001). De fait, les critères diagnostiques d'une des formes de la FPI, la pneumonie interstitielle usuelle (UIP, usual interstitial pneumonia), ne requièrent pas obligatoirement la présence d'un infiltrat inflammatoire pulmonaire. En revanche, certaines données sont fortement en faveur d'un rôle important de l'inflammation pulmonaire, notamment dans d'autres formes de la FPI, comme la pneumonie interstitielle non-spécifique (NSIP, nonspecific interstitial pneumonia), où la présence de l'infiltrat inflammatoire est à la fois plus importante et conditionne le pronostic de cette maladie (Bjoraker et al., 1998). De plus, une infiltration importante de cellules inflammatoires dans le tissu pulmonaire biopsé ainsi que la présence de nombreux médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrosants dans le LBA sont observables chez les patients en pleine crise d'exacerbation de FPI (Kim et al., 2006; Kinder et al., 2008; Parambil et al., 2005). Il semble donc, à partir de ces observations, que la réponse inflammatoire pulmonaire soit un facteur étiopathogénique à prendre en considération dans la physiopathologie de la FPI (Bringardner et al., 2008).

Dans le modèle murin de FPI induite par instillation intratrachéale de bléomycine, la réponse inflammatoire pulmonaire apparaît très tôt et de façon

relativement importante. Le recrutement de divers types de cellules inflammatoires dans l'espace alvéolaire et le parenchyme pulmonaire entraîne la synthèse et la libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 α , IL-6, etc.) et pro-fibrosants (TGF- β 1, CTGF, etc.), qui contribuent ensuite à l'activation des fibroblastes et la production du collagène (Bringardner et al., 2008; Moeller et al., 2008). Dans notre deuxième étude, nous avons mis en évidence la présence d'une inflammation pulmonaire consécutive à l'instillation intratrachéale de bléomycine chez la souris. Une nette infiltration de neutrophiles et de macrophages est observée dans l'espace alvéolaire entre J7 et J14, tandis que la présence des lymphocytes T et B est prédominante dans l'espace périvasculaire de façon plus tardive entre J14 et J21. Nos résultats concordent avec ceux des études précédentes et montrent que la réponse inflammatoire pulmonaire induite par la bléomycine commence par une infiltration aiguë de neutrophiles suivie par une transition vers l'infiltration de macrophages et de lymphocytes (Izbicki et al., 2002; Kamata et al., 2011).

Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la réponse inflammatoire a été mis en évidence dans un certain nombre de maladies cardiovasculaires et pulmonaires, comme l'athérosclérose, l'asthme, la BPCO, l'HTP liée au tabac ou à la FP (Jiang et al., 2012; Lee et al., 2005; Rolfe et al., 2005; Schaafsma et al., 2008). La réponse inflammatoire pulmonaire est caractérisée par une augmentation de l'infiltration et de l'activation des cellules inflammatoires, qui dépend de diverses fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la polarisation morphologique, la migration des cellules inflammatoires ainsi que la fonction de la barrière endothéliale. Par ailleurs, la voie RhoA/ROCK est impliqué dans les fonctions de différents types de cellules inflammatoires, telles que les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et les lymphocytes (Rolfe et al., 2005; Rougerie and Delon, 2012; Schaafsma et al., 2008), en régulant leurs adhésion, contraction, migration et activation au cours de l'infiltration inflammatoire (Heasman et al., 2010; Jaffe and Hall, 2005; Rougerie and Delon, 2012; Worthylake et al., 2001).

Dans notre deuxième étude, nous avons montré que l'activité de la RhoA et

des ROCK est augmentée dans le tissu pulmonaire des souris intoxiquées par la bléomycine, et que le traitement à long terme par le fasudil diminue significativement la réponse inflammatoire pulmonaire à J14, en diminuant particulièrement l'infiltration de neutrophiles et de macrophages. L'effet anti-inflammatoire du fasudil dans notre deuxième étude est en accord avec les résultats des études précédentes, où le blocage des ROCK par des inhibiteurs spécifiques (Y-27632 ou fasudil) réduit l'inflammation pulmonaire induite par la bléomycine, en diminuant le nombre total de cellules inflammatoires (en particulier le nombre des neutrophiles et des macrophages) dans le LBA (Jiang et al., 2012; Shimizu et al., 2001). Le Y-27632 inhibe aussi la migration des neutrophiles et des macrophages dans les essais chimiotactiques *in vitro* (Shimizu et al., 2001). Différents membres de la superfamille des petites protéines G Ras, y compris la RhoA, sont capables d'activer de multiples voies de signalisation, aboutissant à une activation de différents facteurs de transcription comme le facteur nucléaire NF- κ B (Montaner et al., 1998). L'activation du NF- κ B est impliquée de manière importante dans l'initiation et le contrôle de l'inflammation pulmonaire induite par la bléomycine (Gurujeyalakshmi et al., 2000). De plus, il a été récemment montré que le Y-27632 ou le fasudil exerce un effet anti-inflammatoire dans la polyarthrite rhumatoïde via l'inhibition de la voie NF- κ B (He et al., 2008; Okamoto et al., 2010). L'interaction entre la voie RhoA/ROCK et la voie NF- κ B dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par la bléomycine reste encore à élucider.

2. Effet du fasudil dans la FP induite par la bléomycine

Dans notre deuxième étude, la FP induite par la bléomycine, comme en témoigne l'augmentation progressive mais nette de la quantité de collagène dans les poumons à J7, J14 et J21, est significativement améliorée par le traitement avec le fasudil. Les résultats des études précédentes ont montré que l'activation de la voie RhoA/ROCK est impliqué dans la physiopathologie de la FP induite par la bléomycine chez la souris, et que le blocage de la voie RhoA/ROCK peut significativement empêcher le développement de la FP (Jiang et al., 2012; Ou et al., 2008; Shimizu et al., 2001).

Aujourd'hui, les mécanismes de l'effet préventif de la survenue de la FP par l'inhibition de la voie RhoA/ROCK ne sont que très partiellement connus. Les données disponibles n'ont été obtenues qu'avec un seul type cellulaire : les (myo)fibroblastes. Ces derniers sont les principales cellules responsables de la synthèse et de la sécrétion de la MEC dans les lésions de fibrose où la voie RhoA/ROCK est impliqué, en régulant la prolifération, la migration, la différenciation et la contraction cellulaires et en interférant avec les autres voies de signalisation comme la voie TGF- β /Smad, l'une des principales voies de signalisation impliqué dans l'étiopathogénie de la fibrose tissulaire.

Il existe une augmentation de la prolifération *in vitro* des fibroblastes pulmonaires des patients atteints de FPI, associé à une surexpression génique et protéique de la cycline D1, un régulateur du cycle cellulaire, via une activation de la voie RhoA/ROCK (Watts et al., 2006). Les fibroblastes pulmonaires des souris intoxiqués par la bléomycine possèdent des caractères des myofibroblastes et présentent une augmentation de la migration cellulaire stimulée *in vitro* par le PDGF-BB, qui est significativement inhibé par le Y-27632 (Shimizu et al., 2001). De plus, la différenciation des fibroblastes pulmonaires des patients atteints de FPI est associé à une activation du TGF- β 1 et du CTGF par l'intermédiaire de la voie RhoA/ROCK *in vitro*. Les molécules de la famille des statines, comme la simvastatine, empêchent les modifications morphologiques et fonctionnelles des fibroblastes via un blocage de la voie RhoA/ROCK (Watts and Spiteri, 2004; Watts et al., 2005). Enfin, la voie RhoA/ROCK participe également à la contraction des myofibroblastes par la phosphorylation de la MYPT-1 (Parizi et al., 2000; Tomasek et al., 2006). L'augmentation de la contractilité des myofibroblastes est impliquée dans la physiopathologie de la FP chez la souris ayant reçu une instillation intratrachéale de bléomycine. En revanche, le traitement par la relaxine, qui favorise une déphosphorylation de la MLC par l'inactivation de la voie RhoA/ROCK, diminue la contractilité des myofibroblastes et donc améliore la FP (Huang et al., 2011).

Avec le modèle murin d'instillation intratrachéale de bléomycine utilisé

dans notre étude, il n'a pas été possible d'étudier les effets du fasudil sur la prolifération, la migration, la différenciation et la contraction des (myo)fibroblastes pulmonaires. La culture des fibroblastes pulmonaires murins, stimulés par les sécrums des souris intoxiquées par la bléomycine, sera mise en place afin d'étudier d'avantage les effets du fasudil sur les différentes fonctions cellulaires précitées.

3. Interaction entre la voie RhoA/ROCK et la voie TGF- β 1/Smad dans l'étiopathogénie de la FP induite par la bléomycine

De nombreuses études ont montré le rôle important de la voie TGF- β 1/Smad dans l'initiation et l'amplification de la fibrose tissulaire (Biernacka et al., 2011). Le développement de la fibrose dans les poumons et les autres tissus est moins sévère chez la souris déficiente en Smad3, ce qui suggère le rôle important de Smad3 dans la fibrogenèse tissulaire (Flanders et al., 2002; Zhao et al., 2002; Sato et al., 2003; Bujak et al., 2007). La voie RhoA/ROCK peut être activée par le TGF- β 1 de deux manières : soit de façon indépendante de Smad2/3, soit en passant par la phosphorylation de Smad2/3 (Kamaraju and Roberts, 2005; Chen et al., 2006). Nous avons donc étudié les modifications de la voie TGF- β 1/Smad et les interactions de cette dernière avec la voie RhoA/ROCK dans notre deuxième étude. Les résultats de celle-ci montrent que l'activité de la RhoA et des ROCK est respectivement élevée au niveau du poumon à partir de J7 et de J21, et que le fasudil diminue significativement cette augmentation à J21. Il existe une augmentation parallèle et progressive de l'expression protéique de TGF- β 1 et de pSmad2/3 à J7, J14 et J21. Le traitement par le fasudil diminue significativement la surexpression de pSmad2/3, mais pas celle de TGF- β 1.

Il a été montré que l'activation de la voie RhoA/ROCK peut interférer avec la phosphorylation de Smad2/3 (Kamaraju and Roberts, 2005). Plus récemment, Chen *et al.* ont montré que la voie RhoA/ROCK contribue à l'activation de Smad lors de la différenciation des CML induite par le TGF- β 1 *in vitro* (Chen et al., 2006). Ainsi, l'effet anti-fibrosant du fasudil dans notre deuxième étude pourrait être associé, du moins en partie, à une inhibition de la phosphorylation de Smad2/3 dans la voie

TGF- β 1, même si la surexpression protéique de TGF- β 1 induite par la bléomycine n'est pas modifiée par le traitement avec le fasudil.

En dehors de son interaction avec la phosphorylation de Smad2/3, la voie RhoA/ROCK peut aussi être directement activée par le TGF- β 1, de façon indépendante de Smad2/3 (Derynck and Zhang, 2003). Cette activation participe à la réorganisation du cytosquelette ainsi qu'à la transition épithélio-mésenchymateuse (*epithelial to mesenchymal transition*, EMT), une autre source de myofibroblastes dans les lésions de fibrose (Bhowmick et al., 2001; Xu et al., 2009).

En résumé, l'effet anti-fibrosant du fasudil dans notre deuxième étude pourrait être lié d'une part, à une inhibition directe de la voie RhoA/ROCK, et d'autre part, à une inhibition indirecte de la phosphorylation de Smad2/3 dans la voie TGF- β 1 (**Fig. 21**). Les mécanismes moléculaires par lesquels le fasudil peut inhiber la phosphorylation de Smad2/3 restent à élucider.

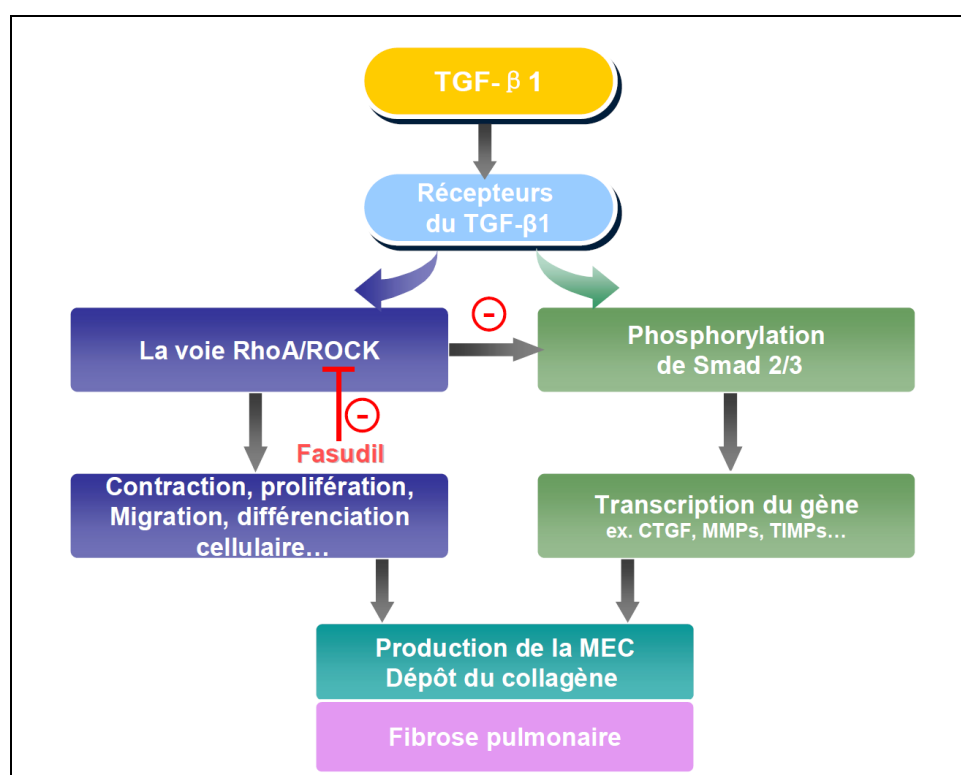


Fig. 21. Effet anti-fibrosant du fasudil dans la physiopathologie de la FP induite par la bléomycine : interaction entre la voie RhoA/ROCK et la voie TGF- β 1/Smad.

4. Effet du fasudil dans l'HTP associée à la FP induite par la bléomycine

Le développement de l'HTP est une complication grave de la FPI. En clinique, les patients atteints de l'HTP associée à la FPI (HTP-FPI) présentent des symptômes non spécifiques expliquant le retard diagnostique qui peut souvent amener à découvrir la maladie à un stade d'insuffisance cardiaque droite avancée (Battle et al., 1996; Rubin, 2004; Wigley et al., 2005). La présence de l'HTP chez les patients atteints de FPI est un critère de mauvais pronostic (King et al., 2001; Nadrous et al., 2005; Lettieri et al., 2006; Hamada et al., 2007). Jusqu'à présent, il n'existe pas de traitement spécifique et efficace de l'HTP-FPI (Behr and Ryu, 2008).

La forte prévalence de l'HTP-FPI est probablement liée à certains mécanismes physiopathologiques communs entre l'HTP et la FPI (Behr and Ryu, 2008). Dans la physiopathologie de l'HTP-FPI, l'altération épithéliale et la réponse inflammatoire pulmonaire entraînent la production de différents médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrosants impliqués dans l'induction de la fibrose tissulaire, l'apoptose des CE et le dysfonctionnement endothélial. Les CE apoptotiques, surtout dans les lésions de fibrose, sont non seulement responsables d'une diminution de la densité vasculaire mais elles sont aussi capables de proliférer et de participer au remodelage vasculaire pulmonaire. De plus, le dysfonctionnement endothélial est impliqué de manière importante dans la progression de la FP, l'augmentation de la vasoconstriction et le remodelage vasculaire pulmonaire. Enfin, la vasoconstriction, le remodelage et la raréfaction de la densité vasculaire pulmonaire contribuent au développement de l'HTP-FPI (Farkas et al., 2011) (**Fig. 15**).

L'implication de la voie RhoA/ROCK dans l'étiopathogénie de l'HTP est connue (Loirand et al., 2006). L'effet du fasudil a été largement étudié dans les modèles animaux d'HTP, surtout ceux utilisant la MCT ou l'hypoxie chronique comme inducteurs de l'HTP (Guilluy et al., 2005; Abe et al., 2006; Jiang et al., 2007; Tawara et al., 2007; Mouchaers et al., 2010). Cependant les données sur l'effet à long terme du fasudil dans le développement de l'HTP-FPI sont peu nombreuses. Dans

notre deuxième étude, nous avons pu induire une HTP chez la souris ayant reçu une instillation intratrachéale de bléomycine afin d'étudier l'effet préventif du fasudil sur la survenue de l'HTP. Dans notre étude, la bléomycine a induit une augmentation significative de la PSVD et une hypertrophie du VD observées à J14 et J21. De façon remarquable, les changements hémodynamiques ont été précédés par des modifications histologiques à type d'épaississement de la média et de néomuscularisation des artérioles pulmonaires observables dès J7. Le fasudil atténue significativement ces deux formes de remodelage vasculaire et atténue l'augmentation de la PSVD et l'hypertrophie du VD chez la souris instillée par la bléomycine.

De précédentes études ont montré qu'une seule injection intratrachéale de bléomycine était suffisante pour induire une HTP chez les rongeurs dans la phase tardive (Ortiz et al., 2002; Hemnes et al., 2008; Schroll et al., 2010; Van Rheen et al., 2011). Certaines molécules, comme l'énalapril (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine), le sildenafil (inhibiteur de PDE-5), le bosentan (inhibiteur des récepteurs d'ET-1) et la superoxyde dismutase extracellulaire (EC-SOD, *extracellular superoxide dismutase*) ont déjà été testées dans leurs indications de traitements préventifs du développement de la FP et de l'HTP. L'activation de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de l'HTP-FPI induite par la bléomycine a été précédemment étudiée. Hemnes *et al.* ont montré que le traitement par le sildenafil atténue la FP et l'HTP induites par la bléomycine via l'inhibition de la voie RhoA/ROCK au niveau du poumon et du VD (Hemnes et al., 2008). McNamara *et al.* ont montré qu'une seule administration intrapéritonéale au préalable de Y-27632 ou de fasudil de 15 à 30 minutes avant les mesures hémodynamiques chez le rat est suffisante pour normaliser la RVP élevée induite par des injections intrapéritonéales quotidiennes de bléomycine (McNamara et al., 2008). En revanche, l'efficacité à long terme de fasudil sur la survenue de la FP associée à l'HTP induite par la bléomycine n'a jamais été rapportée. A notre connaissance, notre étude est la première effectuée dans cette optique, montrant l'effet bénéfique à long terme du fasudil dans le développement de l'HTP-FPI induite par la bléomycine chez la souris, confirmé par la

diminution de la PSVD, de l'hypertrophie du VD et du remodelage vasculaire pulmonaire.

Dans notre deuxième étude, le remodelage vasculaire pulmonaire est apparu avant la survenue de l'HTP chez la souris intoxiquée par la bléomycine. Au bout d'une semaine, il existait déjà un épaissement de la média vasculaire et une néomuscularisation des artérioles pulmonaires. Le nombre d'artérioles pulmonaires complètement muscularisées est diminué à J21 par rapport à J14 chez la souris intoxiquée par la bléomycine, mais reste toujours supérieur à celui des souris témoins. Ce phénomène pourrait être dû à une altération de la structure du poumon pendant la fibrose, conduisant à une densité vasculaire relativement diminuée et une RVP élevée (Renzoni et al., 2003). Le traitement par fasudil atténue significativement le remodelage vasculaire pulmonaire, en améliorant non seulement l'épaissement de la média vasculaire mais aussi la néomuscularisation des artérioles au niveau du poumon.

La MYPT-1, un des substrats des ROCK, est usuellement étudiée dans diverses maladies cardiovasculaires, y compris l'HTP, pour évaluer l'activité des ROCK (Loirand et al., 2006). La MYPT-1 est une sous-unité régulatrice de la MLCP ; cette dernière contribue à la relaxation des CML en déphosphorylant la MLC. A l'inverse, la phosphorylation de la MYPT-1, médiée par les ROCK, inactive la MLCP, conduisant à une augmentation de la quantité de MLC phosphorylé, favorisant ainsi la contraction des CML (Somlyo and Somlyo, 2003). Notre deuxième étude a montré une augmentation de l'expression protéique de pMYPT-1 à J21, coïncidant avec l'aggravation de l'HTP. Bien qu'étant un mécanisme souvent invoqué dans la physiopathologie de l'HTP associé aux maladies respiratoires chroniques (Naeije and Barber à 2001), la vasoconstriction pulmonaire hypoxique ne semble pas jouer un rôle prédominant dans le développement de l'HTP-FPI (Nadrour et al., 2005; Strange and Highland, 2005; Ryu et al., 2007). Par exemple, Pouwels-Fry *et al* ont montré que l'oxygénothérapie n'améliore pas significativement l'augmentation de la PAPm lors de l'exercice chez les patients atteints de FPI, ce qui suggère que la vasoconstriction

hypoxique n'est pas le mécanisme prédominant contribuant à une élévation aiguë de la PAPm pendant l'exercice dans la FPI (Pouwels-Fry et al., 2008). En revanche, le nouveau concept souligne l'importance des atteintes vasculaires pulmonaires, et met en avant le rôle du remodelage vasculaire et la progression parallèle de celle-ci avec la fibrose dans la physiopathologie de l'HTP-PID (Nathan et al., 2007; Farkas et al., 2009).

Ainsi, dans notre deuxième étude, le fasudil inhibe le développement de l'HTP-FPI induite par la bléomycine, en diminuant la réponse inflammatoire, la fibrose pulmonaire, la PSVD élevée, l'hypertrophie du VD et le remodelage des vaisseaux pulmonaires (Fig. 22). L'implication de la voie RhoA/ROCK dans la vasoconstriction pulmonaire dans l'initiation et l'aggravation de l'HTP-FPI reste à déterminer.

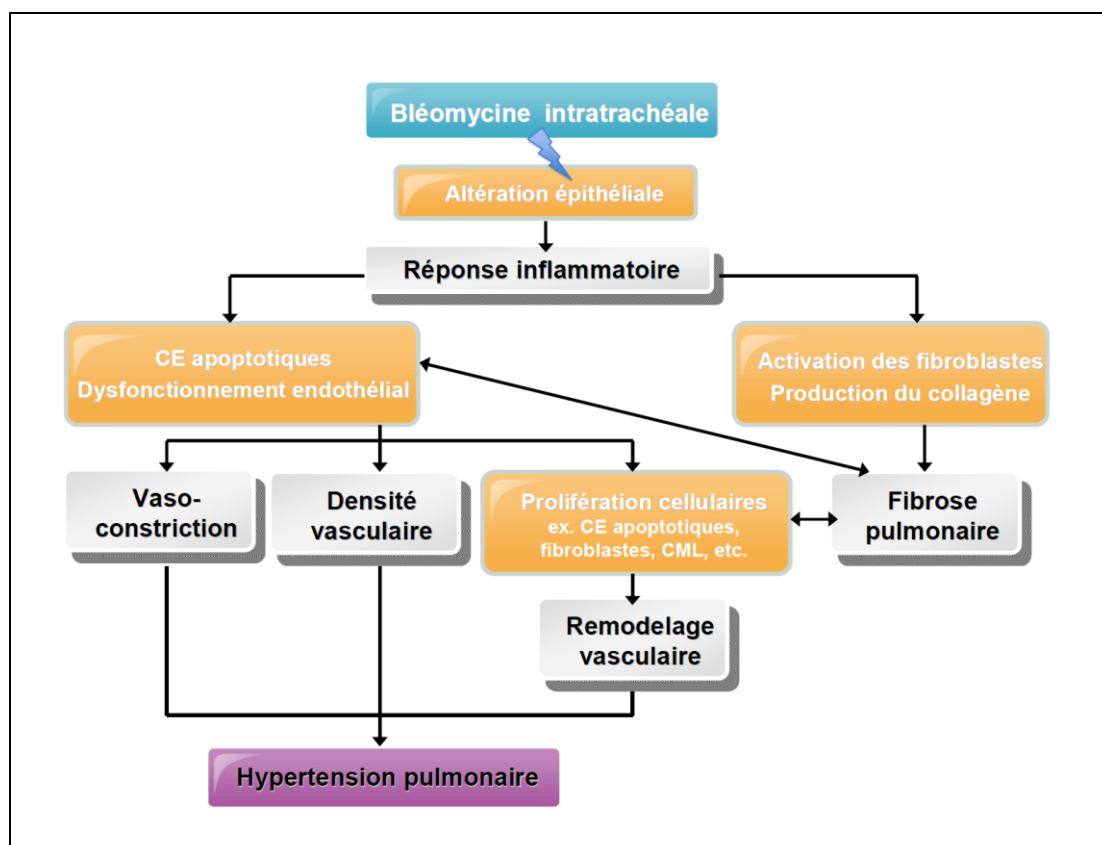


Fig. 22. Physiopathologie de l'HTP associée à la FP induite par l'instillation intratrachéale de bléomycine chez la souris.

III. Troisième étude : Rôle de la voie RhoA/ROCK dans la fibrose cutanée et pulmonaire dans un modèle murin de ScS induite par injection intradermique d'HOCl

1. Effet du fasudil dans la fibrose cutanée induite par l'HOCl

La voie RhoA/ROCK joue un rôle essentiel dans la formation d'actine et la réorganisation du cytosquelette. Hormis son implication dans la physiopathologie de l'HTP, la voie RhoA/ROCK est également impliquée dans la physiopathologie de diverses maladies fibrotiques, comme la fibrose myocardique, pulmonaire, rénale et hépatique (Ikeda et al., 2007; Ishimaru et al., 2007; Satoh et al., 2002; Shimizu et al., 2001), pour lesquelles l'effet thérapeutique du fasudil, un inhibiteur des ROCK, sur la réduction des réponses inflammatoire et fibrotique a pu être démontré. Il a été récemment montré que les ROCK jouent un rôle critique dans la différenciation des fibroblastes et la production des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) par les fibroblastes cutanés des patients atteints de ScS (Akhmetshina et al., 2008). Ces observations antérieures nous ont encouragés à tester l'effet du fasudil dans un modèle murin de ScS induite par l'HOCl.

Dans cette troisième étude, nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité des ROCK, indiquée par la phosphorylation de MYPT-1, dans les fibroblastes cutanés primaires des souris ayant reçu des injections d'HOCl (souris HOCl), et que le fasudil réduit l'épaississement cutané, la quantité de collagène et l'expression de α -SMA dans la peau des souris intoxiquées par l'HOCl. A notre connaissance, notre étude est la première à avoir montré un effet bénéfique du blocage de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de la ScS *in vivo*.

Les mécanismes concernant le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la fibrose tissulaire sont peu connus. Il a été auparavant suggéré que cela pouvait être lié à ses effets sur les principales fonctions cellulaires, comme la migration, la prolifération, la différenciation et la contraction cellulaire, en particulier celles des fibroblastes et des

myofibroblastes (Huang et al., 2011; Parizi et al., 2000; Shimizu et al., 2001; Tomasek et al., 2006; Watts and Spiteri, 2004; Watts et al., 2005). Récemment, le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la différenciation des fibroblastes cutanés provenant de patients ScS a été étudié où le traitement par le Y-27632 *in vitro*, un inhibiteur des ROCK, diminue l'expression de α -SMA et la production des protéines de la MEC (Akhmetshina et al., 2008). La peau des patients atteints de ScS contient des myofibroblastes surexprimant l' α -SMA et jouant un rôle crucial dans la production des protéines de la MEC (Kirk et al., 1995; Yamamoto and Nishioka, 2002). Dans cette troisième étude, nous avons également trouvé une surexpression d' α -SMA dans la peau fibrosée des souris intoxiquées par l'HOCl, et nous avons démontré l'effet inhibiteur du fasudil sur cette surexpression d' α -SMA.

Les (myo)fibroblastes cutanés provenant de patients atteints de ScS présentent un phénomène hyperprolifératif *in vitro* (Rajkumar et al., 2005). La même observation a été montrée dans le modèle murin de ScS induite par l'HOCl (Kavian et al., 2010, 2012; Marut et al., 2013; Servettaz et al., 2009). Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la prolifération des fibroblastes cutanés dans la ScS n'a jamais été évalué. Cependant, l'implication de la voie RhoA/ROCK dans la prolifération cellulaire a déjà été montrée au niveau des fibroblastes pulmonaires. Des fibroblastes pulmonaires des patients atteints de FP idiopathique (FPI) présentent une augmentation de la prolifération *in vitro*, associé à une surexpression génique et protéique de la cycline D1, un régulateur du cycle cellulaire, due à l'activation de la voie RhoA/ROCK (Watts et al., 2006). La voie RhoA/ROCK est également impliqué dans la prolifération des fibroblastes pulmonaires murins stimulés *in vitro* par la 5-HT, en favorisant l'activation des protéines MAPK/ERK (Mair et al., 2008). Dans notre étude, l'activité élevée des ROCK dans les fibroblastes cutanés *in vitro* n'a pas pu être efficacement inhibé par le fasudil administré aux animaux *in vivo*. Les prochaines études devraient mesurer la prolifération des fibroblastes cutanés murins traités ou non par le fasudil *in vitro* afin de mieux comprendre l'effet du fasudil sur la prolifération des (myo)fibroblastes cutanés dans la ScS.

2. Interaction entre l'activation de la voie RhoA/ROCK et la phosphorylation de Smad2/3 et d'ERK1/2 dans la fibrose cutanée induite par l'HOCl

Parmi les nombreuses cytokines impliquées dans la physiopathologie de la ScS, le TGF- β 1 est un médiateur central de la fibrose tissulaire via son implication dans la migration, la prolifération et la différenciation cellulaires et la synthèse des protéines de la MEC (Biernacka et al., 2011; Ihn, 2008; Verrecchia et al., 2006). Les patients atteints de ScS ont un niveau sérique élevé du TGF- β 1, une hyperactivité du TGF- β 1 et une surexpression de ses récepteurs dans la peau (Denton and Abraham, 2001). L'activation du TGF- β 1 est impliquée dans la phosphorylation et la translocation nucléaire de Smad2/3 et la régulation transcriptionnelle des gènes codant les protéines de la MEC au niveau des fibroblastes cutanés des patients atteints de ScS (Mori et al., 2003). Dans notre troisième étude, nous avons également trouvé une élévation de l'expression de TGF- β 1 et de la phosphorylation de Smad2/3 dans la peau fibrosée induite par l'HOCl. Ces résultats sont en concordance avec ceux des précédentes études montrant l'activation de la voie TGF- β 1/Smad dans la fibrose cutanée de la ScS (Verrecchia et al., 2006).

Outre l'activation dépendante de Smad, le TGF- β 1 exerce également ses effets cellulaires via l'activation des voies indépendantes de Smad (Derynck and Zhang, 2003). L'activation de la voie RhoA/ROCK est en partie impliquée dans la signalisation intracellulaire du TGF- β 1, notamment concernant les effets de celui-ci sur la réorganisation du cytosquelette et la régulation transcriptionnelle de la synthèse des protéines de la MEC (Derynck and Zhang, 2003; Moustakas and Heldin, 2005; Varga and Abraham, 2007). Il a été montré que l'activation de la voie RhoA/ROCK peut interférer avec la phosphorylation de Smad2/3 dans la voie TGF- β 1 (Kamaraju and Roberts, 2005). La voie RhoA/ROCK contribue à l'activation de Smad dans la différenciation des CML induite par le TGF- β 1 *in vitro*, ce qui est inhibé par le blocage des ROCK via l'inhibition de la phosphorylation et la translocation nucléaire des Smad2/3 (Chen et al., 2006). Dans notre étude, le traitement avec le fasudil inhibe efficacement la phosphorylation de Smad2/3 dans la peau fibrosée induite par l'HOCl,

ce qui indique l'existence d'une interaction complexe entre l'activation de la voie RhoA/ROCK et la phosphorylation de Smad2/3 dans la voie TGF- β 1 dans ce modèle murin de ScS.

Une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) joue un rôle critique dans l'étiopathogénie de la ScS (Gabrielli et al., 2012). Un cercle vicieux d'autoamplification entre les ERO, Ras et ERK1/2 est responsable de l'activation continue des fibroblastes et de la synthèse du collagène qui en résulte dans les ScS myofibroblastes cutanés (Svegliati et al., 2005). L'injection intradermique d'HOCl est susceptible de stimuler la production d'ERO par les fibroblastes, conduisant à l'activation de Ras et la phosphorylation de ERK1/2 (Batteux et al., 2011). Les résultats de notre troisième étude montrent une augmentation de la phosphorylation de protéines kinases ERK1/2 dans la peau fibrosée induite par l'HOCl, ce qui est en accord avec les observations antérieures. Nous avons en plus montré que le traitement par le fasudil inhibe significativement la phosphorylation d'ERK1/2 dans la peau fibrosée, suggérant des liens possibles entre l'activation de la voie RhoA/ROCK et la phosphorylation d'ERK1/2 dans l'étiopathogénie de la fibrose cutanée dans la ScS. Il a été récemment montré que le TGF- β 1 active les protéines ERK1/2 d'une manière dépendante des ROCK, et que la phosphorylation d'ERK1/2 participe en partie à l'effet des ROCK sur la différenciation des fibroblastes et la synthèse des protéines de la MEC dans les myofibroblastes des patients atteints de ScS (Akhmetshina et al., 2008). Ainsi, l'effet préventif du fasudil sur la fibrose cutanée pourrait en partie être lié à une inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 et de Smad2/3 dans ce modèle murin de ScS.

3. Les Stress oxydatif et nitrosatif dans la fibrose cutanée induite par l'HOCl

Le stress oxydatif survient quand il existe un déséquilibre entre les agents oxydants et antioxydants, se faisant en faveur de l'augmentation des ERO (Dröge, 2002). Le rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la ScS a été mis en évidence dans de nombreuses études expérimentales (avec des modèles murins) et

chez l'homme (Allanore et al., 2004; Herrick and Matucci Cerinic, 2001; Ogawa et al., 2006; Sambo et al., 2001; Servettaz et al., 2007; Simonini et al., 1999). Les fibroblastes cutanés provenant de patients atteints de ScS produisent spontanément de grandes quantités d'ERO, favorisant ainsi la synthèse de collagène (Sambo et al., 1999, 2001). Chez les patients atteints de ScS, les auto-anticorps anti-récepteur du PDGF (PDGFR) exprimés par les fibroblastes induisent également la production des ERO (Baroni et al., 2006). Les séums des patients ScS induisent non seulement une hyperproduction d'ERO par les cellules endothéliales (CE) et les fibroblastes *in vitro*, mais aussi une prolifération des fibroblastes et un dysfonctionnement endothélial (Servettaz et al., 2007). Les études antérieures ont montré que la production intracellulaire d' H_2O_2 est élevée, tandis que la concentration intracellulaire de glutathion réduit (GSH) est diminuée dans les CE ou les fibroblastes cutanés des souris HOCl (Kavian et al., 2010; Marut et al., 2012; Servettaz et al., 2009). Dans notre étude, nous avons également trouvé une diminution importante de GSH intracellulaire dans les fibroblastes cutanés des souris HOCl, qui est nettement atténuée avec un traitement par le fasudil. Le système du GSH est un des plus puissants systèmes antioxydants des organismes aérobies, dont l'altération représente l'existence d'un stress oxydatif. Prochainement, la production intracellulaire des ERO (ex. H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ et OH^{\cdot}) au niveau des fibroblastes cutanés des souris HOCl sera mesurée afin de mieux évaluer l'effet du fasudil sur le stress oxydatif dans la physiopathologie de la ScS.

En plus des ERO, la présence excessive des espèces réactives de l'azote (ERN) est également impliquée dans l'étiopathogénie de la ScS (Urtasun et al., 2008). La nitrotyrosine (3-NT), synthétisée en présence des métabolites du NO, est considérée comme un marqueur de l'inflammation et du stress nitrosatif dans la ScS (Cotton et al., 1999; Liu et al., 2001; Takagi et al., 2003). Une surexpression de 3-NT dans les tissus atteints de ScS est responsable de l'altération vasculaire et de la fibrogenèse (Urtasun et al., 2008). Dans notre étude, une surexpression de 3-NT est présente dans la peau fibrosée induite par l'HOCl, tandis que le traitement par le

fasudil diminue significativement sa surexpression, ce qui contribue en partie à l'effet préventif du fasudil sur la fibrose cutanée dans ce modèle murin de ScS.

L'implication de la voie RhoA/ROCK dans l'inflammation et le stress oxydatif est connue. L'activation de la voie RhoA/ROCK contribue à l'inflammation via l'induction des molécules pro-inflammatoires, comme l'IL-6 et le MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) (Funakoshi et al., 2001; Radeff et al., 2004), ou via l'activation de différents facteurs de transcription comme le facteur nucléaire NF- κ B associée en partie à la production des ERO (Montaner et al., 1998). La voie RhoA/ROCK participe aussi à la régulation positive de NADPH oxydases endothéliales et la production des ERO induite par l'angiotensine II (Higashi et al., 2003). Cependant, le rôle de la voie RhoA/ROCK dans le stress nitrosatif et les mécanismes par lesquels le fasudil diminue le stress nitrosatif dans la peau fibrosée induite par l'HOCl reste à clarifier.

4. Effet du fasudil dans l'atteinte pulmonaire induite par l'injection intradermique d'HOCl

La FP et l'HTP représentent deux causes principales de mortalité liée à la ScS (Steen and Medsger, 2007). Dans cette troisième étude, l'HOCl entraîne la FP chez la souris sans développement concomitant d'HTP. Notre étude précédente a montré que la FP chez la souris HOCl est essentiellement associée à une inflammation pulmonaire chronique, et que cette inflammation pulmonaire précède la phase fibroproliférative au niveau du poumon (Thong et al.). L'HOCl entraîne une infiltration nette de neutrophiles et de macrophages dans les poumons, ainsi qu'une surexpression de NOS-2 dans les épithéliums bronchiolaires et les cellules inflammatoires. Dans notre troisième étude, le fasudil diminue significativement l'infiltration de neutrophiles et de macrophages dans le parenchyme pulmonaire, et diminue la surexpression de NOS-2 dans les poumons.

L'inflammation joue un rôle important dans la fibrogenèse de la ScS (Geyer and Müller-Ladner, 2011). L'inflammation chronique, tant cutanée que pulmonaire,

accompagne les lésions de fibrose chez les patients atteints de ScS (Atamas et al., 1999; Majumdar et al., 1999). Les cellules inflammatoires activées sont capables de produire différentes cytokines et chémokines pro-inflammatoires ou pro-fibrosantes qui peuvent attirer les cellules inflammatoires et stimuler la fibrose tissulaire (Atamas and White, 2003a, 2003b; Bolster et al., 1997). La NOS-2 est exprimée non seulement dans l'épithélium bronchique et alvéolaire, mais aussi dans les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses au niveau du poumon (Förstermann et al., 1995; Warner et al., 1995). Lors d'une inflammation, les recrutements des cellules immunitaires et la sécrétion des cytokines et des chémokines sont capables de stimuler l'expression de NOS-2 et d'augmenter la production du NO au niveau du poumon (Kleinert et al., 2004). Le NO exhalé est considéré comme un marqueur de la présence de l'inflammation pulmonaire même avant l'existence de la FP chez les patients atteints de ScS (Tiev et al., 2009). Ainsi, la réduction de la FP chez la souris traitée par le fasudil pourrait être due à une diminution de la réponse inflammatoire pulmonaire.

Dans notre troisième étude, la voie RhoA/ROCK n'est activée qu'au niveau de la peau chez la souris HOCl, ce qui suggère que l'effet protecteur du fasudil dans la réponse inflammatoire pulmonaire et la FP est probablement secondaire à son effet bénéfique dans la fibrose cutanée. Il a été précédemment montré qu'il y a une activation anormale du système immunitaire chez la souris ScS induite par l'HOCl, ce qui contribue à la propagation de cette maladie (Kavian et al., 2010, 2012; Marut et al., 2013; Servettaz et al., 2009). Donc l'effet du fasudil sur les réponses inflammatoires et immunitaires systémiques mérite d'être davantage exploité.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

E. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La BPCO et la PID représentent deux causes fréquentes d'HTP car elles ont en commun plusieurs mécanismes physiopathologiques dont le dysfonctionnement endothélial, le remodelage vasculaire et la fibrose parenchymateuse. Notre travail permet de montrer l'implication de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie des atteintes vasculaires et interstitielles de la BPCO et de la PID avec ou sans HTP. Les résultats de notre travail peuvent être résumés ainsi :

Première étude : L'activation de la voie RhoA/ROCK est présente au niveau des artères pulmonaires chez les patients BPCO ayant un dysfonctionnement endothélial. Il existe une corrélation entre l'activité de la RhoA et l'expression génique de la NOS-3 ainsi que l'activité enzymatique de cette dernière.

Les interventions thérapeutiques utilisant les inhibiteurs des ROCK comme le fasudil permettront d'évaluer directement leurs effets sur le dysfonctionnement endothélial pulmonaire chez les patients atteints de BPCO.

Deuxième étude : L'activation de la voie RhoA/ROCK est impliquée dans la FP et l'HTP dans un modèle murin de PID induite par la bléomycine. L'inhibition des ROCK par le fasudil réduit la réponse inflammatoire, la FP et l'HTP induites par la bléomycine, via l'inhibition de la phosphorylation de Smad2/3 de la voie de signalisation par le TGF- β 1.

Les futurs travaux de notre groupe doivent tester l'effet curatif du fasudil une fois la FP installée dans ce modèle. L'association d'un traitement par le fasudil avec d'autres traitements conventionnels de l'HTP, tels que les antagonistes des récepteurs d'ET-1 et les inhibiteurs de PDE-5, mérite d'être évalué.

Troisième étude : L'activation de la voie RhoA/ROCK au niveau de la peau est impliqué dans la fibrose cutanée dans un modèle murin de ScS induite par l'HOCl. L'inhibition des ROCK par le fasudil réduit la fibrose cutanée et la FP, en partie via l'inhibition de la phosphorylation de Smad2/3 et de l'activation des protéines

ERK1/2.

Le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la prolifération et la production d'ERO au niveau des fibroblastes cutanés reste à évaluer. Les concentrations sériques d'auto-anticorps et de médiateurs pro-inflammatoires, ainsi que la population et la prolifération des splénocytes dans la rate seront à étudier afin de mieux comprendre les mécanismes liant l'atteinte locale et systémique dans la ScS.

BIBLIOGRAPHIE

F. BIBLIOGRAPHIE

Abe, K., Shimokawa, H., Morikawa, K., Uwatoku, T., Oi, K., Matsumoto, Y., Hattori, T., Nakashima, Y., Kaibuchi, K., Sueishi, K., et al. (2004). Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ. Res.* *94*, 385–393.

Abe, K., Tawara, S., Oi, K., Hizume, T., Uwatoku, T., Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., and Shimokawa, H. (2006). Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *48*, 280–285.

Abraham, A.S., Cole, R.B., Green, I.D., Hedworth-Whitty, R.B., Clarke, S.W., and Bishop, J.M. (1969). Factors contributing to the reversible pulmonary hypertension of patients with acute respiratory failure studies by serial observations during recovery. *Circ. Res.* *24*, 51–60.

Adnot, S., Kouyoumdjian, C., Defouilloy, C., Andrivet, P., Sediame, S., Herigault, R., and Fratacci, M.D. (1993). Hemodynamic and gas exchange responses to infusion of acetylcholine and inhalation of nitric oxide in patients with chronic obstructive lung disease and pulmonary hypertension. *Am. Rev. Respir. Dis.* *148*, 310–316.

Aepfelbacher, M., Essler, M., Huber, E., Sugai, M., and Weber, P.C. (1997). Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *17*, 1623–1629.

Ai, S., Kuzuya, M., Koike, T., Asai, T., Kanda, S., Maeda, K., Shibata, T., and Iguchi, A. (2001). Rho-Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways. *Atherosclerosis* *155*, 321–327.

Akhmetshina, A., Dees, C., Pileckyte, M., Szucs, G., Spriewald, B.M., Zwerina, J., Distler, O., Schett, G., and Distler, J.H.W. (2008). Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* *58*, 2553–2564.

Albinsson, S., Nordström, I., and Hellstrand, P. (2004). Stretch of the vascular wall induces smooth muscle differentiation by promoting actin polymerization. *J. Biol. Chem.* *279*, 34849–34855.

Alblas, J., Ulfman, L., Hordijk, P., and Koenderman, L. (2001). Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2137–2145.

Allanore, Y., Borderie, D., Lemaréchal, H., Ekindjian, O.G., and Kahan, A. (2004). Acute and sustained effects of dihydropyridine-type calcium channel antagonists on oxidative stress in systemic sclerosis. *Am. J. Med.* *116*, 595–600.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* *271*, 20246–20249.

Amano, M., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp. Cell Res.* *261*, 44–51.

Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J.*

Cell Sci. 116, 217–224.

Antoniou, K.M., Tzouveleakis, A., Alexandrakis, M.G., Sfiridaki, K., Tsiligianni, I., Rachiotis, G., Tzanakis, N., Bouros, D., Milic-Emili, J., and Siafakas, N.M. (2006). Different Angiogenic Activity in Pulmonary Sarcoidosis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. *Chest J.* 130, 982–988.

Anwar, K.N., Fazal, F., Malik, A.B., and Rahman, A. (2004). RhoA/Rho-associated kinase pathway selectively regulates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via activation of I kappa B kinase beta and phosphorylation of RelA/p65. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 6965–6972.

Ask, K., Martin, G.E.M., Kolb, M., and Gauldie, J. (2006). Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities, promises and pitfalls. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 389–393.

Ask, K., Bonniaud, P., Maass, K., Eickelberg, O., Margetts, P.J., Warburton, D., Groffen, J., Gauldie, J., and Kolb, M. (2008). Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 484–495.

Atamas, S.P., and White, B. (2003a). Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 537–550.

Atamas, S.P., and White, B. (2003b). The role of chemokines in the pathogenesis of scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15, 772–777.

Atamas, S.P., Yurovsky, V.V., Wise, R., Wigley, F.M., Goter Robinson, C.J., Henry, P., Alms, W.J., and White, B. (1999). Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 42, 1168–1178.

Bacakoğlu, F., Atasever, A., Ozhan, M.H., Gurgun, C., Ozkilic, H., and Guzelant, A. (2003). Plasma and bronchoalveolar lavage fluid levels of endothelin-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 70, 594–599.

Bailly, K., Ridley, A.J., Hall, S.M., and Haworth, S.G. (2004). RhoA activation by hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle cells is age and site specific. *Circ. Res.* 94, 1383–1391.

Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., and Arteaga, C.L. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* 275, 36803–36810.

Barberà J.A., and Blanco, I. (2009). Pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease: advances in pathophysiology and management. *Drugs* 69, 1153–1171.

Barberà J.A., Riverola, A., Roca, J., Ramirez, J., Wagner, P.D., Ros, D., Wiggs, B.R., and Rodriguez-Roisin, R. (1994). Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationships in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149, 423–429.

Barberà J.A., Roger, N., Roca, J., Rovira, I., Higenbottam, T.W., and Rodriguez-Roisin, R. (1996). Worsening of pulmonary gas exchange with nitric oxide inhalation in chronic obstructive

- pulmonary disease. *Lancet* 347, 436–440.
- Barberà J.A., Peinado, V.I., Santos, S., Ramirez, J., Roca, J., and Rodriguez-Roisin, R. (2001). Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 709–713.
- Barberà J.A., Peinado, V.I., and Santos, S. (2003). Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 21, 892–905.
- Barman, S.A. (2007). Vasoconstrictor effect of endothelin-1 on hypertensive pulmonary arterial smooth muscle involves Rho-kinase and protein kinase C. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L472–479.
- Barman, S.A., Zhu, S., and White, R.E. (2009). RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc. Heal. Risk Manag.* 5, 663–671.
- Barnes, P.J. (2000). Chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 343, 269–280.
- Baroni, S.S., Santillo, M., Bevilacqua, F., Luchetti, M., Spadoni, T., Mancini, M., Fraticelli, P., Sambo, P., Funaro, A., Kazlauskas, A., et al. (2006). Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 354, 2667–2676.
- Barua, R.S., Ambrose, J.A., Eales-Reynolds, L.J., DeVoe, M.C., Zervas, J.G., and Saha, D.C. (2001). Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation* 104, 1905–1910.
- Batteux, F., Kavian, N., and Servettaz, A. (2011). New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 23, 511–518.
- Battle, R.W., Davitt, M.A., Cooper, S.M., Buckley, L.M., Leib, E.S., Beglin, P.A., and Tischler, M.D. (1996). Prevalence of pulmonary hypertension in limited and diffuse scleroderma. *Chest* 110, 1515–1519.
- Behr, J., and Ryu, J.H. (2008). Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 31, 1357–1367.
- Belloq, A., Azoulay, E., Marullo, S., Flahault, A., Fouqueray, B., Philippe, C., Cadranet, J., and Baud, L. (1999). Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor-beta1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21, 128–136.
- Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim. Biophys. Acta* 1603, 47–82.
- Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., and Moses, H.L. (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 12, 27–36.
- Biernacka, A., Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N.G. (2011). TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors Chur Switz.* 29, 196–202.
- Birukova, A.A., Smurova, K., Birukov, K.G., Usatyuk, P., Liu, F., Kaibuchi, K., Ricks-Cord, A., Natarajan, V., Alieva, I., Garcia, J.G.N., et al. (2004). Microtubule disassembly induces

cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. *J. Cell. Physiol.* 201, 55–70.

Bolster, M.B., Ludwicka, A., Sutherland, S.E., Strange, C., and Silver, R.M. (1997). Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 40, 743–751.

Bond, J.E., Kokosis, G., Ren, L., Selim, M.A., Bergeron, A., and Levinson, H. (2011). Wound contraction is attenuated by fasudil inhibition of Rho-associated kinase. *Plast. Reconstr. Surg.* 128, 438e–450e.

Brimioulle, S., LeJeune, P., and Naeije, R. (1996). Effects of hypoxic pulmonary vasoconstriction on pulmonary gas exchange. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 81, 1535–1543.

Budhiraja, R., Tuder, R.M., and Hassoun, P.M. (2004). Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109, 159–165.

Bujak, M., Ren, G., Kweon, H.J., Dobaczewski, M., Reddy, A., Taffet, G., Wang, X.-F., and Frangogiannis, N.G. (2007). Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation* 116, 2127–2138.

Casciola-Rosen, L., Wigley, F., and Rosen, A. (1997). Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J. Exp. Med.* 185, 71–79.

Casey, P.J. (1995). Protein lipidation in cell signaling. *Science* 268, 221–225.

Celermajer, D.S., Sorensen, K.E., Georgakopoulos, D., Bull, C., Thomas, O., Robinson, J., and Deanfield, J.E. (1993). Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 88, 2149–2155.

Celermajer, D.S., Adams, M.R., Clarkson, P., Robinson, J., McCredie, R., Donald, A., and Deanfield, J.E. (1996). Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N. Engl. J. Med.* 334, 150–154.

Cerinic, M.M., Valentini, G., Sorano, G.G., D'Angelo, S., Cuomo, G., Fenu, L., Generini, S., Cinotti, S., Morfini, M., Pignone, A., et al. (2003). Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Semin. Arthritis Rheum.* 32, 285–295.

Chandler, D.B., Hyde, D.M., and Giri, S.N. (1983). Morphometric estimates of infiltrative cellular changes during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am. J. Pathol.* 112, 170–177.

Chapados, R., Abe, K., Ihida-Stansbury, K., McKean, D., Gates, A.T., Kern, M., Merklinger, S., Elliott, J., Plant, A., Shimokawa, H., et al. (2006). ROCK controls matrix synthesis in vascular smooth muscle cells: coupling vasoconstriction to vascular remodeling. *Circ. Res.* 99, 837–844.

Chaudhary, N.I., Schnapp, A., and Park, J.E. (2006). Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 769–776.

Chaulet, H., Desgranges, C., Renault, M.A., Dupuch, F., Ezan, G., Peiretti, F., Loirand, G., Pacaud,

- P., and Gadeau, A.P. (2001). Extracellular nucleotides induce arterial smooth muscle cell migration via osteopontin. *Circ. Res.* *89*, 772–778.
- Chen, S., Crawford, M., Day, R.M., Briones, V.R., Leader, J.E., Jose, P.A., and Lechleider, R.J. (2006). RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* *281*, 1765–1770.
- Choi, J.-J., Min, D.-J., Cho, M.-L., Min, S.-Y., Kim, S.-J., Lee, S.-S., Park, K.-S., Seo, Y.-I., Kim, W.-U., Park, S.-H., et al. (2003). Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* *30*, 1529–1533.
- Clerk, A., Kemp, T.J., Harrison, J.G., Mullen, A.J., Barton, P.J.R., and Sugden, P.H. (2002). Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-Jun N-terminal kinases are required for efficient up-regulation of c-Jun protein. *Biochem. J.* *368*, 101–110.
- Coccagna, G., and Lugaresi, E. (1978). Arterial blood gases and pulmonary and systemic arterial pressure during sleep in chronic obstructive pulmonary disease. *Sleep* *1*, 117–124.
- Condliffe, R., Kiely, D.G., Peacock, A.J., Corris, P.A., Gibbs, J.S.R., Vrapic, F., Das, C., Elliot, C.A., Johnson, M., DeSoyza, J., et al. (2009). Connective Tissue Disease-associated Pulmonary Arterial Hypertension in the Modern Treatment Era. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *179*, 151–157.
- Cool, C.D., Kennedy, D., Voelkel, N.F., and Tuder, R.M. (1997). Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Hum. Pathol.* *28*, 434–442.
- Cosgrove, G.P., Brown, K.K., Schiemann, W.P., Serls, A.E., Parr, J.E., Geraci, M.W., Schwarz, M.I., Cool, C.D., and Worthen, G.S. (2004). Pigment Epithelium-derived Factor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis A Role in Aberrant Angiogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *170*, 242–251.
- Cotton, S.A., Herrick, A.L., Jayson, M.I.V., and Freemont, A.J. (1999). Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. *J. Pathol.* *189*, 273–278.
- Crilly, A., Hamilton, J., Clark, C.J., Jardine, A., and Madhok, R. (2003). Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *42*, 1295–1298.
- Crossno, J.T., Jr, Garat, C.V., Reusch, J.E.B., Morris, K.G., Dempsey, E.C., McMurtry, I.F., Stenmark, K.R., and Klemm, D.J. (2007). Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *292*, L885–897.
- Dadmanesh, F., and Wright, J.L. (1997). Endothelin-A receptor antagonist BQ-610 blocks cigarette smoke-induced mitogenesis in rat airways and vessels. *Am. J. Physiol.* *272*, L614–618.
- Dahal, B.K., Kosanovic, D., Pamarthi, P.K., Sydykov, A., Lai, Y.-J., Kast, R., Schirok, H., Stasch, J.-P., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., et al. (2010). Therapeutic efficacy of azaindole-1 in experimental pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *36*, 808–818.
- Dai, Z.-K., Wu, B.-N., Chen, I.-C., Chai, C.-Y., Wu, J.-R., Chou, S.-H., Yeh, J.-L., Chen, I.-J., and

- Tan, M.-S. (2011). Attenuation of pulmonary hypertension secondary to left ventricular dysfunction in the rat by Rho-kinase inhibitor fasudil. *Pediatr. Pulmonol.* 46, 45–59.
- Dartevelle, P., Fadel, E., Mussot, S., Chapelier, A., Hervé P., de Perrot, M., Cerrina, J., Ladurie, F.L., Lehouerou, D., Humbert, M., et al. (2004). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 23, 637–648.
- Davie, N., Haleen, S.J., Upton, P.D., Polak, J.M., Yacoub, M.H., Morrell, N.W., and Wharton, J. (2002). ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 398–405.
- Deaton, R.A., Su, C., Valencia, T.G., and Grant, S.R. (2005). Transforming growth factor-beta1-induced expression of smooth muscle marker genes involves activation of PKN and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* 280, 31172–31181.
- Dees, C., Zerr, P., Tomcik, M., Beyer, C., Horn, A., Akhmetshina, A., Palumbo, K., Reich, N., Zwerina, J., Sticherling, M., et al. (2011). Inhibition of Notch signaling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum.* 63, 1396–1404.
- Denton, C.P., and Abraham, D.J. (2001). Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, 505–511.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584.
- Desbwards, N., Antier, D., Rochefort, G.Y., Apfeldorfer, C.S., Schenck, E., Hanton, G., and Hyvelin, J.-M. (2009). Dexfenfluramine discontinuous treatment does not worsen hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling but activates RhoA/ROCK pathway: consequences on pulmonary hypertension. *Eur. J. Pharmacol.* 602, 355–363.
- Dinh-Xuan, A.T., Higenbottam, T.W., Clelland, C.A., Pepke-Zaba, J., Cremona, G., Butt, A.Y., Large, S.R., Wells, F.C., and Wallwork, J. (1991). Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 1539–1547.
- Distler, O., Del Rosso, A., Giacomelli, R., Cipriani, P., Conforti, M.L., Guiducci, S., Gay, R.E., Michel, B.A., Brühlmann, P., Müller-Ladner, U., et al. (2002). Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res.* 4, R11.
- Do e Zhulanqige, Fukumoto, Y., Takaki, A., Tawara, S., Ohashi, J., Nakano, M., Tada, T., Saji, K., Sugimura, K., Fujita, H., et al. (2009). Evidence for Rho-kinase activation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 73, 1731–1739.
- Dobaczewski, M., Bujak, M., Li, N., Gonzalez-Quesada, C., Mendoza, L.H., Wang, X.-F., and Frangogiannis, N.G. (2010). Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ. Res.* 107, 418–428.
- Dorfmueller, P., Humbert, M., Perros, F., Sanchez, O., Simonneau, G., Müller, K.-M., and Capron, F. (2007). Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Hum. Pathol.* 38, 893–902.

- Doucet, C., Brouty-Boyé D., Pottin-Clemenceau, C., Jasmin, C., Canonica, G.W., and Azzarone, B. (1998). IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int. Immunol.* *10*, 1421–1433.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* *82*, 47–95.
- Duong-Quy, S., Dao, P., Hua-Huy, T., Guilluy, C., Pacaud, P., and Dinh-Xuan, A.T. (2011). Increased Rho-kinase expression and activity and pulmonary endothelial dysfunction in smokers with normal lung function. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *37*, 349–355.
- Duong-Quy, S., Bei, Y., Liu, Z., and Dinh-Xuan, A.T. (2012a). Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. *Pharmacol. Ther.*
- Duong-Quy, S., Rivière, S., Bei, Y., Duong-Ngo, C., Le-Dong, N.N., Hua-Huy, T., and Dinh-Xuan, A.T. (2012b). [Pulmonary hypertension: from molecular pathophysiology to haemodynamic abnormalities]. *Rev. Mal. Respir.* *29*, 956–970.
- Dupuis, J., Goresky, C.A., and Fournier, A. (1996). Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *81*, 1510–1515.
- Ebina, M., Shimizukawa, M., Shibata, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Endo, M., Sasano, H., Kondo, T., and Nukiwa, T. (2004). Heterogeneous Increase in CD34-positive Alveolar Capillaries in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *169*, 1203–1208.
- Eddahibi, S., Springall, D., Mannan, M., Carville, C., Chabrier, P.E., Levame, M., Raffestin, B., Polak, J., and Adnot, S. (1993). Dilator effect of endothelins in pulmonary circulation: changes associated with chronic hypoxia. *Am. J. Physiol.* *265*, L571–580.
- Essler, M., Hermann, K., Amano, M., Kaibuchi, K., Heesemann, J., Weber, P.C., and Aepfelbacher, M. (1998). Pasteurella multocida toxin increases endothelial permeability via Rho kinase and myosin light chain phosphatase. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *161*, 5640–5646.
- Esteve, P., Embade, N., Perona, R., Jiménez, B., del Peso, L., León, J., Arends, M., Miki, T., and Lacal, J.C. (1998). Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway. *Oncogene* *17*, 1855–1869.
- Estrada, C., Gómez, C., Martín-Nieto, J., De Frutos, T., Jiménez, A., and Villalobo, A. (1997). Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochem. J.* *326 (Pt 2)*, 369–376.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629–635.
- Eto, M., Barandić, C., Rathgeb, L., Kozai, T., Joch, H., Yang, Z., and Lüscher, T.F. (2001). Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ. Res.* *89*, 583–590.
- Eto, M., Kozai, T., Cosentino, F., Joch, H., and Lüscher, T.F. (2002). Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* *105*, 1756–1759.

- Evgenov, O.V., Pacher, P., Schmidt, P.M., Haskó G., Schmidt, H.H.H.W., and Stasch, J.-P. (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 755–768.
- Fagan, K.A., McMurtry, I.F., and Rodman, D.M. (2001). Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir. Res.* 2, 90–101.
- Fagan, K.A., Oka, M., Bauer, N.R., Gebb, S.A., Ivy, D.D., Morris, K.G., and McMurtry, I.F. (2004). Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L656–664.
- Falanga, V., Martin, T.A., Takagi, H., Kirsner, R.S., Helfman, T., Pardes, J., and Ochoa, M.S. (1993). Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 157, 408–412.
- Farber, H.W., and Loscalzo, J. (2004). Pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 351, 1655–1665.
- Farkas, L., Farkas, D., Ask, K., Möller, A., Gauldie, J., Margetts, P., Inman, M., and Kolb, M. (2009). VEGF ameliorates pulmonary hypertension through inhibition of endothelial apoptosis in experimental lung fibrosis in rats. *J. Clin. Invest.* 119, 1298–1311.
- Farkas, L., Gauldie, J., Voelkel, N.F., and Kolb, M. (2011). Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a tale of angiogenesis, apoptosis, and growth factors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 1–15.
- Feng, X.-H., and Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 659–693.
- Feng, J., Ito, M., Kureishi, Y., Ichikawa, K., Amano, M., Isaka, N., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K., Hartshorne, D.J., et al. (1999). Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 274, 3744–3752.
- Fernandes, L.B., Henry, P.J., and Goldie, R.G. (2007). Rho kinase as a therapeutic target in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 1, 25–33.
- Fisher, M.R., Mathai, S.C., Champion, H.C., Girgis, R.E., Houston-Harris, T., Hummers, L., Krishnan, J.A., Wigley, F., and Hassoun, P.M. (2006). Clinical differences between idiopathic and scleroderma-related pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum.* 54, 3043–3050.
- Fishman, A.P. (2000). Changing concepts of the pulmonary plexiform lesion. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 49, 485–492.
- Flanders, K.C., Sullivan, C.D., Fujii, M., Sowers, A., Anzano, M.A., Arabshahi, A., Major, C., Deng, C., Russo, A., Mitchell, J.B., et al. (2002). Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am. J. Pathol.* 160, 1057–1068.
- Fonseca, C., Lindahl, G.E., Ponticos, M., Sestini, P., Renzoni, E.A., Holmes, A.M., Spagnolo, P., Pantelidis, P., Leoni, P., McHugh, N., et al. (2007). A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 357, 1210–1220.
- Fonseca, C., Abraham, D., and Renzoni, E.A. (2011). Endothelin in Pulmonary Fibrosis. *Am. J.*

Respir. Cell Mol. Biol. 44, 1–10.

Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E.I., and Kleinert, H. (1995). Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1321–1332.

Frid, M.G., Aldashev, A.A., Dempsey, E.C., and Stenmark, K.R. (1997). Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ. Res.* 81, 940–952.

Fujita, H., Fukumoto, Y., Saji, K., Sugimura, K., Demachi, J., Nawata, J., and Shimokawa, H. (2010). Acute vasodilator effects of inhaled fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart Vessels* 25, 144–149.

Fukumoto, Y., and Shimokawa, H. (2011). Recent progress in the management of pulmonary hypertension. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 75, 1801–1810.

Fukumoto, Y., Matoba, T., Ito, A., Tanaka, H., Kishi, T., Hayashidani, S., Abe, K., Takeshita, A., and Shimokawa, H. (2005). Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart Br. Card. Soc.* 91, 391–392.

Fukumoto, Y., Tawara, S., and Shimokawa, H. (2007). Recent progress in the treatment of pulmonary arterial hypertension: expectation for rho-kinase inhibitors. *Tohoku J. Exp. Med.* 211, 309–320.

Funaba, M., Zimmerman, C.M., and Mathews, L.S. (2002). Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 41361–41368.

Funakoshi, Y., Ichiki, T., Shimokawa, H., Egashira, K., Takeda, K., Kaibuchi, K., Takeya, M., Yoshimura, T., and Takeshita, A. (2001). Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 38, 100–104.

Furukawa, F., Matsuzaki, K., Mori, S., Tahashi, Y., Yoshida, K., Sugano, Y., Yamagata, H., Matsushita, M., Seki, T., Inagaki, Y., et al. (2003). p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology* 38, 879–889.

Fuster, V., Steele, P.M., Edwards, W.D., Gersh, B.J., McGoon, M.D., and Frye, R.L. (1984). Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation* 70, 580–587.

Gabrielli, A., Svegliati, S., Moroncini, G., Pomponio, G., Santillo, M., and Avvedimento, E.V. (2008). Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. *Semin. Immunopathol.* 30, 329–337.

Gabrielli, A., Avvedimento, E.V., and Krieg, T. (2009). Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* 360, 1989–2003.

Gabrielli, A., Svegliati, S., Moroncini, G., and Amico, D. (2012). New insights into the role of oxidative stress in scleroderma fibrosis. *Open Rheumatol. J.* 6, 87–95.

Gerthoffer, W.T. (2007). Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ. Res.* 100, 607–621.

- Geyer, M., and Müller-Ladner, U. (2011). The pathogenesis of systemic sclerosis revisited. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *40*, 92–103.
- Gharaee-Kermani, M., Denholm, E.M., and Phan, S.H. (1996). Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J. Biol. Chem.* *271*, 17779–17784.
- Gharaee-Kermani, M., Hatano, K., Nozaki, Y., and Phan, S.H. (2005). Gender-based differences in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* *166*, 1593–1606.
- Ghosh, P.M., Mott, G.E., Ghosh-Choudhury, N., Radnik, R.A., Stapleton, M.L., Ghidoni, J.J., and Kreisberg, J.I. (1997). Lovastatin induces apoptosis by inhibiting mitotic and post-mitotic events in cultured mesangial cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1359*, 13–24.
- Giaid, A., and Saleh, D. (1995). Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* *333*, 214–221.
- Giaid, A., Michel, R.P., Stewart, D.J., Sheppard, M., Corrin, B., and Hamid, Q. (1993). Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* *341*, 1550–1554.
- Gien, J., Sedorf, G.J., Balasubramaniam, V., Tseng, N., Markham, N., and Abman, S.H. (2008). Chronic intrauterine pulmonary hypertension increases endothelial cell Rho kinase activity and impairs angiogenesis in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *295*, L680–687.
- Girgis, R.E., Mozammel, S., Champion, H.C., Li, D., Peng, X., Shimoda, L., Tudor, R.M., Johns, R.A., and Hassoun, P.M. (2007). Regression of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *292*, L1105–1110.
- Goerre, S., Staehli, C., Shaw, S., and Lüscher, T.F. (1995). Effect of cigarette smoking and nicotine on plasma endothelin-1 levels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *26 Suppl 3*, S236–238.
- Gorovoy, M., Niu, J., Bernard, O., Profirovic, J., Minshall, R., Neamu, R., and Voyno-Yasenetskaya, T. (2005). LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 26533–26542.
- Granström, B.W., Xu, C.-B., Nilsson, E., Vikman, P., and Edvinsson, L. (2006). Smoking particles enhance endothelin A and endothelin B receptor-mediated contractions by enhancing translation in rat bronchi. *Bmc Pulm. Med.* *6*, 6.
- Gratzinger, D., Canosa, S., Engelhardt, B., and Madri, J.A. (2003). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 modulates endothelial cell motility through the small G-protein Rho. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 1458–1469.
- Griffiths, M.J.D., and Evans, T.W. (2005). Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2683–2695.
- Guilluy, C., Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Gu érin, P., Sagan, C., Pacaud, P., and Loirand, G. (2005). Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway is involved in the beneficial effect of sildenafil on pulmonary hypertension. *Br. J. Pharmacol.* *146*, 1010–1018.
- Guilluy, C., Eddahibi, S., Agard, C., Guignabert, C., Izikki, M., Tu, L., Savale, L., Humbert, M., Fadel, E., Adnot, S., et al. (2009). RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary

- hypertension: role of 5-HT signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 1151–1158.
- Haak, T., Jungmann, E., Raab, C., and Usadel, K.H. (1994). Elevated endothelin-1 levels after cigarette smoking. *Metabolism.* 43, 267–269.
- Hachulla, E., Launay, D., Le Pavec, J., Mouthon, L., Guillevin, L., and de Groote, P. (2011). Hypertension artérielle pulmonaire et sclérodémie systémique : les pièges. *Presse Médicale* 40, 1S46–1S53.
- Halayko, A.J., and Solway, J. (2001). Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 90, 358–368.
- Hale, K.A., Niewoehner, D.E., and Cosio, M.G. (1980). Morphologic changes in the muscular pulmonary arteries: relationship to cigarette smoking, airway disease, and emphysema. *Am. Rev. Respir. Dis.* 122, 273–278.
- Hamada, K., Nagai, S., Tanaka, S., Handa, T., Shigematsu, M., Nagao, T., Mishima, M., Kitaichi, M., and Izumi, T. (2007). Significance of pulmonary arterial pressure and diffusion capacity of the lung as prognosticator in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 131, 650–656.
- Hanson, K.A., Ziegler, J.W., Rybalkin, S.D., Miller, J.W., Abman, S.H., and Clarke, W.R. (1998). Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. *Am. J. Physiol.* 275, L931–941.
- Hassoun, P.M., Mouthon, L., Barber à J.A., Eddahibi, S., Flores, S.C., Grimminger, F., Jones, P.L., Maitland, M.L., Michelakis, E.D., Morrell, N.W., et al. (2009). Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, S10–19.
- Haynes, W.G., Strachan, F.E., and Webb, D.J. (1995). Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* 92, 357–363.
- Heasman, S.J., Carlin, L.M., Cox, S., Ng, T., and Ridley, A.J. (2010). Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. *J. Cell Biol.* 190, 553–563.
- Hemnes, A.R., Zaiman, A., and Champion, H.C. (2008). PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L24–33.
- Hernández-Perera, O., Pérez-Sala, D., Navarro-Antolín, J., Sánchez-Pascuala, R., Hernández, G., Dáz, C., and Lamas, S. (1998). Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 101, 2711–2719.
- Hernández-Perera, O., Pérez-Sala, D., Soria, E., and Lamas, S. (2000). Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 87, 616–622.
- Herrick, A.L., and Matucci Cerinic, M. (2001). The emerging problem of oxidative stress and the role of antioxidants in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 19, 4–8.
- Herve, P., Humbert, M., Sitbon, O., Parent, F., Nunes, H., Legal, C., Garcia, G., and Simonneau,

- G. (2001). Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis. *Clin. Chest Med.* 22, 451–458.
- Hibbs, M.S., Postlethwaite, A.E., Mainardi, C.L., Seyer, J.M., and Kang, A.H. (1983). Alterations in collagen production in mixed mononuclear leukocyte-fibroblast cultures. *J. Exp. Med.* 157, 47–59.
- Hidaka, T., Hata, T., Soga, J., Fujii, Y., Idei, N., Fujimura, N., Kihara, Y., Noma, K., Liao, J.K., and Higashi, Y. (2010). Increased leukocyte rho kinase (ROCK) activity and endothelial dysfunction in cigarette smokers. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 33, 354–359.
- Higashi, M., Shimokawa, H., Hattori, T., Hiroki, J., Mukai, Y., Morikawa, K., Ichiki, T., Takahashi, S., and Takeshita, A. (2003). Long-Term Inhibition of Rho-Kinase Suppresses Angiotensin II-Induced Cardiovascular Hypertrophy in Rats In Vivo Effect on Endothelial NAD(P)H Oxidase System. *Circ. Res.* 93, 767–775.
- Hill, C.S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81, 1159–1170.
- Hinson, J.S., Medlin, M.D., Lockman, K., Taylor, J.M., and Mack, C.P. (2007). Smooth muscle cell-specific transcription is regulated by nuclear localization of the myocardin-related transcription factors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H1170–1180.
- Hirata, K., Kikuchi, A., Sasaki, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Matsuura, Y., Seki, H., Saida, K., and Takai, Y. (1992). Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 267, 8719–8722.
- Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K., and Marumo, F. (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 91, 1367–1373.
- Homma, N., Nagaoka, T., Morio, Y., Ota, H., Gebb, S.A., Karoor, V., McMurtry, I.F., and Oka, M. (2007). Endothelin-1 and serotonin are involved in activation of RhoA/Rho kinase signaling in the chronically hypoxic hypertensive rat pulmonary circulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50, 697–702.
- Homma, N., Nagaoka, T., Karoor, V., Imamura, M., Taraseviciene-Stewart, L., Walker, L.A., Fagan, K.A., McMurtry, I.F., and Oka, M. (2008). Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in protection against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in pneumonectomized rats by dehydroepiandrosterone. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295, L71–78.
- Howell, K., Ooi, H., Preston, R., and McLoughlin, P. (2004). Structural basis of hypoxic pulmonary hypertension: the modifying effect of chronic hypercapnia. *Exp. Physiol.* 89, 66–72.
- Huang, X., Gai, Y., Yang, N., Lu, B., Samuel, C.S., Thannickal, V.J., and Zhou, Y. (2011). Relaxin regulates myofibroblast contractility and protects against lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* 179, 2751–2765.
- Humbert, M., Morrell, N.W., Archer, S.L., Stenmark, K.R., MacLean, M.R., Lang, I.M., Christman, B.W., Weir, E.K., Eickelberg, O., Voelkel, N.F., et al. (2004). Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 13S–24S.

- Humbert, M., Montani, D., Perros, F., Dorfmüller, P., Adnot, S., and Eddahibi, S. (2008). Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascul. Pharmacol.* *49*, 113–118.
- Hutyrová B., Lukáč, J., Bosák, V., Buc, M., du Bois, R., and Petrek, M. (2004). Interleukin 1alpha single-nucleotide polymorphism associated with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* *31*, 81–84.
- Hyvelin, J.-M., Howell, K., Nichol, A., Costello, C.M., Preston, R.J., and McLoughlin, P. (2005). Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. *Circ. Res.* *97*, 185–191.
- Ihn, H. (2008). Autocrine TGF- β signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. *J. Dermatol. Sci.* *49*, 103–113.
- Ikeda, H., Kume, Y., Tejima, K., Tomiya, T., Nishikawa, T., Watanabe, N., Ohtomo, N., Arai, M., Arai, C., Omata, M., et al. (2007). Rho-kinase inhibitor prevents hepatocyte damage in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *293*, G911–917.
- Ishida, A., Sasaguri, T., Kosaka, C., Nojima, H., and Ogata, J. (1997). Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 10050–10057.
- Ishikura, K., Yamada, N., Ito, M., Ota, S., Nakamura, M., Isaka, N., and Nakano, T. (2006). Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* *70*, 174–178.
- Ishimaru, K., Ueno, H., Kagitani, S., Takabayashi, D., Takata, M., and Inoue, H. (2007). Fasudil attenuates myocardial fibrosis in association with inhibition of monocyte/macrophage infiltration in the heart of DOCA/salt hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *50*, 187–194.
- Izbicki, G., Segel, M.J., Christensen, T.G., Conner, M.W., and Breuer, R. (2002). Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.* *83*, 111–119.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 247–269.
- Janick-Buckner, D., Ranges, G.E., and Hacker, M.P. (1989a). Alteration of bronchoalveolar lavage cell populations following bleomycin treatment in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *100*, 465–473.
- Janick-Buckner, D., Ranges, G.E., and Hacker, M.P. (1989b). Effect of cytotoxic monoclonal antibody depletion of T-lymphocyte subpopulations on bleomycin-induced lung damage in C57BL/6J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *100*, 474–484.
- Jernigan, N.L., Walker, B.R., and Resta, T.C. (2008). Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *295*, L515–529.
- Jiang, B.H., Tawara, S., Abe, K., Takaki, A., Fukumoto, Y., and Shimokawa, H. (2007). Acute vasodilator effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in monocrotaline-induced pulmonary

- hypertension in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *49*, 85–89.
- Jiang, C., Huang, H., Liu, J., Wang, Y., Lu, Z., and Xu, Z. (2012). Fasudil, a rho-kinase inhibitor, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Int. J. Mol. Sci.* *13*, 8293–8307.
- Jimenez, S.A., and Derk, C.T. (2004). Following the Molecular Pathways toward an Understanding of the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Ann. Intern. Med.* *140*, 37–50.
- Jin, L., Ying, Z., and Webb, R.C. (2004). Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *287*, H1495–1500.
- Johnson, D.I. (1999). Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. Mmbr* *63*, 54–105.
- Johnson, R.L., and Ziff, M. (1976). Lymphokine stimulation of collagen accumulation. *J. Clin. Invest.* *58*, 240–252.
- Kamaraju, A.K., and Roberts, A.B. (2005). Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J. Biol. Chem.* *280*, 1024–1036.
- Kamiyama, M., Utsunomiya, K., Taniguchi, K., Yokota, T., Kurata, H., Tajima, N., and Kondo, K. (2003). Contribution of Rho A and Rho kinase to platelet-derived growth factor-BB-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *J. Atheroscler. Thromb.* *10*, 117–123.
- Kanda, T., Hayashi, K., Wakino, S., Homma, K., Yoshioka, K., Hasegawa, K., Sugano, N., Tatematsu, S., Takamatsu, I., Mitsuhashi, T., et al. (2005). Role of Rho-kinase and p27 in angiotensin II-induced vascular injury. *Hypertension* *45*, 724–729.
- Kaneko, T., Amano, M., Maeda, A., Goto, H., Takahashi, K., Ito, M., and Kaibuchi, K. (2000). Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *273*, 110–116.
- Karrer, S., Bosserhoff, A.K., Weiderer, P., Distler, O., Landthaler, M., Szeimies, R.-M., Müller-Ladner, U., Schölerich, J., and Hellerbrand, C. (2005). The -2518 promotor polymorphism in the MCP-1 gene is associated with systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 92–98.
- Kavian, N., Servettaz, A., Mongaret, C., Wang, A., Nicco, C., Chéreau, C., Grange, P., Vuiblet, V., Birembaut, P., Diebold, M.-D., et al. (2010). Targeting ADAM-17/notch signaling abrogates the development of systemic sclerosis in a murine model. *Arthritis Rheum.* *62*, 3477–3487.
- Kavian, N., Servettaz, A., Marut, W., Nicco, C., Chéreau, C., Weill, B., and Batteux, F. (2012). Sunitinib inhibits the phosphorylation of platelet-derived growth factor receptor β in the skin of mice with scleroderma-like features and prevents the development of the disease. *Arthritis Rheum.* *64*, 1990–2000.
- Khan, I., Oriowo, M.A., Chandrasekhar, B., and Kadavil, E.A. (2005). Attenuated noradrenaline-induced contraction of pulmonary arteries from rats treated with monocrotaline: role of rho kinase. *J. Vasc. Res.* *42*, 433–440.
- Killilea, D.W., Hester, R., Balczon, R., Babal, P., and Gillespie, M.N. (2000). Free radical production in hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol.*

Physiol. 279, L408–412.

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., et al. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245–248.

King, T.E., Jr, Tooze, J.A., Schwarz, M.I., Brown, K.R., and Cherniack, R.M. (2001). Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 1171–1181.

Kirk, T.Z., Mark, M.E., Chua, C.C., Chua, B.H., and Mayes, M.D. (1995). Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J. Biol. Chem.* 270, 3423–3428.

Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P., and Brautigan, D.L. (2000). Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J. Biol. Chem.* 275, 9897–9900.

Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., and Schwarz, P.M. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 255–266.

Koh, E.T., Lee, P., Gladman, D.D., and Abu-Shakra, M. (1996). Pulmonary Hypertension in Systemic Sclerosis: An Analysis of 17 Patients. *Rheumatology* 35, 989–993.

Kondrikov, D., Caldwell, R.B., Dong, Z., and Su, Y. (2011). Reactive oxygen species-dependent RhoA activation mediates collagen synthesis in hyperoxic lung fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1689–1698.

Kovacs, E.J. (1991). Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol. Today* 12, 17–23.

Kovacs, G., Berghold, A., Scheidl, S., and Olschewski, H. (2009). Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 34, 888–894.

Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., and Massagué J. (1999). A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 13, 804–816.

Lagaud, G., Gaudreault, N., Moore, E.D.W., Van Breemen, C., and Laher, I. (2002). Pressure-dependent myogenic constriction of cerebral arteries occurs independently of voltage-dependent activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H2187–2195.

Laufs, U., and Liao, J.K. (1998). Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J. Biol. Chem.* 273, 24266–24271.

Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., and Liao, J.K. (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97, 1129–1135.

Laufs, U., Marra, D., Node, K., and Liao, J.K. (1999a). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J. Biol. Chem.* 274, 21926–21931.

Laufs, U., Endres, M., and Liao, J.K. (1999b). [Regulation of endothelial NO production by Rho

- GTPase]. *Med. Klin. Munich Ger.* 1983 *94*, 211–218.
- Lawson, W.E., Polosukhin, V.V., Stathopoulos, G.T., Zoia, O., Han, W., Lane, K.B., Li, B., Donnelly, E.F., Holburn, G.E., Lewis, K.G., et al. (2005). Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin. *Am. J. Pathol.* *167*, 1267–1277.
- Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Kotliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., et al. (2001a). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J. Exp. Med.* *194*, 809–821.
- Lee, J.-H., Lee, D.-S., Kim, E.-K., Choe, K.-H., Oh, Y.-M., Shim, T.-S., Kim, S.-E., Lee, Y.-S., and Lee, S.-D. (2005). Simvastatin inhibits cigarette smoking-induced emphysema and pulmonary hypertension in rat lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *172*, 987–993.
- Lee, M.J., Thangada, S., Claffey, K.P., Ancellin, N., Liu, C.H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R.I., and Hla, T. (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* *99*, 301–312.
- Lee, S.D., Lee, D.S., Chun, Y.G., Shim, T.S., Lim, C.M., Koh, Y., Kim, W.S., Kim, D.S., and Kim, W.D. (2001b). Cigarette smoke extract induces endothelin-1 via protein kinase C in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *281*, L403–411.
- Leonard, E.J., and Yoshimura, T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today* *11*, 97–101.
- Letterio, J.J., and Roberts, A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 137–161.
- Lettieri, C.J., Nathan, S.D., Barnett, S.D., Ahmad, S., and Shorr, A.F. (2006). Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* *129*, 746–752.
- Leuchte, H.H., Neurohr, C., Baumgartner, R., Holzapfel, M., Giehl, W., Vogeser, M., and Behr, J. (2004). Brain natriuretic peptide and exercise capacity in lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *170*, 360–365.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L., and Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem.* *270*, 29051–29054.
- Levin, E.R. (1995). Endothelins. *N. Engl. J. Med.* *333*, 356–363.
- Li, F., Xia, W., Li, A., Zhao, C., and Sun, R. (2007). Long-term inhibition of Rho kinase with fasudil attenuates high flow induced pulmonary artery remodeling in rats. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* *55*, 64–71.
- Li, F., Xia, W., Yuan, S., and Sun, R. (2009). Acute inhibition of Rho-kinase attenuates pulmonary hypertension in patients with congenital heart disease. *Pediatr. Cardiol.* *30*, 363–366.
- Li, M., Liu, Y., Dutt, P., Fanburg, B.L., and Toksoz, D. (2007b). Inhibition of serotonin-induced mitogenesis, migration, and ERK MAPK nuclear translocation in vascular smooth muscle cells by atorvastatin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *293*, L463–471.

- Li, X.-H., Peng, J., Tan, N., Wu, W.-H., Li, T.-T., Shi, R.-Z., and Li, Y.-J. (2010). Involvement of asymmetric dimethylarginine and Rho kinase in the vascular remodeling in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Vascul. Pharmacol.* *53*, 223–229.
- Li, Z., Dong, X., Dong, X., Wang, Z., Liu, W., Deng, N., Ding, Y., Tang, L., Hla, T., Zeng, R., et al. (2005). Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat. Cell Biol.* *7*, 399–404.
- Liu, B., Itoh, H., Louie, O., Kubota, K., and Kent, K.C. (2002). The signaling protein Rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery* *132*, 317–325.
- Liu, J.S.-H., Zhao, M.-L., Brosnan, C.F., and Lee, S.C. (2001). Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Multiple Sclerosis Lesions. *Am. J. Pathol.* *158*, 2057–2066.
- Liu, S., Xu, S., Kennedy, L., Pala, D., Chen, Y., Eastwood, M., Carter, D.E., Black, C.M., Abraham, D.J., and Leask, A. (2007). FAK is required for TGFbeta-induced JNK phosphorylation in fibroblasts: implications for acquisition of a matrix-remodeling phenotype. *Mol. Biol. Cell* *18*, 2169–2178.
- Liu, Y., Suzuki, Y.J., Day, R.M., and Fanburg, B.L. (2004). Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ. Res.* *95*, 579–586.
- Loirand, G., Guérin, P., and Pacaud, P. (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ. Res.* *98*, 322–334.
- Lown, J.W., and Sim, S.K. (1977). The mechanism of the bleomycin-induced cleavage of DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *77*, 1150–1157.
- Machado, R.D., Eickelberg, O., Elliott, C.G., Geraci, M.W., Hanaoka, M., Loyd, J.E., Newman, J.H., Phillips, J.A., 3rd, Soubrier, F., Trembath, R.C., et al. (2009). Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* *54*, S32–42.
- Mack, C.P., Somlyo, A.V., Hautmann, M., Somlyo, A.P., and Owens, G.K. (2001). Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J. Biol. Chem.* *276*, 341–347.
- Magee, F., Wright, J.L., Wiggs, B.R., Paré P.D., and Hogg, J.C. (1988). Pulmonary vascular structure and function in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* *43*, 183–189.
- Mair, K.M., MacLean, M.R., Morecroft, I., Dempsie, Y., and Palmer, T.M. (2008). Novel interactions between the 5-HT transporter, 5-HT1B receptors and Rho kinase in vivo and in pulmonary fibroblasts. *Br. J. Pharmacol.* *155*, 606–616.
- Majumdar, S., Li, D., Ansari, T., Pantelidis, P., Black, C.M., Gazycki, M., du Bois, R.M., and Jeffery, P.K. (1999). Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *14*, 251–257.
- Makhluf, H.A., Stepniakowska, J., Hoffman, S., Smith, E., LeRoy, E.C., and Trojanowska, M. (1996). IL-4 upregulates tenascin synthesis in scleroderma and healthy skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* *107*, 856–859.

- Manali, E.D., Moschos, C., Triantafyllidou, C., Kotanidou, A., Psallidas, I., Karabela, S.P., Roussos, C., Papiris, S., Armaganidis, A., Stathopoulos, G.T., et al. (2011). Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin. *Bmc Pulm. Med.* *11*, 33.
- Mandegar, M., Fung, Y.-C.B., Huang, W., Remillard, C.V., Rubin, L.J., and Yuan, J.X.-J. (2004). Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc. Res.* *68*, 75–103.
- Mannino, D.M., and Buist, A.S. (2007). Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* *370*, 765–773.
- Manoury, B., Nenan, S., Leclerc, O., Guenon, I., Boichot, E., Planquois, J.-M., Bertrand, C.P., and Lagente, V. (2005). The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* *6*, 11.
- Martin, C., Göggel, R., Ressemeyer, A.-R., and Uhlig, S. (2004). Pressor responses to platelet-activating factor and thromboxane are mediated by Rho-kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *287*, L250–257.
- Marut, W., Kavian, N., Servettaz, A., Hua-Huy, T., Nicco, C., Chéreau, C., Weill, B., Dinh-Xuan, A.T., and Batteux, F. (2013). Angiotensin II receptor blockade ameliorates systemic fibrosis in the mouse. *Arthritis Rheum.*
- Marut, W.K., Kavian, N., Servettaz, A., Nicco, C., Ba, L.A., Doering, M., Chéreau, C., Jacob, C., Weill, B., and Batteux, F. (2012). The organotelluride catalyst (PHTE)₂NQ prevents HOCl-induced systemic sclerosis in mouse. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 1125–1132.
- Massagué J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* *19*, 2783–2810.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *Embo J.* *15*, 2208–2216.
- Mauviel, A. (2005). Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. *Methods Mol. Med.* *117*, 69–80.
- McNamara, P.J., Murthy, P., Kantores, C., Teixeira, L., Engelberts, D., van Vliet, T., Kavanagh, B.P., and Jankov, R.P. (2008). Acute vasodilator effects of Rho-kinase inhibitors in neonatal rats with pulmonary hypertension unresponsive to nitric oxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *294*, L205–213.
- Mehta, D., and Malik, A.B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* *86*, 279–367.
- Miano, J.M. (2003). Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *35*, 577–593.
- Michel, C.C., and Curry, F.E. (1999). Microvascular permeability. *Physiol. Rev.* *79*, 703–761.
- Milara, J., Ortiz, J.L., Juan, G., Guijarro, R., Almudever, P., Martorell, M., Morcillo, E.J., and Cortijo, J. (2010). Cigarette smoke exposure up-regulates endothelin receptor B in human pulmonary artery endothelial cells: molecular and functional consequences. *Br. J. Pharmacol.* *161*,

1599–1615.

Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., and Kolb, M. (2008). The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 362–382.

Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* *38*, 1709–1715.

Montani, D., Price, L.C., Dorfmüller, P., Achouh, L., Jař, X., Ya ři, A., Sitbon, O., Musset, D., Simonneau, G., and Humbert, M. (2009). Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *33*, 189–200.

Moore, B.B., and Hogaboam, C.M. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *294*, L152–160.

Mori, Y., Chen, S.-J., and Varga, J. (2003). Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum.* *48*, 1964–1978.

Morse, J., Barst, R., Horn, E., Cuervo, N., Deng, Z., and Knowles, J. (2002). Pulmonary hypertension in scleroderma spectrum of disease: lack of bone morphogenetic protein receptor 2 mutations. *J. Rheumatol.* *29*, 2379–2381.

Mouchaers, K.T.B., Schalić, I., de Boer, M.A., Postmus, P.E., van Hinsbergh, V.W.M., van Nieuw Amerongen, G.P., Vonk Noordegraaf, A., and van der Laarse, W.J. (2010). Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: comparison with bosentan and sildenafil. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *36*, 800–807.

Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2005). Non-Smad TGF- β signals. *J. Cell Sci.* *118*, 3573–3584.

Muggia, F.M., Louie, A.C., and Sikic, B.I. (1983). Pulmonary toxicity of antitumor agents. *Cancer Treat. Rev.* *10*, 221–243.

Murad, F. (2006). Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J. Med.* *355*, 2003–2011.

Murai, K., and Treisman, R. (2002). Interaction of serum response factor (SRF) with the Elk-1 B box inhibits RhoA-actin signaling to SRF and potentiates transcriptional activation by Elk-1. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7083–7092.

Murray, C.J., and Lopez, A.D. (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* *349*, 1498–1504.

Murrell, G.A., Francis, M.J., and Bromley, L. (1990). Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* *265*, 659–665.

Nadrous, H.F., Pellikka, P.A., Krowka, M.J., Swanson, K.L., Chaowalit, N., Decker, P.A., and Ryu, J.H. (2005). Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* *128*, 2393–2399.

Naeije, R., and Barberà J.A. (2001). Pulmonary hypertension associated with COPD. *Crit. Care Lond. Engl.* *5*, 286–289.

- Nagaoka, T., Morio, Y., Casanova, N., Bauer, N., Gebb, S., McMurtry, I., and Oka, M. (2004). Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *287*, L665–672.
- Nagaoka, T., Fagan, K.A., Gebb, S.A., Morris, K.G., Suzuki, T., Shimokawa, H., McMurtry, I.F., and Oka, M. (2005). Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *171*, 494–499.
- Nagaoka, T., Gebb, S.A., Karoor, V., Homma, N., Morris, K.G., McMurtry, I.F., and Oka, M. (2006). Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in pulmonary hypertension of the fawn-hooded rat. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *100*, 996–1002.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K., and Narumiya, S. (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *Febs Lett.* *392*, 189–193.
- Nakakuki, T., Ito, M., Iwasaki, H., Kureishi, Y., Okamoto, R., Moriki, N., Kongo, M., Kato, S., Yamada, N., Isaka, N., et al. (2005). Rho/Rho-kinase pathway contributes to C-reactive protein-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 2088–2093.
- Nathan, S.D., Noble, P.W., and Tuder, R.M. (2007). Idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: connecting the dots. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *175*, 875–880.
- Negi, V.S., Tripathy, N.K., Misra, R., and Nityanand, S. (1998). Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. *J. Rheumatol.* *25*, 462–466.
- Negoro, N., Hoshiga, M., Seto, M., Kohbayashi, E., Ii, M., Fukui, R., Shibata, N., Nakakoji, T., Nishiguchi, F., Sasaki, Y., et al. (1999). The kinase inhibitor fasudil (HA-1077) reduces intimal hyperplasia through inhibiting migration and enhancing cell loss of vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *262*, 211–215.
- Nguyen Dinh Cat, A., and Touyz, R.M. (2011). Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms. *Curr. Hypertens. Rep.* *13*, 122–128.
- Nicolls, M.R., Taraseviciene-Stewart, L., Rai, P.R., Badesch, D.B., and Voelkel, N.F. (2005). Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *26*, 1110–1118.
- Van Nieuw Amerongen, G.P., Koolwijk, P., Versteilen, A., and van Hinsbergh, V.W.M. (2003). Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 211–217.
- Nishimura, T., Faul, J.L., Berry, G.J., Vaszar, L.T., Qiu, D., Pearl, R.G., and Kao, P.N. (2002). Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *166*, 1403–1408.
- Noma, K., Goto, C., Nishioka, K., Hara, K., Kimura, M., Umemura, T., Jitsuiki, D., Nakagawa, K., Oshima, T., Chayama, K., et al. (2005). Smoking, endothelial function, and Rho-kinase in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 2630–2635.

- Noma, K., Goto, C., Nishioka, K., Jitsuiki, D., Umemura, T., Ueda, K., Kimura, M., Nakagawa, K., Oshima, T., Chayama, K., et al. (2007). Roles of rho-associated kinase and oxidative stress in the pathogenesis of aortic stiffness. *J. Am. Coll. Cardiol.* *49*, 698–705.
- Ogawa, F., Shimizu, K., Muroi, E., Hara, T., Hasegawa, M., Takehara, K., and Sato, S. (2006). Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *45*, 815–818.
- Oka, M., Homma, N., Taraseviciene-Stewart, L., Morris, K.G., Kraskauskas, D., Burns, N., Voelkel, N.F., and McMurtry, I.F. (2007). Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ. Res.* *100*, 923–929.
- Oka, M., Fagan, K.A., Jones, P.L., and McMurtry, I.F. (2008). Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension. *Br. J. Pharmacol.* *155*, 444–454.
- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal.* *11*, 545–554.
- Olson, M.F., Ashworth, A., and Hall, A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* *269*, 1270–1272.
- Onuma, T., Holland, J.F., Masuda, H., Waligunda, J.A., and Goldberg, G.A. (1974). Microbiological assay of bleomycin: inactivation, tissue distribution, and clearance. *Cancer* *33*, 1230–1238.
- Oriente, A., Fedarko, N.S., Pacocha, S.E., Huang, S.K., Lichtenstein, L.M., and Essayan, D.M. (2000). Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *292*, 988–994.
- Ortiz, L.A., Champion, H.C., Lasky, J.A., Gambelli, F., Gozal, E., Hoyle, G.W., Beasley, M.B., Hyman, A.L., Friedman, M., and Kadowitz, P.J. (2002). Enalapril protects mice from pulmonary hypertension by inhibiting TNF-mediated activation of NF-kappaB and AP-1. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *282*, L1209–1221.
- Oswald-Mammosser, M., Weitzenblum, E., Quoix, E., Moser, G., Chaouat, A., Charpentier, C., and Kessler, R. (1995). Prognostic factors in COPD patients receiving long-term oxygen therapy. Importance of pulmonary artery pressure. *Chest* *107*, 1193–1198.
- Ou, X., Feng, Y., Wen, F., Huang, X., Xiao, J., Wang, K., and Wang, T. (2008). Simvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chin. Med. J. (Engl.)* *121*, 1821–1829.
- Owens, G.K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* *75*, 487–517.
- Parizi, M., Howard, E.W., and Tomasek, J.J. (2000). Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase. *Exp. Cell Res.* *254*, 210–220.
- Le Pavec, J., Humbert, M., Mouthon, L., and Hassoun, P.M. (2010). Systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *181*, 1285–1293.
- Peinado, V.I., Barbera, J.A., Ramirez, J., Gomez, F.P., Roca, J., Jover, L., Gimferrer, J.M., and Rodriguez-Roisin, R. (1998). Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild

- COPD. *Am. J. Physiol.* 274, L908–913.
- Peinado, V.I., Barber á J.A., Abate, P., Ram íez, J., Roca, J., Santos, S., and Rodriguez-Roisin, R. (1999). Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1605–1611.
- Peinado, V.I., Santos, S., Ram íez, J., Roca, J., Rodriguez-Roisin, R., and Barber à J.A. (2002). Response to hypoxia of pulmonary arteries in chronic obstructive pulmonary disease: an in vitro study. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 20, 332–338.
- Pfizer, G. (2001). Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 91, 497–503.
- Phan, S.H., Thrall, R.S., and Ward, P.A. (1980). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: biochemical demonstration of increased rate of collagen synthesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 121, 501–506.
- Pietra, G.G., Edwards, W.D., Kay, J.M., Rich, S., Kernis, J., Schloo, B., Ayres, S.M., Bergofsky, E.H., Brundage, B.H., and Detre, K.M. (1989). Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* 80, 1198–1206.
- Pitsiou, G., Papakosta, D., and Bouros, D. (2011). Pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis: a review. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 82, 294–304.
- Postlethwaite, A.E., Smith, G.N., Mainardi, C.L., Seyer, J.M., and Kang, A.H. (1984). Lymphocyte modulation of fibroblast function in vitro: stimulation and inhibition of collagen production by different effector molecules. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 132, 2470–2477.
- Postlethwaite, A.E., Holness, M.A., Katai, H., and Raghov, R. (1992). Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J. Clin. Invest.* 90, 1479–1485.
- Pouwels-Fry, S., Pouwels, S., Fournier, C., Duchemin, A., Tillie-Leblond, I., Le Tourneau, T., and Wallaert, B. (2008). Effects of oxygen on exercise-induced increase of pulmonary arterial pressure in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis. Off. J. Wasog World Assoc. Sarcoidosis Granulomatous Disord.* 25, 133–139.
- Pryor, W.A., and Stone, K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 686, 12–27; discussion 27–28.
- Rabe, K.F., Hurd, S., Anzueto, A., Barnes, P.J., Buist, S.A., Calverley, P., Fukuchi, Y., Jenkins, C., Rodriguez-Roisin, R., van Weel, C., et al. (2007). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 532–555.
- Radeff, J.M., Nagy, Z., and Stern, P.H. (2004). Rho and Rho Kinase Are Involved in Parathyroid Hormone-Stimulated Protein Kinase C α Translocation and IL-6 Promoter Activity in Osteoblastic Cells. *J. Bone Miner. Res.* 19, 1882–1891.
- Rahimi, R.A., and Leof, E.B. (2007). TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J. Cell.*

Biochem. *102*, 593–608.

Raij, L., DeMaster, E.G., and Jaimes, E.A. (2001). Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. *J. Hypertens.* *19*, 891–897.

Rajkumar, V.S., Howell, K., Csiszar, K., Denton, C.P., Black, C.M., and Abraham, D.J. (2005). Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* *7*, R1113–1123.

RayChaudhury, A., Frischer, H., and Malik, A.B. (1996). Inhibition of endothelial cell proliferation and bFGF-induced phenotypic modulation by nitric oxide. *J. Cell. Biochem.* *63*, 125–134.

Reichenberger, F., Schauer, J., Kellner, K., Sack, U., Stiehl, P., and Winkler, J. (2001). Different expression of endothelin in the bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary diseases. *Lung* *179*, 163–174.

Renzoni, E.A., Walsh, D.A., Salmon, M., Wells, A.U., Sestini, P., Nicholson, A.G., Veeraraghavan, S., Bishop, A.E., Romanska, H.M., Pantelidis, P., et al. (2003). Interstitial Vasculature in Fibrosing Alveolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *167*, 438–443.

Van Rheen, Z., Fattman, C., Domarski, S., Majka, S., Klemm, D., Stenmark, K.R., and Nozik-Grayck, E. (2011). Lung extracellular superoxide dismutase overexpression lessens bleomycin-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *44*, 500–508.

Richens, T.R., Linderman, D.J., Horstmann, S.A., Lambert, C., Xiao, Y.-Q., Keith, R.L., Boé D.M., Morimoto, K., Bowler, R.P., Day, B.J., et al. (2009). Cigarette smoke impairs clearance of apoptotic cells through oxidant-dependent activation of RhoA. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *179*, 1011–1021.

Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* *70*, 389–399.

Riento, K., and Ridley, A.J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 446–456.

Riento, K., Guasch, R.M., Garg, R., Jin, B., and Ridley, A.J. (2003). RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 4219–4229.

Rikitake, Y., and Liao, J.K. (2005). Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ. Res.* *97*, 1232–1235.

Robertson, T.P., Dipp, M., Ward, J.P., Aaronson, P.I., and Evans, A.M. (2000). Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *Br. J. Pharmacol.* *131*, 5–9.

Robertson, T.P., Aaronson, P.I., and Ward, J.P.T. (2003). Ca²⁺ sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *284*, L1121–1126.

Rolfe, B.E., Worth, N.F., World, C.J., Campbell, J.H., and Campbell, G.R. (2005). Rho and

- vascular disease. *Atherosclerosis* 183, 1–16.
- Rougerie, P., and Delon, J. (2012). Rho GTPases: masters of T lymphocyte migration and activation. *Immunol. Lett.* 142, 1–13.
- Rubin, L.J. (2004). Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 126, 7S–10S.
- Ryu, J.H., Krowka, M.J., Pellikka, P.A., Swanson, K.L., and McGoon, M.D. (2007). Pulmonary hypertension in patients with interstitial lung diseases. *Mayo Clin. Proc.* 82, 342–350.
- Sakai, H., Fujita, A., Watanabe, A., Chiba, Y., Kamei, J., and Misawa, M. (2011). Different effects of smoke from heavy and light cigarettes on the induction of bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in rats. *J. Smooth Muscle Res. Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* 47, 1–10.
- Sakao, S., Taraseviciene-Stewart, L., Wood, K., Cool, C.D., and Voelkel, N.F. (2006). Apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells stimulates vascular smooth muscle cell growth. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L362–368.
- Saleh, D., Furukawa, K., Tsao, M.S., Maghazachi, A., Corrin, B., Yanagisawa, M., Barnes, P.J., and Giaid, A. (1997). Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16, 187–193.
- Sambo, P., Jannino, L., Candela, M., Salvi, A., Donini, M., Dusi, S., Luchetti, M.M., and Gabrielli, A. (1999). Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. *J. Invest. Dermatol.* 112, 78–84.
- Sambo, P., Baroni, S.S., Luchetti, M., Paroncini, P., Dusi, S., Orlandini, G., and Gabrielli, A. (2001). Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum.* 44, 2653–2664.
- Santos, S., Peinado, V.I., Ramírez, J., Melgosa, T., Roca, J., Rodríguez-Roisin, R., and Barberà, J.A. (2002). Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 19, 632–638.
- Santos, S., Peinado, V.I., Ramirez, J., Morales-Blanhir, J., Bastos, R., Roca, J., Rodríguez-Roisin, R., and Barbera, J.A. (2003). Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary arteries of smokers and patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 1250–1256.
- Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A.B., and Ooshima, A. (2003). Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest.* 112, 1486–1494.
- Satoh, S., Yamaguchi, T., Hitomi, A., Sato, N., Shiraiwa, K., Ikegaki, I., Asano, T., and Shimokawa, H. (2002). Fasudil attenuates interstitial fibrosis in rat kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Eur. J. Pharmacol.* 455, 169–174.
- Sausville, E.A., Peisach, J., and Horwitz, S.B. (1976). A role for ferrous ion and oxygen in the degradation of DNA by bleomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 814–822.

- Sauzeau, V., Le Mellionec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P., and Loirand, G. (2001). Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ. Res.* *88*, 1102–1104.
- Sawada, N., Itoh, H., Ueyama, K., Yamashita, J., Doi, K., Chun, T.H., Inoue, M., Masatsugu, K., Saito, T., Fukunaga, Y., et al. (2000). Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation* *101*, 2030–2033.
- Schaafsma, D., Roscioni, S.S., Meurs, H., and Schmidt, M. (2008). Monomeric G-proteins as signal transducers in airway physiology and pathophysiology. *Cell. Signal.* *20*, 1705–1714.
- Schiller, M., Javelaud, D., and Mauviel, A. (2004). TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J. Dermatol. Sci.* *35*, 83–92.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* *16*, 1587–1609.
- Schrier, D.J., Kunkel, R.G., and Phan, S.H. (1983a). The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* *127*, 63–66.
- Schrier, D.J., Phan, S.H., and McGarry, B.M. (1983b). The effects of the nude (nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation. *Am. Rev. Respir. Dis.* *127*, 614–617.
- Schroll, S., Arzt, M., Sebah, D., Nüchterlein, M., Blumberg, F., and Pfeifer, M. (2010). Improvement of bleomycin-induced pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis by the endothelin receptor antagonist Bosentan. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *170*, 32–36.
- Schweitzer, K.S., Hatoum, H., Brown, M.B., Gupta, M., Justice, M.J., Beteck, B., Van Demark, M., Gu, Y., Presson, R.G., Jr, Hubbard, W.C., et al. (2011). Mechanisms of lung endothelial barrier disruption induced by cigarette smoke: role of oxidative stress and ceramides. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *301*, L836–846.
- Seasholtz, T.M., Majumdar, M., Kaplan, D.D., and Brown, J.H. (1999). Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ. Res.* *84*, 1186–1193.
- Seasholtz, T.M., Zhang, T., Morissette, M.R., Howes, A.L., Yang, A.H., and Brown, J.H. (2001). Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27(Kip1) expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circ. Res.* *89*, 488–495.
- Sebbagh, M., Renvoizé C., Hamelin, J., Riché N., Bertoglio, J., and Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* *3*, 346–352.
- Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E., and Bréard, J. (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J. Exp. Med.* *201*, 465–471.
- Sebti, S.M., Mignano, J.E., Jani, J.P., Srimatkandada, S., and Lazo, J.S. (1989). Bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, and biochemical studies reveal membership in the

- cysteine proteinase family. *Biochemistry (Mosc.)* 28, 6544–6548.
- Seder, R.A., Marth, T., Sieve, M.C., Strober, W., Letterio, J.J., Roberts, A.B., and Kelsall, B. (1998). Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 5719–5728.
- Sekhon, H.S., Wright, J.L., and Churg, A. (1994). Cigarette smoke causes rapid cell proliferation in small airways and associated pulmonary arteries. *Am. J. Physiol.* 267, L557–563.
- Seo, B., Oemar, B.S., Siebenmann, R., von Segesser, L., and Lüscher, T.F. (1994). Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 89, 1203–1208.
- Servettaz, A., Guilpain, P., Goulvestre, C., Chéreau, C., Hercend, C., Nicco, C., Guillevin, L., Weill, B., Mouthon, L., and Batteux, F. (2007). Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 1202–1209.
- Servettaz, A., Goulvestre, C., Kavian, N., Nicco, C., Guilpain, P., Chéreau, C., Vuiblet, V., Guillevin, L., Mouthon, L., Weill, B., et al. (2009). Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 5855–5864.
- Sgonc, R., Gruschwitz, M.S., Dietrich, H., Recheis, H., Gershwin, M.E., and Wick, G. (1996). Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J. Clin. Invest.* 98, 785–792.
- Shibata, R., Kai, H., Seki, Y., Kato, S., Morimatsu, M., Kaibuchi, K., and Imaizumi, T. (2001). Role of Rho-associated kinase in neointima formation after vascular injury. *Circulation* 103, 284–289.
- Shimizu, Y., Dobashi, K., Iizuka, K., Horie, T., Suzuki, K., Tukagoshi, H., Nakazawa, T., Nakazato, Y., and Mori, M. (2001). Contribution of small GTPase Rho and its target protein rock in a murine model of lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 210–217.
- Shimokawa, H., and Takeshita, A. (2005). Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1767–1775.
- Shirao, S., Kashiwagi, S., Sato, M., Miwa, S., Nakao, F., Kurokawa, T., Todoroki-Ikeda, N., Mogami, K., Mizukami, Y., Kuriyama, S., et al. (2002). Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ. Res.* 91, 112–119.
- Shiu, Y.-T., Li, S., Marganski, W.A., Usami, S., Schwartz, M.A., Wang, Y.-L., Dembo, M., and Chien, S. (2004). Rho mediates the shear-enhancement of endothelial cell migration and traction force generation. *Biophys. J.* 86, 2558–2565.
- Shi-wen, X., Parapuram, S.K., Pala, D., Chen, Y., Carter, D.E., Eastwood, M., Denton, C.P., Abraham, D.J., and Leask, A. (2009). Requirement of transforming growth factor beta-activated kinase 1 for transforming growth factor beta-induced alpha-smooth muscle actin expression and extracellular matrix contraction in fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 60, 234–241.

- Shujaat, A., Bajwa, A.A., and Cury, J.D. (2012). Pulmonary Hypertension Secondary to COPD. *Pulm. Med.* 2012, 203952.
- Simonini, G., Cerinic, M.M., Generini, S., Zoppi, M., Anichini, M., Cesaretti, C., Pignone, A., Falcini, F., Lotti, T., and Cagnoni, M. (1999). Oxidative stress in Systemic Sclerosis. *Mol. Cell. Biochem.* 196, 85–91.
- Simonneau, G., Robbins, I.M., Beghetti, M., Channick, R.N., Delcroix, M., Denton, C.P., Elliott, C.G., Gaine, S.P., Gladwin, M.T., Jing, Z.-C., et al. (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, S43–54.
- Snider, G.L., Celli, B.R., Goldstein, R.H., O'Brien, J.J., and Lucey, E.C. (1978). Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin. Lung volumes, volume-pressure relations, carbon monoxide uptake, and arterial blood gas studied. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117, 289–297.
- Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (2003). Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* 83, 1325–1358.
- Sommer, N., Dietrich, A., Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A., Gudermann, T., Schulz, R., Seeger, W., Grimminger, F., and Weissmann, N. (2008). Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 32, 1639–1651.
- Spiropoulos, K., Trakada, G., Nikolaou, E., Prodromakis, E., Efremidis, G., Pouli, A., and Koniavitou, A. (2003). Endothelin-1 levels in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Respir. Med.* 97, 983–989.
- Spurzem, J.R., and Rennard, S.I. (2005). Pathogenesis of COPD. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 26, 142–153.
- Starcher, B.C., Kuhn, C., and Overton, J.E. (1978). Increased elastin and collagen content in the lungs of hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117, 299–305.
- Staus, D.P., Blaker, A.L., Taylor, J.M., and Mack, C.P. (2007). Diaphanous 1 and 2 regulate smooth muscle cell differentiation by activating the myocardin-related transcription factors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 478–486.
- Steen, V. (2003). Predictors of end stage lung disease in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 97–99.
- Steen, V., and Medsger, T.A. (2003). Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum.* 48, 516–522.
- Steen, V.D., and Medsger, T.A. (2007). Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 940–944.
- Stenmark, K.R., Fagan, K.A., and Frid, M.G. (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ. Res.* 99, 675–691.
- Strange, C., and Highland, K.B. (2005). Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *Curr.*

Opin. Pulm. Med. *11*, 452–455.

Su, Y., Han, W., Giraldo, C., De Li, Y., and Block, E.R. (1998). Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *19*, 819–825.

Van Suylen, R.J., Smits, J.F., and Daemen, M.J. (1998). Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *157*, 1423–1428.

Svegliati, S., Canello, R., Sambo, P., Luchetti, M., Paroncini, P., Orlandini, G., Discepoli, G., Paterno, R., Santillo, M., Cuzzo, C., et al. (2005). Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *280*, 36474–36482.

Tachihara, A., Jin, E., Matsuoka, T., Ghazizadeh, M., Yoshino, S., Takemura, T., Travis, W.D., and Kawanami, O. (2006). Critical Roles of Capillary Endothelial Cells for Alveolar Remodeling in Nonspecific and Usual Interstitial Pneumonias. *J. Nippon Med. Sch.* *73*, 203–213.

Takagi, K., Kawaguchi, Y., Hara, M., Sugiura, T., Harigai, M., and Kamatani, N. (2003). Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin. Exp. Immunol.* *134*, 538–544.

Takeda, Y., Nishikimi, T., Akimoto, K., Matsuoka, H., and Ishimitsu, T. (2010). Beneficial effects of a combination of Rho-kinase inhibitor and ACE inhibitor on tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* *33*, 965–973.

Takesono, A., Heasman, S.J., Wojciak-Stothard, B., Garg, R., and Ridley, A.J. (2010). Microtubules regulate migratory polarity through Rho/ROCK signaling in T cells. *Plos One* *5*, e8774.

Taki, F., Kume, H., Kobayashi, T., Ohta, H., Aratake, H., and Shimokata, K. (2007). Effects of Rho-kinase inactivation on eosinophilia and hyper-reactivity in murine airways by allergen challenges. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *37*, 599–607.

Tamby, M.C., Humbert, M., Guilpain, P., Servettaz, A., Dupin, N., Christner, J.J., Simonneau, G., Fermanian, J., Weill, B., Guillevin, L., et al. (2006). Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *28*, 799–807.

Taraseviciene-Stewart, L., Kasahara, Y., Alger, L., Hirth, P., Mc Mahon, G., Waltenberger, J., Voelkel, N.F., and Tuder, R.M. (2001). Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 427–438.

Tawara, S., Fukumoto, Y., and Shimokawa, H. (2007). Effects of combined therapy with a Rho-kinase inhibitor and prostacyclin on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *50*, 195–200.

Tew, M.B., Arnett, F.C., Reveille, J.D., and Tan, F.K. (2002). Mutations of bone morphogenetic protein receptor type II are not found in patients with pulmonary hypertension and underlying connective tissue diseases. *Arthritis Rheum.* *46*, 2829–2830.

- Thannickal, V.J., Lee, D.Y., White, E.S., Cui, Z., Larios, J.M., Chacon, R., Horowitz, J.C., Day, R.M., and Thomas, P.E. (2003). Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 12384–12389.
- Thannickal, V.J., Toews, G.B., White, E.S., Lynch, J.P., 3rd, and Martinez, F.J. (2004). Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu. Rev. Med.* 55, 395–417.
- Hua-huy T, Le-Dong NN, Duong-Quy S, Bei Y, Rivière S, Tiev KP, Nicco C, Batteux F, Dinh-Xuan AT. Increased exhaled nitric oxide precedes lung fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. 22^{ème} Congrès annuel de l'ERS. Vienne, 1–5 septembre 2012. *Eur Respir J* 2012; 40 (Suppl 56): 114s.
- Thrall, R.S., and Barton, R.W. (1984). A comparison of lymphocyte populations in lung tissue and in bronchoalveolar lavage fluid of rats at various times during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129, 279–283.
- Thrall, R.S., McCormick, J.R., Jack, R.M., McReynolds, R.A., and Ward, P.A. (1979). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *Am. J. Pathol.* 95, 117–130.
- Thusu, K.G., Morin, F.C., 3rd, Russell, J.A., and Steinhorn, R.H. (1995). The cGMP phosphodiesterase inhibitor zaprinast enhances the effect of nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 1605–1610.
- Tiev, K.P., Le-Dong, N.-N., Duong-Quy, S., Hua-Huy, T., Cabane, J., and Dinh-Xuan, A.T. (2009). Exhaled nitric oxide, but not serum nitrite and nitrate, is a marker of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 20, 200–206.
- Tolusso, B., Fabris, M., Caporali, R., Cuomo, G., Isola, M., Soldano, F., Montecucco, C., Valentini, G., and Ferraccioli, G. (2005). -238 and +489 TNF-alpha along with TNF-RII gene polymorphisms associate with the diffuse phenotype in patients with Systemic Sclerosis. *Immunol. Lett.* 96, 103–108.
- Tomasek, J.J., Vaughan, M.B., Kropp, B.P., Gabbiani, G., Martin, M.D., Haaksma, C.J., and Hinz, B. (2006). Contraction of myofibroblasts in granulation tissue is dependent on Rho/Rho kinase/myosin light chain phosphatase activity. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 14, 313–320.
- Trakada, G., Nikolaou, E., Pouli, A., Tsiamita, M., and Spiropoulos, K. (2003). Endothelin-1 Levels in Interstitial Lung Disease Patients During Sleep. *Sleep Breath.* 7, 111–118.
- Tsuchiya, N., Kuroki, K., Fujimoto, M., Murakami, Y., Tedder, T.F., Tokunaga, K., Takehara, K., and Sato, S. (2004). Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 50, 4002–4007.
- Tuder, R.M., Groves, B., Badesch, D.B., and Voelkel, N.F. (1994). Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.* 144, 275–285.
- Tuder, R.M., Flook, B.E., and Voelkel, N.F. (1995). Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of

- gene expression by nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 95, 1798–1807.
- Tuder, R.M., Chacon, M., Alger, L., Wang, J., Taraseviciene-Stewart, L., Kasahara, Y., Cool, C.D., Bishop, A.E., Geraci, M., Semenza, G.L., et al. (2001). Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J. Pathol.* 195, 367–374.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., et al. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389, 990–994.
- Uguccioni, M., Pulsatelli, L., Grigolo, B., Facchini, A., Fasano, L., Cinti, C., Fabbri, M., Gasbarrini, G., and Meliconi, R. (1995). Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Pathol.* 48, 330–334.
- Umezawa, H. (1974). Chemistry and mechanism of action of bleomycin. *Fed. Proc.* 33, 2296–2302.
- Umezawa, H., Ishizuka, M., Maeda, K., and Takeuchi, T. (1967). Studies on bleomycin. *Cancer* 20, 891–895.
- Urtasun, R., de la Rosa, L.C., and Nieto, N. (2008). Oxidative and Nitrosative Stress and Fibrogenic Response. *Clin. Liver Dis.* 12, 769–790.
- Van der Vaart, H., Postma, D.S., Timens, W., and ten Hacken, N.H.T. (2004). Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 59, 713–721.
- Vahebi, S., Kobayashi, T., Warren, C.M., de Tombe, P.P., and Solaro, R.J. (2005). Functional effects of rho-kinase-dependent phosphorylation of specific sites on cardiac troponin. *Circ. Res.* 96, 740–747.
- VanBavel, E., van der Meulen, E.T., and Spaan, J.A. (2001). Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Exp. Physiol.* 86, 585–592.
- Vanderpool, R.R., Kim, A.R., Molthen, R., and Chesler, N.C. (2011). Effects of acute Rho kinase inhibition on chronic hypoxia-induced changes in proximal and distal pulmonary arterial structure and function. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* 110, 188–198.
- Varga, J., and Abraham, D. (2007). Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J. Clin. Invest.* 117, 557–567.
- Verrecchia, F., Chu, M.L., and Mauviel, A. (2001). Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J. Biol. Chem.* 276, 17058–17062.
- Verrecchia, F., Mauviel, A., and Farge, D. (2006). Transforming growth factor- β signaling through the Smad proteins: Role in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 5, 563–569.
- Vestbo, J., Hurd, S.S., Agusti, A.G., Jones, P.W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P.J., Fabbri, L.M., Martinez, F.J., Nishimura, M., et al. (2012). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, GOLD Executive Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*

- Wahl, S.M., and Gately, C.L. (1983). Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T cell continuous T cell line origin. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *130*, 1226–1230.
- Ward, J.P.T., and McMurtry, I.F. (2009). Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Curr. Opin. Pharmacol.* *9*, 287–296.
- Ward, Y., Yap, S.-F., Ravichandran, V., Matsumura, F., Ito, M., Spinelli, B., and Kelly, K. (2002). The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J. Cell Biol.* *157*, 291–302.
- Warner, R.L., Paine, R., 3rd, Christensen, P.J., Marletta, M.A., Richards, M.K., Wilcoxon, S.E., and Ward, P.A. (1995). Lung sources and cytokine requirements for in vivo expression of inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *12*, 649–661.
- Watts, K.L., and Spiteri, M.A. (2004). Connective tissue growth factor expression and induction by transforming growth factor-beta is abrogated by simvastatin via a Rho signaling mechanism. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *287*, L1323–1332.
- Watts, K.L., Sampson, E.M., Schultz, G.S., and Spiteri, M.A. (2005). Simvastatin inhibits growth factor expression and modulates profibrogenic markers in lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *32*, 290–300.
- Watts, K.L., Cottrell, E., Hoban, P.R., and Spiteri, M.A. (2006). RhoA signaling modulates cyclin D1 expression in human lung fibroblasts; implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* *7*, 88.
- Weigand, L., Sylvester, J.T., and Shimoda, L.A. (2006). Mechanisms of endothelin-1-induced contraction in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *290*, L284–290.
- Weitzenblum, E. (2003). Chronic cor pulmonale. *Heart Br. Card. Soc.* *89*, 225–230.
- Weitzenblum, E., Loiseau, A., Hirth, C., Mirhom, R., and Rasaholinjanahary, J. (1979). Course of pulmonary hemodynamics in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* *75*, 656–662.
- Wennerberg, K., and Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.* *117*, 1301–1312.
- Whelan, T.P.M., Dunitz, J.M., Kelly, R.F., Edwards, L.B., Herrington, C.S., Hertz, M.I., and Dahlberg, P.S. (2005). Effect of preoperative pulmonary artery pressure on early survival after lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *24*, 1269–1274.
- Wigley, F.M., Lima, J.A.C., Mayes, M., McLain, D., Chapin, J.L., and Ward-Able, C. (2005). The prevalence of undiagnosed pulmonary arterial hypertension in subjects with connective tissue disease at the secondary health care level of community-based rheumatologists (the UNCOVER study). *Arthritis Rheum.* *52*, 2125–2132.
- Wilkinson, M., Langhorne, C.A., Heath, D., Barer, G.R., and Howard, P. (1988). A pathophysiological study of 10 cases of hypoxic cor pulmonale. *Q. J. Med.* *66*, 65–85.

- Wipff, J., Kahan, A., Hachulla, E., Sibilia, J., Cabane, J., Meyer, O., Mouthon, L., Guillevin, L., Junien, C., Boileau, C., et al. (2007a). Association between an endoglin gene polymorphism and systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *46*, 622–625.
- Wipff, P.-J., Rifkin, D.B., Meister, J.-J., and Hinz, B. (2007b). Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* *179*, 1311–1323.
- Wojciak-Stothard, B., and Ridley, A.J. (2002). Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul. Pharmacol.* *39*, 187–199.
- Wojciak-Stothard, B., Williams, L., and Ridley, A.J. (1999). Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J. Cell Biol.* *145*, 1293–1307.
- Wolfrum, S., Dendorfer, A., Rikitake, Y., Stalker, T.J., Gong, Y., Scalia, R., Dominiak, P., and Liao, J.K. (2004). Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 1842–1847.
- Worth, N.F., Campbell, G.R., and Rolfe, B.E. (2001). A role for rho in smooth muscle phenotypic regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *947*, 316–322.
- Worth, N.F., Campbell, G.R., Campbell, J.H., and Rolfe, B.E. (2004). Rho expression and activation in vascular smooth muscle cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* *59*, 189–200.
- Worthylake, R.A., Lemoine, S., Watson, J.M., and Burridge, K. (2001). RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J. Cell Biol.* *154*, 147–160.
- Wright, J.L., Lawson, L., Paré P.D., Hooper, R.O., Peretz, D.I., Nelems, J.M., Schulzer, M., and Hogg, J.C. (1983). The structure and function of the pulmonary vasculature in mild chronic obstructive pulmonary disease. The effect of oxygen and exercise. *Am. Rev. Respir. Dis.* *128*, 702–707.
- Wright, J.L., Petty, T., and Thurlbeck, W.M. (1992). Analysis of the structure of the muscular pulmonary arteries in patients with pulmonary hypertension and COPD: National Institutes of Health nocturnal oxygen therapy trial. *Lung* *170*, 109–124.
- Wright, J.L., Tai, H., Dai, J., and Churg, A. (2002). Cigarette smoke induces rapid changes in gene expression in pulmonary arteries. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* *82*, 1391–1398.
- Wright, J.L., Tai, H., and Churg, A. (2004). Cigarette smoke induces persisting increases of vasoactive mediators in pulmonary arteries. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *31*, 501–509.
- Wright, J.L., Tai, H., and Churg, A. (2006). Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *100*, 672–678.
- Wu, W., Platoshyn, O., Firth, A.L., and Yuan, J.X.-J. (2007). Hypoxia divergently regulates production of reactive oxygen species in human pulmonary and coronary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *293*, L952–959.
- Xu, D.-Q., Luo, Y., Liu, Y., Wang, J., Zhang, B., Xu, M., Wang, Y.-X., Dong, H.-Y., Dong, M.-Q., Zhao, P.-T., et al. (2010a). Beta-estradiol attenuates hypoxic pulmonary hypertension by

- stabilizing the expression of p27kip1 in rats. *Respir. Res.* *11*, 182.
- Xu, E.Z., Kantores, C., Ivanovska, J., Engelberts, D., Kavanagh, B.P., McNamara, P.J., and Jankov, R.P. (2010b). Rescue treatment with a Rho-kinase inhibitor normalizes right ventricular function and reverses remodeling in juvenile rats with chronic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *299*, H1854–1864.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* *19*, 156–172.
- Yamakawa, T., Tanaka, S., Numaguchi, K., Yamakawa, Y., Motley, E.D., Ichihara, S., and Inagami, T. (2000). Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* *35*, 313–318.
- Yamamoto, T., and Nishioka, K. (2002). Animal model of sclerotic skin. V: Increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *102*, 77–83.
- Yamamoto, T., and Nishioka, K. (2005). Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp. Dermatol.* *14*, 81–95.
- Yano, Y., Saito, Y., Narumiya, S., and Sumpio, B.E. (1996). Involvement of rho p21 in cyclic strain-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK), morphological changes and migration of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *224*, 508–515.
- Yoshida, K., Matsuzaki, K., Mori, S., Tahashi, Y., Yamagata, H., Furukawa, F., Seki, T., Nishizawa, M., Fujisawa, J., and Okazaki, K. (2005). Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am. J. Pathol.* *166*, 1029–1039.
- Zakynthinos, E., Daniil, Z., Papanikolaou, J., and Makris, D. (2011). Pulmonary hypertension in COPD: pathophysiology and therapeutic targets. *Curr. Drug Targets* *12*, 501–513.
- Zamora, M.A., Dempsey, E.C., Walchak, S.J., and Stelzner, T.J. (1993). BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *9*, 429–433.
- Zhang, W.-Z., Venardos, K., Chin-Dusting, J., and Kaye, D.M. (2006). Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension* *48*, 278–285.
- Zhao, J., Shi, W., Wang, Y.-L., Chen, H., Bringas, P., Jr, Datto, M.B., Frederick, J.P., Wang, X.-F., and Warburton, D. (2002). Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *282*, L585–593.
- Zhao, L., Sebkhi, A., Ali, O., Wojciak-Stothard, B., Mamanova, L., Yang, Q., Wharton, J., and Wilkins, M.R. (2009). Simvastatin and sildenafil combine to attenuate pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *34*, 948–957.
- Zhao, X.-H., Laschinger, C., Arora, P., Sz ási, K., Kapus, A., and McCulloch, C.A. (2007). Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J. Cell*

Sci. 120, 1801–1809.

Ziino, A.J.A., Ivanovska, J., Belcastro, R., Kantores, C., Xu, E.Z., Lau, M., McNamara, P.J., Tanswell, A.K., and Jankov, R.P. (2010). Effects of rho-kinase inhibition on pulmonary hypertension, lung growth, and structure in neonatal rats chronically exposed to hypoxia. *Pediatr. Res.* 67, 177–182.

Zuckerbraun, B.S., Stoyanovsky, D.A., Sengupta, R., Shapiro, R.A., Ozanich, B.A., Rao, J., Barbato, J.E., and Tzeng, E. (2007). Nitric oxide-induced inhibition of smooth muscle cell proliferation involves S-nitrosation and inactivation of RhoA. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C824–831.

(2000). American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 646–664.

(2002). American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 277–304.

RESUME

Implications de la voie RhoA/Rho-kinases dans la physiopathologie des atteintes vasculaires et interstitielles pulmonaires des maladies respiratoires chroniques : études humaines et expérimentales chez la souris

La voie RhoA/Rho-kinase (ROCK) joue un rôle important dans la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire (HTP) par son implication dans le dysfonctionnement endothélial, la constriction et le remodelage des vaisseaux pulmonaires. Selon les classifications internationales, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la pneumopathie infiltrante diffuse (PID) sont deux causes fréquentes d'HTP ayant en commun plusieurs mécanismes physiopathologiques dont le dysfonctionnement endothélial, le remodelage vasculaire et la fibrose parenchymateuse. Les objectifs de ce travail étaient d'étudier le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de la BPCO et de la PID avec ou sans HTP et de préciser les anomalies moléculaires liées à la perturbation de la signalisation de cette voie dans chacune de ces situations.

Le dysfonctionnement endothélial est un événement essentiel dans l'initiation et la progression de la BPCO. L'activation de la voie RhoA/ROCK dans le dysfonctionnement endothélial systémique et pulmonaire a été mise en évidence chez les tabagiques avec ou sans BPCO. Les résultats de notre première étude montrent l'existence d'une activation de la voie RhoA/ROCK au niveau des artères pulmonaires chez les patients BPCO ayant un dysfonctionnement endothélial, et une corrélation entre l'activité de la RhoA et l'expression génique et l'activité de la NO synthase endothéliale (NOS-3).

L'HTP est une complication grave des PID. Nous avons montré dans notre deuxième étude l'implication de la voie RhoA/ROCK dans la réponse inflammatoire et la fibrose pulmonaire (FP) dans un modèle murin de PID induite par injection intratrachéale de bléomycine (BLM). Nous avons ensuite testé l'effet préventif du fasudil, un inhibiteur des ROCK, sur l'apparition de la FP et l'HTP expérimentales induites par la BLM. Les résultats de cette deuxième étude montrent que la FP et l'HTP sont associés à une activation de la voie RhoA/ROCK dans ce modèle murin et que le fasudil inhibe la réponse inflammatoire, la FP et l'HTP, via l'inhibition de la phosphorylation de Smad2/3 de la voie de signalisation par le TGF- β 1.

La FP et l'HTP représentent deux causes principales de mortalité liée à la sclérodémie systémique (ScS). Nous avons étudié le rôle de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de la fibrose cutanée et l'atteinte pulmonaire dans un modèle murin de ScS induite par injection intradermique d'acide hypochloreux (HOCl). Les résultats de cette troisième étude montrent l'association entre la fibrose cutanée induite par l'HOCl et l'activation de la voie RhoA/ROCK au niveau de la peau, et l'effet préventif du fasudil sur la fibrose cutanée et pulmonaire, en partie via l'inhibition de la phosphorylation de Smad2/3 et de l'activation des protéines ERK1/2.

Ces résultats suggèrent l'implication de la voie RhoA/ROCK dans la physiopathologie de la BPCO et de la PID avec ou sans HTP. La voie RhoA/ROCK pourrait de ce fait représenter une nouvelle cible thérapeutique dans la BPCO et la PID avec ou sans HTP.