



Université de Sherbrooke

**Rôle des Résolvines, dérivés trihydroxylés du DHA et de l'EPA, dans la résolution de l'inflammation pour la prévention de l'hypertension artérielle pulmonaire.**

Par  
Roddy Gaëtan HIRAM  
Programme de Physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de Docteur (philosophiae doctor : Ph.D.)  
en Physiologie (biophysique)

Sherbrooke, Québec, Canada  
Avril, 2016

Membres du jury d'évaluation  
Pr Ahmed Chraïbi, Président du jury, Département de Pharmacologie-Physiologie  
Pr Pedro D'Orléans-Juste, externe au programme, Dép. de Pharmacologie-Physiologie  
Pr Steve Provencher, externe à l'université, Département de Médecine, Université Laval  
Pr Éric Rousseau, Directeur de Thèse, Département d'Obstétrique et Gynécologie

© Roddy Gaëtan HIRAM, Avril 2016

*[Dédicace]*

*Je dédie cette thèse de doctorat à mon père **M. Clovis Hiram**  
Que j'aimerais remercier pour tout ce qu'il m'a appris, pour sa gentillesse,  
sa bonne humeur constante et pour tout son amour.  
De là où tu es, si tu me vois, j'aimerais que tu sois fier de moi aujourd'hui.*

*À ma mère, **Mme Marie-Christine Hiram**,  
Une femme courageuse qui depuis la mort de mon père, a été « Maman et Papa ».  
Tu nous as élevés seule et tu as toujours travaillé dur pour que tes trois enfants reçoivent la  
meilleure éducation et réalisent leurs rêves.*

*À ma femme, **Mme Nina Hiram**,  
Qui est quotidiennement à mes côtés pour m'encourager, me soutenir, me motiver et  
m'apporter beaucoup d'amour, dans chaque déficit et chaque combat.  
Alors il est évident que tu mérites de recevoir les honneurs à chaque victoire.*

*Merci infiniment ...*

*[Épigraphe]*

*Proverbes de Salomon Chapitre 8 versets 10 et 11 :*

**<< Préférez l'Instruction à l'argent, et la Science à l'or le plus précieux; Car la Sagesse vaut mieux que les perles, elle a plus de valeur que tous les objets de prix. >>**



## RÉSUMÉ

### Rôle des Résolvines, dérivés trihydroxylés du DHA et de l'EPA, dans la résolution de l'inflammation pour la prévention de l'hypertension artérielle pulmonaire.

Par

Roddy Gaëtan HIRAM

Programmes de Physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en Physiologie (Biophysique),  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

L'Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare dans laquelle les artères pulmonaires subissent un important remodelage et un recrutement de cellules proinflammatoires dans la paroi. Généralement les patients atteints sont diagnostiqués tardivement. Or, à son stade avancé, l'HTAP est irréversible. Aucun traitement actuel ne permet de soigner définitivement les patients.

Nous émettons l'hypothèse que l'inflammation pourrait être à l'origine de plusieurs dysfonctions cellulaires et que sa résolution pourrait probablement prévenir l'HTAP.

Deux modèles d'HTAP expérimentale ont été utilisés. Le premier met en jeu des artères pulmonaires humaines (APH) cultivées *in vitro* et rendues hyperréactives et sur lesquelles les effets des Résolvines D1 et E1 ainsi que leurs précurseurs respectifs ont été évalués. Le deuxième est un modèle *in vivo* bien connu de rats hypertendus à la monocrotaline (MCT) sur lesquels le rôle curatif du MAG-DHA (un monoacylglycérade de l'acide docosaénoïque) a été étudié quand l'HTAP est déjà installée.

Les résultats démontrent que 24 h de prétraitement *in vitro* avec le TNF $\alpha$ , l'IL-6 ou l'ET-1 augmente la réactivité pharmacomécanique et la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> des APH stimulées avec 80 mM de KCl, 1  $\mu$ M de 5-hydroxytryptamine (5-HT), 30 nM U-46619 et 1  $\mu$ M de PDBu. En revanche, 300 nM de RvD1 ou de RvE1 ainsi que 1  $\mu$ M de MAG-DHA ou de MAG-EPA (monoacylglycérade de l'acide éicosapentaénoïque) renversent les effets induits par les traitements proinflammatoires et vasoconstricteurs. De plus, *in vivo*, il a été démontré que 7 jours de traitement avec le MAG-DHA peuvent permettre de résoudre le statut inflammatoire dans un modèle d'hypertension pulmonaire induite par la MCT chez le rat. Dans les deux modèles, l'expression de biomarqueurs inflammatoires (TNF $\alpha$ , COX-2, STAT3) et les niveaux de phosphorylation des activateurs nucléaires du remodelage tels que c-Fos, c-Jun, NF $\kappa$ B et MMP9 étaient augmentées par les traitements proinflammatoires. Cependant, les expériences d'immuno-buvardage montrent que la RvD1, la RvE1 et leurs précurseurs normalisaient les niveaux de détections de ces marqueurs de l'inflammation.

En conclusion, l'ensemble des données montrent que les Résolvines D1 et E1 ainsi que leurs précurseurs sont des candidats efficaces pour résoudre l'inflammation induite pour prévenir l'hyperréactivité pharmacologique des artères pulmonaires.

Mots clés : **Oméga3, MAG-DHA, MAG-EPA, Cellules Musculaires Lisses, Hypertension Artérielle Pulmonaire, Inflammation, Résolvines.**

## SUMMARY

### **Impact of Resolvins, trihydroxylated derivatives from DHA and EPA, in the resolution of inflammation to prevent pulmonary hypertension.**

By

Roddy Gaëtan HIRAM

Program of Physiology

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of  
philosophiae doctor (Ph.D.) in Physiology (Biophysics),  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Pulmonary hypertension (PH) is rare disease characterized by an important remodelling and proinflammatory cells recruitment into the pulmonary artery wall. Because of the late diagnostic, the patient care is often performed when PH is at its irreversible and most severe stage. Unfortunately, none of the actual treatments are able to cure the patients for the long term.

We hypothesize that inflammation could be a major event at the origin of all the other cellular dysfunctions that characterise PH. Resolvins; metabolites from Oméga-3 could resolve inflammation and potentially prevent or reverse PH.

In the present study, two models of PH have been used. The first one is an *in vitro* model involving cultured human pulmonary arteries (HPA) in which inflammatory or hyperreactive conditions have been induced to evaluate the effects of Resolvin D1 and E1 and their precursors. The second model is a well-known *in vivo* model of monocrotaline-induced PH in rats, treated with MAG-DHA (monoacylglyceride form of docosahexaenoic acid) to evaluate the curative ability of this compound to resolve the disease at its severe stage.

Results show that 24-h pre-treatment with TNF $\alpha$ , IL-6 or ET-1 increased the reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of HPA as revealed by agonist challenges with: 80 mM KCl, 1  $\mu$ M 5-hydroxytryptamine (5-HT), 30 nM U-46619 and 1  $\mu$ M PDBu. However, 300 nM RvD1 or RvE1, as well as 1  $\mu$ M MAG-DHA or MAG-EPA (monoacylglyceride form of eicosapentaenoic acid) strongly reversed the over responsiveness induced by pro-inflammatory and hyperreactive treatments. Moreover, a 7-day treatment with MAG-DHA is able to resolve the inflammatory status in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. In both models, the inflammatory status enhanced the expression of inflammatory biomarkers (TNF- $\alpha$ , COX-2, STAT-3) as well as the detection of MMP9 and phosphorylated nuclear factors such as P-c-Fos, P-c-Jun and P-NF- $\kappa$ B involved in the activation of wall remodeling. Hence, RvD1, RvE1 and their precursors normalized the expression of these inflammatory biomarkers.

In conclusion, Resolvin D1 and E1 and their respective precursors MAG-DHA and MAG-EPA could inhibit inflammation status to prevent and potentially cure pulmonary hypertension.

**Keywords : Omega-3, MAG-DHA, MAG-EPA, Resolvins, Pulmonary Hypertension, Inflammation, Smooth Muscle Cells.**

## TABLE DES MATIERES

<b>Résumé .....</b>	<b>vi</b>
<b>Summary.....</b>	<b>vii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des équations.....</b>	<b>xii</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Histoire de l'hypertension artérielle pulmonaire .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Physiologie pulmonaire.....</b>	<b>3</b>
2.1. Anatomie .....	3
2.2. Morphologie et hémodynamique des artères pulmonaires.....	5
<b>3. Hypertension artérielle pulmonaire .....</b>	<b>7</b>
3.1. Physiopathologie.....	7
3.2. Symptômes .....	9
3.3. Classification.....	10
3.4. Électrophysiologie et dysfonctions endothéliales.....	13
3.4.1. Oxyde Nitrique.....	14
3.4.2. Prostacycline .....	16
3.4.3. Endothéline-1.....	17
3.4.4. Thromboxane A <sub>2</sub> .....	19
3.4.5. Remodelage de l'endothélium .....	20
3.5. Électrophysiologie et anomalies des cellules musculaires lisses.....	21
3.5.1. Machinerie contractile .....	21
3.5.2. Influence du potentiel membranaire.....	23
3.5.3. Anomalies des canaux ioniques .....	25
3.5.4. Remodelage de la média.....	27
<b>4. Modèles expérimentaux d'HTAP .....</b>	<b>28</b>
4.1. Modèles <i>in vivo</i> .....	28
4.2. Modèles <i>in vitro</i> .....	29

<b>5. Traitements.....</b>	<b>30</b>
5.1. Activateurs de la voie NO-Guanylate Cyclase soluble - GMPC .....	30
5.2. Activateurs de la voie de la Prostacycline .....	30
5.3. Antagonistes de la voie de l'Endothéline-1 .....	31
<b>6. Inflammation .....</b>	<b>32</b>
6.1. IL-1 $\beta$ .....	32
6.2. IL-6.....	33
6.3. TNF- $\alpha$ .....	34
6.4. RANTES.....	35
<b>7. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne: EPA, DHA et leurs dérivés .....</b>	<b>36</b>
7.1. MAG-EPA et MAG-DHA .....	38
7.2. Les Résolvines: médiateurs spécialisés de résolutions.....	39
<b>8. Hypothèse/problématique.....</b>	<b>40</b>
8.1. Hypothèse de recherche .....	40
8.2. Objectifs spécifiques du projet de recherche .....	40
<b>Article 1.....</b>	<b>42</b>
<b>Article 2.....</b>	<b>86</b>
<b>Article 3.....</b>	<b>132</b>
<b>Discussion Générale.....</b>	<b>171</b>
<b>1. Le modèle <i>in vitro</i> d'artères pulmonaires humaines .....</b>	<b>172</b>
1.1. Effets de la RvD1 sur le traitement vasoconstricteur à l'ET-1 .....	172
1.1.1. La RvD1 inhibe l'augmentation du tonus des APH induite par l'ET-1 .....	172
1.1.2. La RvD1 prévient l'augmentation de la sensibilité au Ca <sup>2+</sup> induite par l'ET-1 .....	173
1.1.3. En présence d'ET-1, la RvD1 stimule l'expression de son récepteur, le GPR32 .....	174
1.2. Rôle de Rv D1 et E1 sur les conditions proinflammatoires au TNF $\alpha$ et à l'IL-6 .....	176
1.2.1. La RvD1 et la RvE1 contrent l'hyperréactivité induite par le TNF $\alpha$ et l'IL-6.....	176
1.2.2. Les Résolvines D1 et E1 normalisent la migration cellulaire .....	176
<b>2. Impact du MAG-DHA dans le modèle <i>in vivo</i> d'HTAP chez le rat-MCT .....</b>	<b>177</b>
2.1. Mode d'action de la monocrotaline .....	177
2.1.1. Effets connus de la monocrotaline.....	177
2.1.2. Effets de la monocrotaline, observés dans nos conditions expérimentales.....	178

2.2.	Mode d'action du MAG-DHA, précurseur de la RvD1 .....	178
2.2.1.	Intérêt de l'utilisation du MAG-DHA dans nos modèles expérimentaux .....	178
2.2.2.	Le MAG-DHA tend à rétablir la morphologie normale des artères pulmonaires.....	179
2.2.3.	Le MAG-DHA diminue l'expression des marqueurs de l'inflammation.....	180
<b>3.</b>	<b>Conclusions générales.....</b>	<b>181</b>
<b>4.</b>	<b>Limitations .....</b>	<b>182</b>
<b>5.</b>	<b>Perspectives.....</b>	<b>183</b>
5.1.	Perspectives à court terme .....	183
5.2.	Perspectives à long terme .....	184
	<b>Liste des références .....</b>	<b>185</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> L'anatomie du système respiratoire .....	4
<b>Figure 2.</b> Organisation des artères pulmonaires en trois tuniques .....	6
<b>Figure 3.</b> Remodelages de la paroi artérielle, conduisant à l'hypertension pulmonaire.....	8
<b>Figure 4.</b> Effet vasodilatateur de l'oxyde nitrique sur les artères pulmonaires .....	15
<b>Figure 5.</b> Effet vasoconstricteur de l'endothéline-1 dans les artères pulmonaires .....	18
<b>Figure 6.</b> Dysfonctions intracellulaires conduisant à l'HTAP.....	22
<b>Figure 7.</b> Voies de signalisations ciblées dans le traitement de l'HTAP.....	31
<b>Figure 8.</b> Structure chimique et métabolisme des Oméga-6 et des Oméga-3 .....	36

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Classification de l'Hypertension Pulmonaire .....	10
<b>Tableau 2.</b> Risque d'HTAP associé à une sélection de médicaments et toxines.....	11
<b>Tableau 3.</b> Concentrations ioniques intra- et extracellulaires des CML.....	23

## LISTE DES ÉQUATIONS

<b>Équation 1.</b> La loi de Fick .....	2
<b>Équation 2.</b> La loi de Poiseuille.....	5
<b>Équation 3.</b> La pression artérielle pulmonaire.....	6
<b>Équation 4.</b> Réaction bilan de la formation de l'oxyde nitrique .....	14
<b>Équation 5.</b> Formation de la prostacycline à partir de l'acide arachidonique.....	16
<b>Équation 6.</b> Cascade de formation de l'endothéline-1 .....	17
<b>Équation 7.</b> Formation du thromboxane A2 à partir de l'acide arachidonique.....	19
<b>Équation 8.</b> Équation de Nernst.....	24



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine (sérotonine)
5-LOX	Lipoxygénase 5
6R-BH4	Saproptérine dihydrochloride
15-LOX	Lipoxygénase 15
AA	Acide arachidonique
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein-1
APH	Artère pulmonaire humaine
AAS	Acide acétylsalicylique ou aspirine
BPCO	Bronchopathie pulmonaire chronique obstructive
BMPRII	<i>Bone morphogenic protein II</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CD126	Récepteur de l'interleukine 6
cFos	Proto-oncogene
ChemR23	<i>Chemerin Receptor 23</i>
CML	Cellule musculaire lisse
COX-2	Cyclo-oxygénase 2
CPI-17	<i>C-kinase-activated protein phosphatase-1 inhibitor 17 kDa</i>
DAG	Diacylglycérol
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DHA	Acide docosahexaénoïque
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxyde Synthase</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EPA	Acide éicosapentaénoïque
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>

ET-1	Endothéline 1
FLAP	<i>5-lipoxygenase-activating protein</i>
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPR32	<i>G Protein-Coupled Receptor 32</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIF1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
I $\kappa$ B $\alpha$	<i>Inhibitor of NF<math>\kappa</math>light polypeptide gene enhancer in B-cells alpha</i>
IKK $\alpha$	<i>I<math>\kappa</math>B kinase alpha subunit</i>
IL	Interleukine
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate
IP <sub>3</sub> -R	Récepteur de l'inositol triphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LOX	Lipoxygénase
MAG	Monoacylglycéride
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCT	Monocrotaline
MLC	<i>Myosin light chain</i>
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MYPT1	<i>Myosin phosphatase target subunit 1</i>
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NO	Oxyde nitrique
PAP	Pression artérielle pulmonaire
PDBu	Phorbol-12,13-dibutyrate
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandine H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandine I <sub>2</sub>

PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated gamma</i>
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma-1</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RS	Réticulum sarcoplasmique
RvD	Résolvine de série D
RvE	Résolvine de serie E
RyR	Récepteur de la Ryanodine
SERCA	Pompe Ca <sup>2+</sup> /ATPase du réticulum sarcoendoplasmique
SMAD	<i>Sma and Mad regulated protein</i>
SPM	Médiateurs de résolutions spécifiques
STAT3	<i>Signal Transducer and Activators of Transcription 3</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TMEM16A	<i>Transmembrane member 16</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factors alpha</i>
TNFR	Récepteur du TNF $\alpha$
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
U46619	Analogue du thromboxane A <sub>2</sub>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## INTRODUCTION

Les maladies pulmonaires et respiratoires occupent aujourd'hui une grande part des intérêts en recherche médicale. Les rhumes, les maladies pulmonaires obstructives (MPOC), l'asthme ou encore l'hypertension pulmonaire (HTAP) font partie des pathologies les plus répandues au travers le monde provoquant des milliers de décès chaque année quel que soit l'âge, le genre ou la classe sociale.

### **1. Histoire de l'Hypertension artérielle pulmonaire.**

En 1891, alors qu'il s'appliquait à analyser un poumon lors d'une autopsie, le médecin Allemand Ernst von Romberg a constaté qu'il y avait des lésions vasculaires. Ne pouvant expliquer ni les causes ni les facteurs pouvant provoquer cette anomalie, il a alors qualifié son observation de «sclérose vasculaire pulmonaire» (Romberg E, 1891). En 1901, le professeur Abel Ayerza de l'Université de Buenos Aires en Argentine, constatait que le syndrome de cyanose chronique, la dyspnée et la polyglobulie pourraient être associées à l'apparition de sclérose vasculaire pulmonaire (Mazzei JA et Mazzei ME, 2011).

Dans les années 1910, le Dr Oscar Brenner, un histopathologiste Britannique a rapporté des observations qui ont permis de décrire les déformations ou malformations des artérioles comme étant à l'origine de la maladie. Néanmoins, il n'avait pas l'expertise d'un physiologiste, ce qui ne lui permit pas d'approfondir les connaissances sur la genèse de cette pathologie. Pourtant dès cette époque, il constatait que les personnes souffrant de maladies pulmonaires chroniques avaient aussi de l'athérosclérose pulmonaire et des problèmes d'hypertrophie du ventricule droit (Brenner O, 1935).

À partir des années 1850 jusqu'en 1950, les physiologistes ont contribué à enrichir largement les connaissances scientifiques sur l'hémodynamie pulmonaire et cardiaque.

Les travaux sur les modèles animaux de chats ou de chiens ont permis d'élaborer une standardisation des paramètres qui régissent l'homéostasie de la circulation cardiaque et pulmonaire (Euler USV et Liljestrand G, 1946). Otto Franck (1865-1944) (Franck O, 1905) et Ernest Henry Starling (1866-1927) (Katz AM, 2002) ont ainsi été à l'origine de la

loi de Franck-Starling sur le cœur et les forces assurant les échanges d'eau qui posait les bases biophysiques qui ont permis plus tard à August Krogh et Johannes Lindhard de mieux décrire en 1912, les mesures du flux sanguin par leur utilisation de l'Oxyde nitrique (Krogh A et Lindhard J, 1912).

À la même époque ont été élaborées les «lois de Fick», énoncées par Adolphe Fick (Fick 1, 1870), qui établissait que le taux de diffusion (D) d'un gaz à travers une couche de tissu est proportionnel à la surface (S) ainsi qu'à la différence de concentration du gaz ( $\Delta C$ ) de part et d'autre du tissu et est inversement proportionnel à l'épaisseur (L) du tissu. La loi de Fick est donnée par l'équation qui lie D exprimé en  $mol.s^{-1}$ , k (le coefficient de diffusion du gaz) en  $m^2.s^{-1}$ , S en  $m^2$ ,  $\Delta C$  en  $mol.m^{-3}$  et L en  $m$ , tels que :

$$D = \kappa \cdot S \cdot \Delta C / L$$

**Équation 1. La loi de Fick.**

Par la suite, en 1929, la méthode de cathétérisation permettant de mesurer la pression artérielle pulmonaire en passant par le ventricule droit a été proposée par Werner Forssmann, ce qui a permis de consolider les connaissances physiologiques sur la circulation pulmonaire (Frossman W, 1929).

En 1940 Motley a démontré que lorsque le poumon est exposé pendant une longue durée à une atmosphère hypoxique (10%  $O_2$ , au lieu de 21% en condition atmosphériques normales), la pression artérielle pulmonaire et les résistances vasculaires pulmonaires sont augmentées (Motley HL, 1947). C'est ainsi que l'hypoxie a été associée à l'augmentation de la vasoconstriction.

En 1951, Schultz, Michtom et Dresdales ont utilisé la tolazoline pour induire la vasodilatation des artères pulmonaires, mais cette molécule provoquait aussi la dilatation au niveau systémique (Dresdale et al., 1954). En 1957, Peter Harris a alors proposé l'acétylcholine comme activateur de la vasodilatation localisée des artères pulmonaires (Harris P, 1957) car cette substance provoque la sécrétion d'oxyde nitrique au niveau de l'endothélium, qui diffuse vers les cellules musculaires lisses et produit la relaxation.

## **2. Physiologie pulmonaire.**

Le système respiratoire a pour rôle essentiel, durant l'inspiration, d'apporter de l'oxygène aux poumons puis de diffuser cet oxygène dans la circulation sanguine afin qu'il soit distribué à tous les organes de l'organisme en quantité suffisante. Puis durant l'expiration, le système respiratoire permet d'éliminer le dioxyde de carbone (Piiper et al., 1971).

### **2.1. Anatomie.**

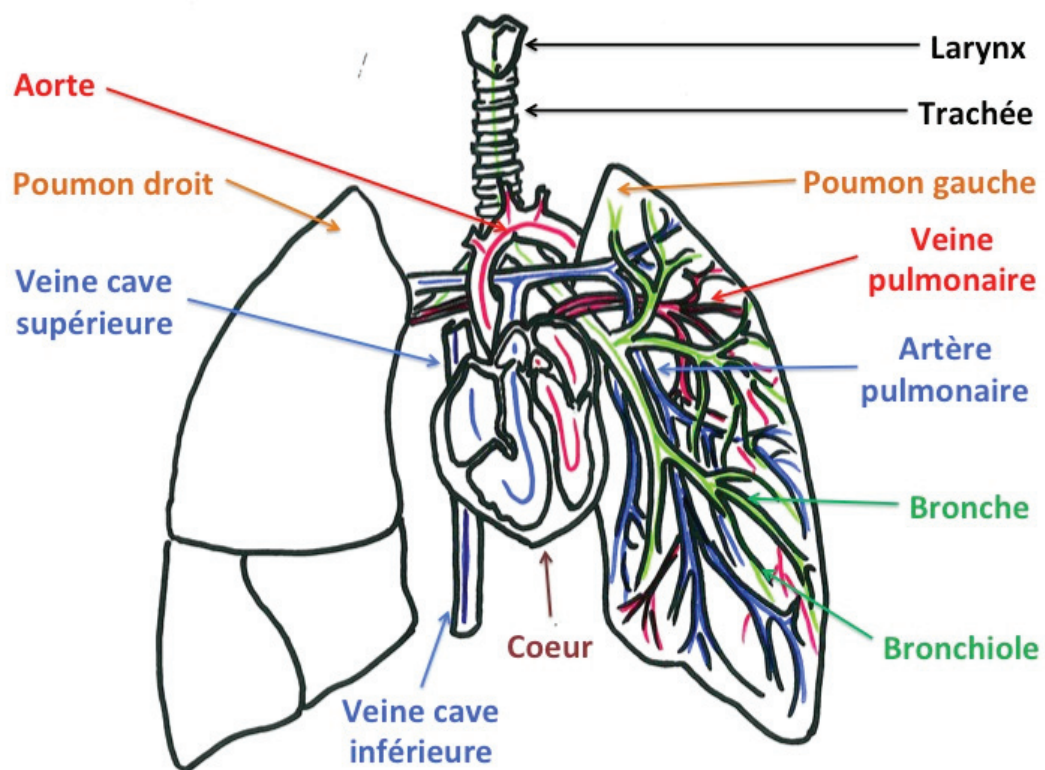
Aussi appelé système ventilatoire, le système respiratoire permet le passage de l'air au travers de la cavité nasale, la cavité buccale, le pharynx, le larynx, la trachée, les bronches, les bronchioles et les alvéoles où s'effectuent les échanges gazeux avec le sang.

Un ensemble de muscles squelettiques jouent un rôle important dans la respiration, à commencer par les intercostaux externes et le diaphragme. Ce dernier sépare la cavité thoracique de la cavité abdominale et qui participe surtout à l'inspiration. Interviennent aussi d'autres muscles dits inspireurs accessoires, tels que les muscles sterno-cléido-mastoïdiens, les scalènes et les muscles expirateurs que sont les intercostaux internes, l'oblique externe de l'abdomen, le transverse de l'abdomen et le muscle grand droit de l'abdomen qui sont sollicités surtout pendant l'effort.

Les poumons sont protégés par la cage thoracique faite de la clavicule au-dessus, le manubrium et le sternum en avant, les côtes et cartilages costaux autour et la colonne vertébrale en arrière. Les poumons sont divisés en lobes (Figure 1). Le poumon gauche est composé de deux lobes (supérieur et inférieur) et le poumon droit est composé de trois lobes (supérieur, moyen et inférieur) (Ganong W, 2005).

Les poumons sont le principal lieu d'échange gazeux avec le sang. Lorsque l'air passe par la trachée, il entre dans le poumon via les bronches primaires, secondaires, tertiaires puis les bronchioles et enfin les alvéoles où s'effectuent les échanges gazeux avec les capillaires sanguins (Reichel G, 1967). La circulation pulmonaire est en effet essentielle au bon fonctionnement de l'appareil respiratoire et de l'organisme tout entier.

Le sang revient au cœur par les veines caves. Il traverse l'oreillette droite puis le ventricule droit et il est éjecté vers les poumons par le tronc pulmonaire puis les deux artères pulmonaires. Le sang riche en  $\text{CO}_2$  et pauvre en  $\text{O}_2$  passe ensuite dans les artérioles pulmonaires afférentes puis dans les capillaires qui sont autour des alvéoles afin qu'il y soit déchargé en dioxyde de carbone et réoxygéné. Les veinules efférentes récupèrent ainsi un sang enrichi en  $\text{O}_2$  et appauvri en  $\text{CO}_2$  qui passe par les veines pulmonaires et arrive au cœur par l'oreillette gauche puis le ventricule gauche afin d'être distribué aux organes par l'aorte, ses ramifications. Le circuit vasculaire pulmonaire est aussi appelé «la petite circulation», alors que la «grande circulation» ou circulation systémique concerne la distribution du sang oxygéné aux organes puis le retour du sang désoxygéné au cœur (Ganong W, 2005).



**Figure 1. L'anatomie du système respiratoire.**

*Coupe frontale représentant schématiquement l'organisation broncho-vasculaire du bloc cœur-poumon chez l'Homme. Le circuit du sang riche en  $\text{CO}_2$  est représenté en bleu, le sang riche en  $\text{O}_2$  est représenté en rouge et les conduits du passage de l'air sont représentés en vert. Dessin à main-levée réalisé par Roddy Hiram.*

## ***2.2. Morphologie et Hémodynamique des artères pulmonaires.***

Les artères pulmonaires, comme décrites précédemment apportent le sang qui sort du ventricule droit et irriguent les poumons. Elles ont une structure en trois tuniques faite d'une intima, une média et une adventice.

De l'intérieur vers l'extérieur, à partir de la lumière des artères, on observe l'intima qui est composé de l'endothélium (couche unicellulaire faite de cellules endothéliales), de tissu conjonctif et d'une couche limitante élastique interne.

La média est faite de cellules musculaires lisses ou CML (dont l'épaisseur et le nombre varient en fonction de type d'artère) et d'une couche limitante élastique externe.

L'adventice est essentiellement composée de tissu conjonctif et de fibroblastes. Les artères pulmonaires ont un diamètre de plus en plus réduit au fur et à mesure qu'elles se rapprochent de la région alvéolaire (Naeije R, 2001) (Figure 2).

Ainsi, le tronc pulmonaire a un diamètre de 2,5 à 3 cm, les artères pulmonaires en région proximale des lobes supérieures ont un diamètre de 0,6 à 0,8 cm, les artérioles ont un diamètre de 0,3 à 0,6 cm et les capillaires ont un diamètre de 8 à 10  $\mu\text{m}$ .

Les artères pulmonaires reçoivent directement la fraction d'éjection sanguine venue du ventricule droit. Ainsi, selon la loi de Poiseuille (Roos A, 1962), la pression artérielle pulmonaire moyenne (mPAP) est influencée par le débit sanguin pulmonaire (Q), le diamètre des vaisseaux (r), leur longueur (L) et la viscosité du sang ( $\eta$ ). Or, soit R, l'ensemble des résistances vasculaires pulmonaires qui s'opposent au flux sanguin :

$$R = 8.\eta.L / \pi.r^4$$

**Équation 2. La loi de Poiseuille.**

Où R est la résistance vasculaire pulmonaire (en  $\text{Pa.s.m}^{-3}$ ),  $\eta$  est le coefficient de viscosité du sang (en  $\text{Pa.s}$ ), L est la longueur du vaisseau (en m), r est le diamètre du vaisseau (en  $\text{m}^4$ ). Il est important de noter que le sang n'est pas un fluide newtonien, ainsi sa viscosité est variable. De plus, l'écoulement n'est pas linéaire mais pulsatile et les vaisseaux sanguins sont distensibles et collabales. De plus, l'ensemble des pressions pulmonaires

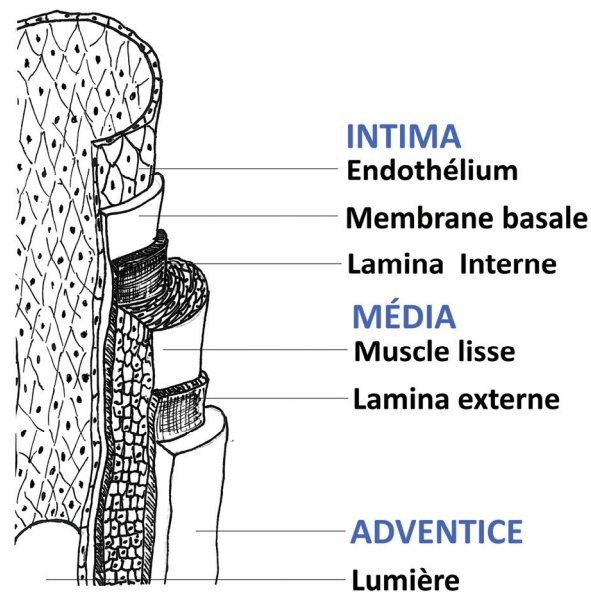


gauches et la pression à l'oreillette gauche, qui sont les pressions en aval de la PAP, participent à la définition de la pression artérielle pulmonaire moyenne (mPAP). Ainsi, la relation qui lie la mPAP (en  $Pa$ ), le débit sanguin pulmonaire (Q) (en  $m^3.s^{-1}$ ) dans l'artère pulmonaire, les pressions en aval ( $P_{en\ aval}$ ) et la résistance vasculaire (R) (en  $Pa.s.m^{-3}$ ) (en (Ganong W, 2005) est donnée par :

$$mPAP = Q \times R + P_{en\ aval}$$

**Équation 3. La pression artérielle pulmonaire moyenne.**

On comprend donc que la pression artérielle pulmonaire moyenne est inversement proportionnelle au diamètre des artères pulmonaires. Ainsi, il a été établi que la mPAP normale au repos chez un individu adulte normal est entre 10 à 15 mmHg (Ganong W, 2005). Avec l'âge, la pression artérielle pulmonaire est augmentée légèrement sans être pathologique. Cependant, le mode de vie, le niveau d'activité physique, l'alimentation et certaines prédispositions génétiques peuvent influencer la pression artérielle pulmonaire en l'augmentant de manière dangereuse pour la santé notamment en influençant le diamètre interne de la lumière des vaisseaux (Ganong W, 2005).



**Figure 2. Organisation des artères pulmonaires en trois tuniques.**

*Dessin à main-levée réalisé par Roddy Hiram.*

### **3. Hypertension artérielle pulmonaire.**

#### ***3.1. Physiopathologie.***

Lorsque la pression artérielle pulmonaire moyenne est augmentée de manière pathologique et chronique, on parle d'hypertension artérielle pulmonaire ou HTAP. Il s'agit d'une élévation anormale des résistances vasculaires qui s'opposent à l'écoulement du sang, accompagnées par un rétrécissement du diamètre de la lumière des vaisseaux sanguins intrapulmonaires (Hoepfer MM, 2009).

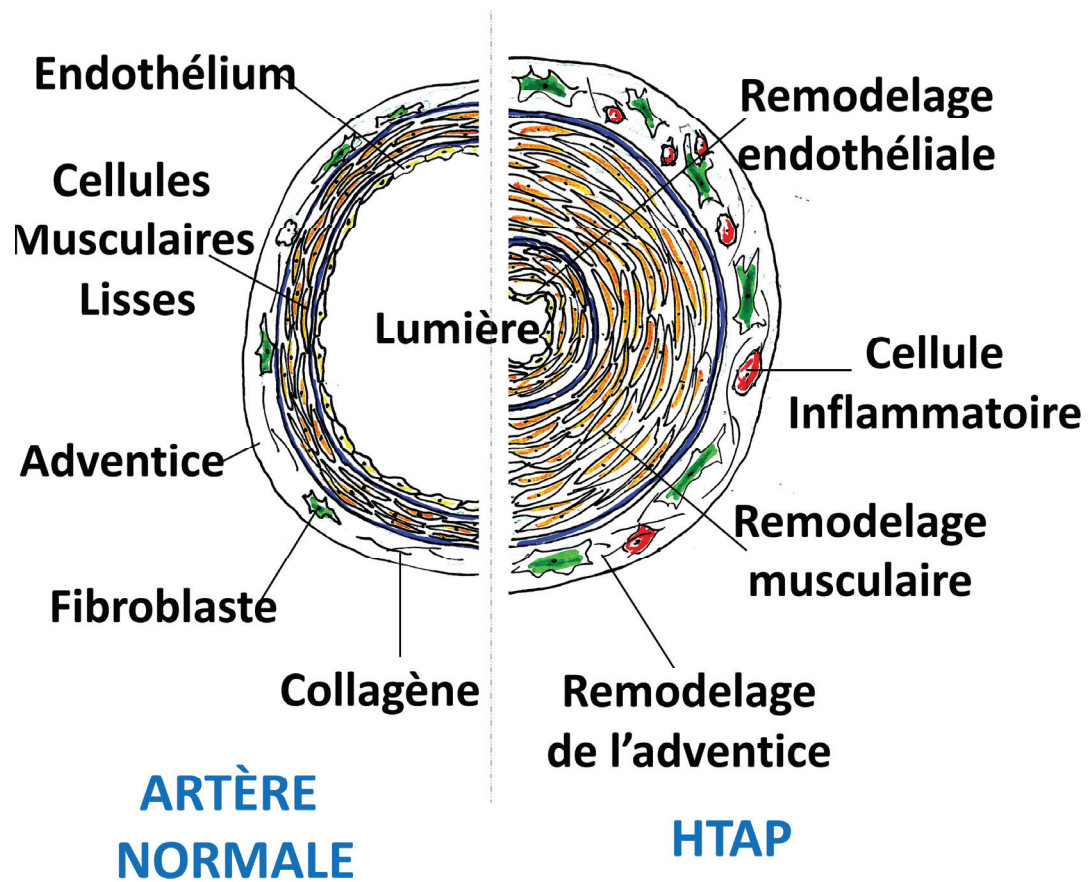
Participant à ce phénomène d'obstruction, il arrive que la prolifération anormale de cellules endothéliales de l'intima contribue à épaissir cette tunique interne des artères pulmonaires (Humbert M et al., 2008). Les dysfonctionnements au niveau cellulaire s'accompagnent de l'apparition de lésions plexiformes et de fibroses intimes qui aggravent l'épaississement de l'intima et diminuent l'ouverture des artères rendant difficile le passage du sang.

Le troisième facteur qui contribue au rétrécissement du diamètre d'ouverture des artères pulmonaires (AP) est la prolifération anormale des cellules musculaires lisses (CML) qui constituent la média des AP (Xiao F et al., 1993). Ces CML sont capables de se contracter de manière excessive induisant une vasoconstriction chronique qui participe à l'augmentation des résistances vasculaires qui influence l'augmentation anormale de la mPAP.

Plus extérieurement, au niveau de l'adventice, se produit une prolifération cellulaire excessive de fibroblastes ainsi qu'un recrutement anormalement élevé de cellules inflammatoires comme les cellules dendritiques (Perros F et al., 2007), les monocytes (Wang W et al., 2009), les lymphocytes B et T (El Chami H et Hassoun PM, 2012) en parallèle avec la production d'immunoglobulines G (Arends SJ et al., 2013).

Mis ensembles, ces phénomènes contribuent à l'augmentation de la prolifération et à l'hypertrophie cellulaire, ce qui induit le remodelage anormal de la paroi artérielle.

L'épaississement de la paroi et l'obstruction de la lumière des artères contribuent à l'augmentation chronique de la PAP moyenne au repos qui devient supérieure ou égale à 25 mmHg. On parle alors d'HTAP avec des conséquences irréversibles et néfastes sur la santé et le mode de vie des patients à long terme (Figure 3).



**Figure 3. Remodelages de la paroi artérielle, conduisant à l'HTAP.**

*Représentation de la coupe transversale d'une artère pulmoanire humaine normale comparée à une artère dans la condition d'hypertension pulmonaire. Suite aux remodelages se produisant dans les différentes tuniques, la paroi artérielle est épaissie et la lumière est considérablement réduite, ce qui limite le passage du sang. Dessin à main levée réalisé par Roddy Hiram.*

La terminologie et la nomenclature permettent de différencier l'hypertension artérielle pulmonaire (HTP) et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). L'HTAP est un sous-groupe de l'HTP. En effet, l'HTP se définit comme une élévation de la pression des artères pulmonaires conséquemment à une maladie pulmonaire, des problèmes cardiaques, l'apnée du sommeil ou la thrombo-embolie chronique. Les vaisseaux sanguins eux-mêmes ne sont donc pas le problème dans l'HTP. Par contre, l'HTAP se définit comme une anomalie des vaisseaux, qui provoque l'élévation de la pression artérielle pulmonaire (Tableau 1).

### *3.2. Symptômes.*

Chez les patients, la maladie se manifeste par divers symptômes comme de l'essoufflement, car la ventilation est perturbée par l'obstruction des vaisseaux, des douleurs au thorax peuvent être ressenties du fait des difficultés à l'écoulement du sang, et les échanges gazeux se font moins facilement ce qui provoque des carences en oxygène appelées hypoxies, qui peuvent causer des étourdissements et des pertes de connaissances fréquentes. Généralement, de la fatigue chronique se fait ressentir chez les patients rendant difficiles les activités quotidiennes normales (Scarlett M et al., 2009, Brown LM et al., 2011; Khan EU, 2011).

De plus, comme la lumière des artères pulmonaires est plus étroite que la normale, le cœur est amené à pomper d'avantage pour essayer de maintenir un débit sanguin constant. La contraction du ventricule droit est alors augmentée et excessivement sollicitée avec le temps, ce qui induit de l'hypertrophie cardiaque droite du fait de la croissance musculaire pathologique provoquée par cette hyperactivité chronique.

Ainsi, l'hypertrophie cardiaque droite est un phénomène de compensation en réponse à l'augmentation prolongée de la post-charge, permettant d'assurer la propulsion du sang vers les artères pulmonaires. Cet épaississement de la paroi du ventricule droit est temporaire, ce qui peut conduire à l'insuffisance cardiaque droite. (Franco V, 2012).

Les premiers symptômes de la maladie sont non-spécifiques, ainsi ils sont souvent confondus avec ceux d'autres perturbations respiratoires, (Alami S et al., 2016) de telle sorte que souvent le diagnostic de la maladie n'est réalisé que lorsque l'HTAP a déjà atteint un stade avancé et sévère (Brown LM et al., 2011). Or, malheureusement, le stade avancé est actuellement irréversible et incurable. La seule prise en charge qui éradiquerait le problème consisterait à proposer une intervention chirurgicale consistant à effectuer une pneumonectomie suivie d'une greffe de poumon sain.

### 3.3. Classification.

Afin de mieux comprendre cette pathologie et mieux prendre en charge les patients en fonction des causes, une classification de l'HTP a été proposée au *5th World Symposium on PH, à Nice (France) en Octobre 2013* (Seferian A et Simmonneau G, 2014).

**Tableau 1. Classification de l'Hypertension Pulmonaire**

<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <u>Groupe 1 - Hypertension Artérielle Pulmonaire proprement dite :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ HTAP idiopathique</li> <li>➤ HTAP héréditaire</li> <li>➤ HTAP due aux toxiques et médicaments</li> <li>➤ HTAP persistante du nouveau-né</li> <li>➤ HTAP associée à une connectivite</li> <li>➤ HTAP associée à une infection par le VIH</li> <li>➤ HTAP associée à l'hypertension portale</li> <li>➤ HTAP associée à une cardiopathie congénitale</li> <li>➤ HTAP associée à une maladie veineuse ou des vaisseaux capillaires</li> <li>➤ HTAP associée à la Schistosomiase</li> </ul> </li> <li>❖ <u>Groupe 2 – Hypertension Pulmonaire associée à une cardiopathie gauche.</u></li> <li>❖ <u>Groupe 3 – Hypertension Pulmonaire associée à une maladie pulmonaire :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ HTAP associée à la BPCO,</li> <li>➤ HTAP associée à l'Hypoxie ou au Syndrome d'Apnée du sommeil</li> <li>➤ HTAP associée à l'exposition à l'altitude</li> <li>➤ HTAP associée aux mauvaises aérations du sang.</li> </ul> </li> <li>❖ <u>Groupe 4 – Hypertension Pulmonaire post-thrombo-embolique chronique.</u></li> <li>❖ <u>Groupe 5 – Hypertension Pulmonaire multifactorielle.</u></li> </ul>
---

*Adapté par Roddy Hiram, d'après la classification du 5th World Symposium on PH, à Nice (France) en Octobre 2013 (Seferian A et Simmonneau G, 2014).*

Cette classification distingue les types d'HTAP en cinq groupes différents (Tableau 1).

Le Groupe 1 correspond à l'HTAP proprement dite qui englobe divers types de causes auxquelles sont associées l'HTAP.

L'HTAP est qualifiée d'idiopathique, ou HTAP sporadique, lorsque les causes de la maladie ne sont pas connues, que des facteurs de risque n'ont pas été identifiés et que l'individu ne fait état d'aucun antécédent d'ordre familiale. Cette catégorie représente 40% des cas d'HTAP (Firth AL et al., 2010).

L'HTAP est dite héréditaire lorsque la maladie est associée à une anomalie ou une mutation transmissible génétiquement. Ces mutations concernent des gènes tels que  $ALK_1$  (Harrison RE et al., 2003) et  $BMPR_2$  (Cogan JD et al., 2006). Ce dernier a fait l'objet de nombreuses études durant les dix dernières années. En effet, ce gène code pour un récepteur qui permet de lier la protéine BMP, ainsi que le TGF $\beta$ . En conditions normales, les voies de signalisations intracellulaires activées par ce récepteur permettent d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses, de réguler l'apoptose des cellules endothéliales et de prévenir les réponses inflammatoires qui pourraient influencer les dysfonctionnements cellulaires. Plus de 70% des personnes souffrant d'HTAP héréditaire présentent une mutation du gène  $BMPR_2$  (Sztrymf B et al., 2008).

Certains médicaments et certaines substances toxiques comme certaines drogues-dures peuvent favoriser l'HTAP (Tableau 2). En 2012, Price L et al., ont rapporté une liste qui classe ces médicaments et toxines en fonction de leur risque de provoquer l'HTAP chez les consommateurs, entre « Risque Avéré », « Risque Probable » et « Risque Possible ». Parmi cette liste, on retrouve l'Aminorex, les Amphétamines et la Cocaïne (Tableau 2) (Price L et al., 2012; Montani D et al., 2013; Galiè N et al., 2013).

**Tableau 2. Risque d'Hypertension Artérielle Pulmonaire Associé à une sélection de médicament et toxines.**

❖ <u>Risque Avéré de provoquer une Hypertension artérielle pulmonaire</u>
➤ Huile de Colza (Bassica napus)
➤ Aminorex
➤ Benfluorex
➤ Inhibiteurs sélectifs du ré-uptake de la Sérotonine (SSRI)
➤ Fenfluramine
➤ Dexfluramine
❖ <u>Risque Probable de provoquer une Hypertension artérielle pulmonaire.</u>
➤ Amphétamine (Mazindol)
➤ Méthamphétamine (ecstasy)
➤ L-tryptophane
➤ Phentermine
➤ Interférons $\alpha$ et $\beta$
❖ <u>Risque Possible de provoquer une Hypertension artérielle pulmonaire.</u>
➤ Herbe de St-Jean ou Herbe aux fées (Hypericum perforatum L.)
➤ Cocaïne
➤ Phénylpropanolamine
➤ Chimiothérapie
➤ Inhibiteurs sélectifs de la recapture sérotoninergique
➤ Dasatinib

*Adapté d'après Price L et al., 2012; Montani D et al., 2013; Galiè N et al., 2013.*

La pression artérielle pulmonaire au moment de la naissance est normale du fait de la transmission entre une oxygénation ombilical, à un brusque passage à une respiration pulmonaire. Chez 2% des naissances, il y a échec de l'adaptation du système respiratoire et cardiaque à la vie extra-utérine, ce qui provoque l'HTAP persistante du nouveau-né, où les résistances pulmonaires sont élevées du fait de la malformation des artères pulmonaire et d'une hypertrophie musculaire des artérioles, accompagnées d'une hypoxémie chronique (Murphy JD et al., 1981).

L'HTAP a souvent été diagnostiquée chez les patients atteints de HIV. Bien que des hypothèses soient proposées pour expliquer cette complication, les causes exactes ne sont actuellement pas connues (Mehta NJ et al., 2000).

Certains patients, présentant une cardiopathie congénitale, ont des shunts pulmonaires et systémiques qui appauvrissent l'apport sanguin dans le poumon et augmente le travail cardiaque. Ces individus peuvent alors présenter de l'HTAP et représentent près de 20% des cas diagnostiqués d'HTAP (Adatia I et al., 2010).

L'HTAP peut de plus être associée à des maladies du tissu conjonctif appelées connectivites ou collagénoses, comme la sclérodermie. Ces pathologies chroniques sont marquées par un important statut inflammatoire et concernent environ 10% des personnes atteintes d'HTAP. Cette catégorie de patients représente le plus grand taux de mortalité parmi tous les types d'HTAP (Simonneau G et al 2013; Condliffe R et al., 2015).

Les patients qui présentent des dysfonctions au niveau des veines et capillaires, notamment l'hypertension portale, représentent, 5% des cas d'HTAP. Par ailleurs, les patients présentant des problèmes d'ordre hépatique sont auscultés de manière à rechercher et évaluer le risque ou la présence d'HTAP (Saleemi S, 2010).

La cardiopathie gauche représente le groupe 2 de la classification de l'hypertension pulmonaire. En effet, la cardiopathie gauche est une augmentation de pression au niveau de l'oreillette gauche, le ventricule gauche ou des anomalies des valves gauches qui induisent une augmentation de pression au niveau des artères pulmonaires (Haddad F et al., 2011).

Les maladies pulmonaires telles que la BPCO, le Syndrome d'Apnée du sommeil et toute autre maladie pouvant provoquer une hypoxie chronique sont associés à l'apparition d'hypertension pulmonaire dite de groupe 3. Ces pathologies sont en effet caractérisées par

une mauvaise aération du sang, ce qui conduit à une augmentation de la vasoconstriction artérielle pulmonaire (Naeije R et Barbera JA, 2001).

Les pathologies thromboemboliques qui par définition obstruent la lumière des vaisseaux sanguins sont à l'origine hypertension pulmonaire (classée de groupe 4) qui peut être réversible si la prise en charge survient rapidement (Pengo V et Prandoni P, 2005).

Lorsque plusieurs phénomènes d'ordre hormonaux, fonctionnels, circulatoires, morphologiques et génétiques sont identifiés comme étant ensemble un risque à la vasoconstriction anormale des artères pulmonaires, on parle d'hypertension pulmonaire multifactorielle de groupe 5 (Vallabhajosula S et al., 2011).

### ***3.4 Electrophysiologie et dysfonctions endothéliales.***

Conformément à la morphologie des artères pulmonaires, les cellules endothéliales de l'intima sont directement en contact avec le sang. Ces cellules sont sensibles aux modifications et aux signaux de leur environnement. En effet, à la membrane plasmique des cellules endothéliales, sont exprimés des canaux ioniques et des récepteurs, qui répondent de manière plus ou moins spécifique aux différentes stimulations assurées par des éléments véhiculés dans le sang, comme le pH, les hormones, les cytokines, les électrolytes et les stimulus d'ordre chimiotactiques et pharmacologiques (Cines DB et al., 1998).

Communiquant avec les autres types cellulaires qui forment la paroi artérielle, les cellules endothéliales influencent et sont aussi influencées par le fonctionnement des cellules musculaires lisses de la média et par les différents types cellulaires qui forment l'adventice (Powell RJ et al., 1996; Delcroix M et al., 2003).

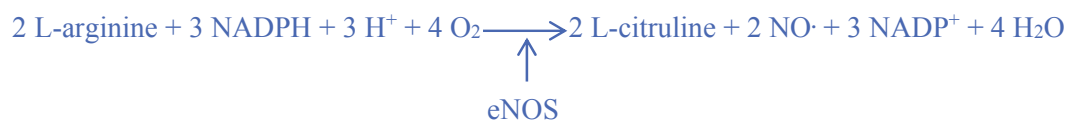
Les cellules endothéliales régulent les fonctions vasculaires. En effet, elles constituent le centre de production de molécules vasoconstrictrices et vasodilatatrices et d'agents activateurs et inhibiteurs de la croissance et de la prolifération cellulaire. Les cellules endothéliales sécrètent de plus des médiateurs anti-thrombotiques et anticoagulants, et elles sont sensibles aux signaux pro- et anti-inflammatoires. Dans l'HTAP, l'endothélium subit des modifications importantes qui participent directement à l'aggravation et la sévérité de la maladie (Budhiraja R et al., 2004).



La dysfonction endothéliale est ainsi marquée par des dérèglements chroniques liés à la sécrétion anormale de nombreuses molécules telles que l'oxyde nitrique (NO), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), l'endothéline-1 (ET-1), le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) et le VEGF (Vascular endothelial growth factor). Au niveau génomique, un mauvais fonctionnement de l'expression et de la signalisation associés au récepteur BMPRII du fait d'une mutation héréditaire est décrit comme ayant un rôle dans la pathogenèse de certains types d'HTAP (Budhiraja R et al., 2004).

#### 3.4.1. Oxyde nitrique.

Le monoxyde d'azote aussi appelé oxyde nitrique (NO<sup>•</sup>) est un radical libre très réactif issu de la réaction entre la L-arginine, l'oxygène et le nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Cette réaction est catalysée par l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). La production de NO est donc dépendante du niveau d'expression de eNOS qui peut être augmenté ou diminué, voir inhibé dans des conditions pathologiques (Cooper CJ et al 1996).



#### Équation 4. Réaction bilan de la formation de l'oxyde nitrique.

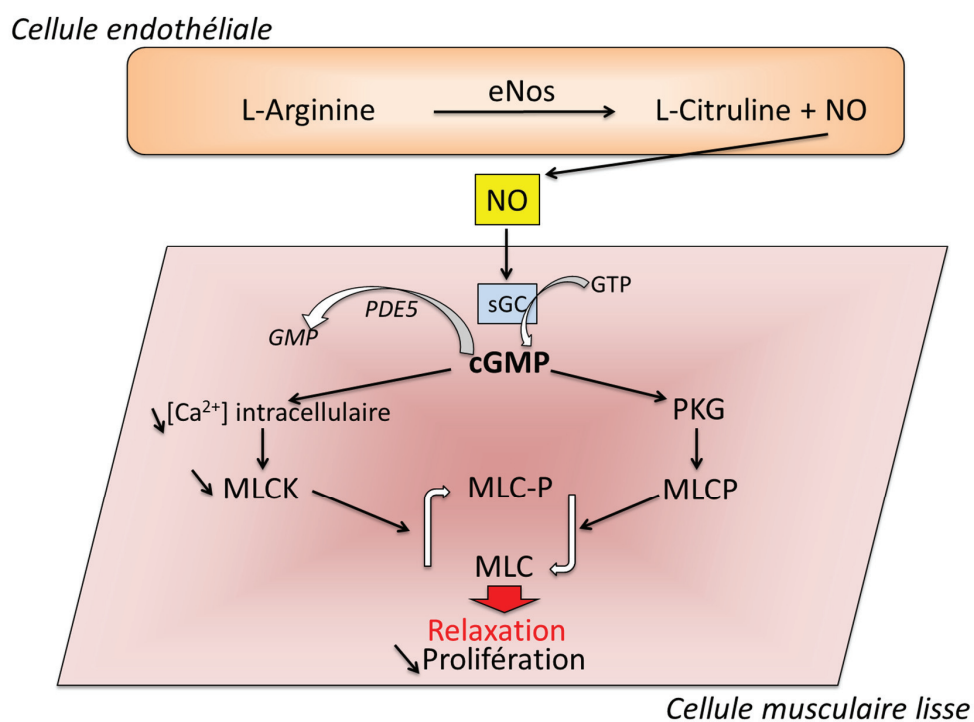
L'oxyde nitrique ainsi produit dans les cellules endothéliales, diffuse dans les cellules musculaires lisses de la média et active la guanylate cyclase soluble qui à partir du GTP, donne du GMP cyclique (GMPc). Le GMPc active la protéine kinase dépendante du cGMP, la Protéine kinase G (PKG). Cette protéine kinase phosphoryle plusieurs protéines et systèmes enzymatiques (*détaillées au paragraphe 4.5.1.*) qui contribuent à diminuer la concentration intracellulaire en calcium (Figure 4).

L'ensemble des mécanismes impliqués converge pour diminuer l'activité de la Myosin Light Chain kinase (MLCK), ce qui diminue le niveau de phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC) et permet la vasodilatation des artères pulmonaires et l'augmentation transitoire du flux sanguin dans le poumon (Hofmann F, 2004).

La 3',5'-nucléotide cyclique phosphodiesterase aussi appelée phosphodiesterase GMPc spécifique de type 5 (PDE5), présente dans les cellules musculaires lisses, s'oppose à l'action relaxante du NO, car quand la GMPc est formée, elle limite son action en transformant une partie en GMP (Rybalkin SD et al., 2003).

De plus il a été démontré que le NO était impliqué dans les mécanismes de régulation qui inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses et l'agrégation plaquettaire. Le monoxyde d'azote s'oppose aussi à la vasoconstriction induite par l'hypoxie (Ho JJ et al., 2012).

Dans les conditions pathologiques, une inhibition chronique de production de NO au niveau endothélial ou une altération de l'activation des protéines kinases dépendantes du GMPc au niveau des CML contribue au développement de l'HTAP (Hampl V et Herper J, 2000).

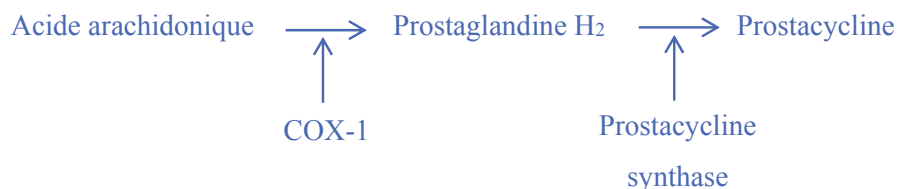


**Figure 4. Effet vasodilatateur de l'oxyde nitrique sur les artères pulmonaires.**

*Représentation des voies de signalisations activées par le NO dans les CML, conduisant à leur relaxation et à la diminution de leur prolifération. Schéma réalisé par Roddy Hiram.*

### 3.4.2. Prostacycline.

Dans les cellules endothéliales, l'acide arachidonique (AA) est métabolisé par la cyclooxygénase-1 en prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) qui est elle-même transformée en prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) aussi appelée prostacycline, via l'action enzymatique de la prostacycline synthase (Geraci MW et al., 1999).



#### Équation 5. Formation de la prostacycline à partir de l'acide arachidonique.

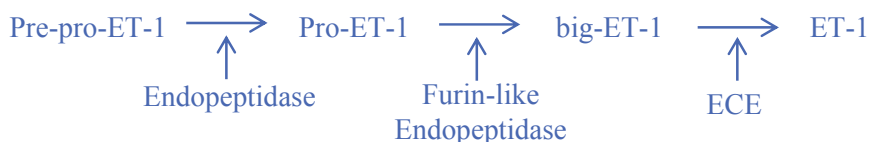
La prostacycline peut diffuser de la cellule endothéliale vers la CML où elle se lie à son récepteur spécifique, le récepteur IP<sub>1</sub> situé à la membrane des CML. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il active l'Adénylate cyclase (AC) qui en présence d'ATP, produit de l'AMPc qui active la protéine kinase A (PKA). La PKA active les voies de signalisation qui favorisent la diminution de l'activation de la MLCK et de la phosphorylation de la MLC, ce qui permet la vasodilatation des artères pulmonaires (Hathaway DR et al., 1985).

Les isoformes des phosphodiésterases 3 et 4 (PDE3 et PDE4) s'opposent à la relaxation induite par la PGI<sub>2</sub> car elles convertissent l'AMPc en AMP. De plus, les anomalies d'expression de la PGI<sub>2</sub> synthase et/ou de l'IP<sub>1</sub> contribuent à la diminution de l'activité vasodilatatrice de la PGI<sub>2</sub> et contribuent de manière chronique à la mise en place de l'HTAP (Murray F et al., 2002).

Ainsi, la diminution de la production de PGI<sub>2</sub> peut être associée à l'augmentation pathologique de la vasoconstriction, la prolifération des CML et l'agrégation plaquettaire dans l'HTAP (Smith JB, 1981).

### 3.4.3. Endothéline-1.

L'endothéline-1 (ET-1) est produite dans les cellules endothéliales. Il s'agit d'un peptide de 21 acides aminés qui est le produit du clivage de la pre-pro-ET-1 en pro-ET-1 puis en big-ET-1 suivi de la conversion enzymatique de cette dernière en ET-1 par l'ECE-1 (Enzyme de conversion de l'ET-1) (Frasch HF et al., 1999).



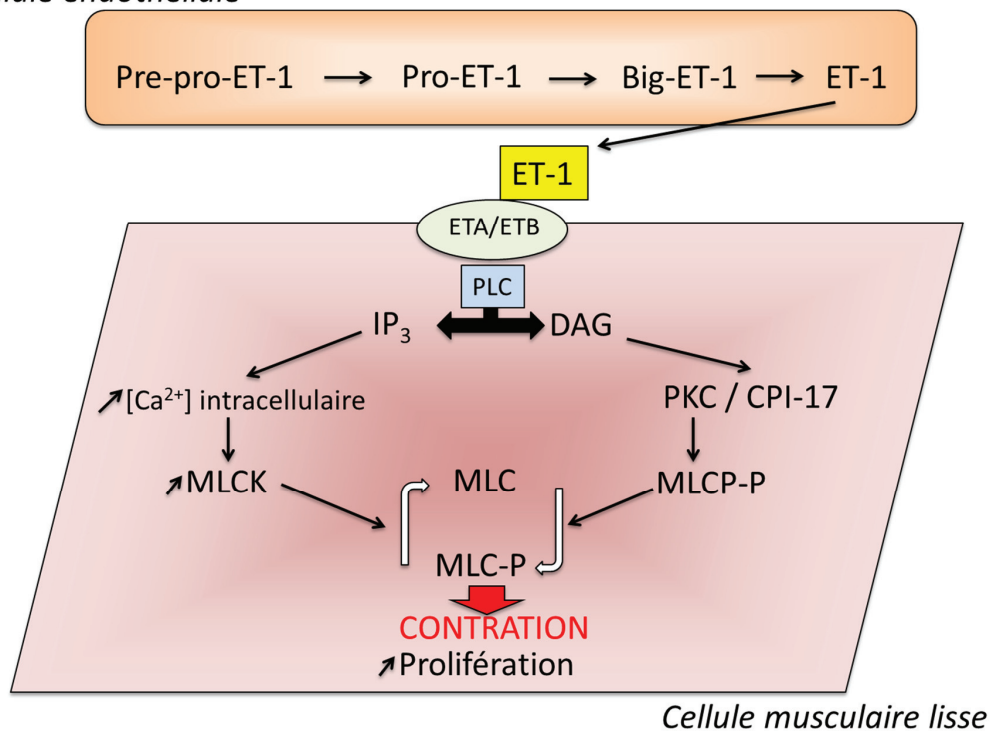
**Équation 6. Cascade de formation de l'endothéline-1.**

Il existe deux types de récepteurs à l'ET-1 : l'ET<sub>A</sub> qui est à la surface des CML et l'ET<sub>B</sub> qui est à la surface des CML et des cellules endothéliales. L'ET-1 a ainsi un rôle paracrine et autocrine. Lorsqu'elle se lie aux récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> des CML, elle active la phospholipase C (PLC) qui permet le maintien du niveau de phosphorylation de la MLC et augmente la vasoconstriction (*mécanisme détaillé au paragraphe 4.5.1.*) (Figure 5).

Par contre, en stimulant les récepteurs ET<sub>B</sub> des cellules endothéliales, l'ET-1 provoque l'augmentation de la sécrétion de NO et de PGI<sub>2</sub>, ce qui contribue à induire la relaxation des CML. Dans les conditions physiologiques, il y a une régulation fine entre vasoconstriction et relaxation pour permettre le passage normal du flux sanguin à travers les artères (Agapitov AV et Haynes WG, 2002).

Dans les conditions pathologiques, il peut survenir une dérégulation chronique de la sécrétion et de l'activité liée à l'ET-1 versus les effets du NO et de la PGI<sub>2</sub>. La vasoconstriction est alors dominante sur la vasodilatation des artères pulmonaires, ce qui contribue au développement et à la sévérité de l'HTAP. Il a été démontré que les patients atteints d'HTAP présentent des concentrations anormalement élevées en ET-1 dans le sang. De plus, l'ET-1 est impliquée dans l'augmentation de l'agrégation plaquettaire, la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la réponse inflammatoire (Stewart DJ et al., 1991).

*Cellule endothéliale*



**Figure 5. Effet vasoconstricteur de l'endothéline-1 dans les artères pulmonaires.**

*Représentation des voies de signalisation activées par l'endothéline-1 dans les cellules musculaires lisses, conduisant à leur contraction et à l'augmentation de leur prolifération.*

*Schéma réalisé par Roddy Hiram.*

#### 3.4.4. *Thromboxane A<sub>2</sub>*.

Le thromboxane A<sub>2</sub> ou TXA<sub>2</sub> est produit par les cellules endothéliales. Il s'agit d'un métabolite de l'acide arachidonique. En effet, à partir de la PGH<sub>2</sub>, la thromboxane synthase produit le TXA<sub>2</sub>, qui est sécrété par l'endothélium et qui se lie spécifiquement aux récepteurs TP présents à la surface des cellules endothéliales et surtout des CML (Katugampola SD et Davenport AP, 2001).



#### **Équation 7. Formation du thromboxane A<sub>2</sub> à partir de l'acide arachidonique.**

Les récepteurs TP appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Au niveau des CML, ils provoquent la libération de calcium stocké dans le réticulum endoplasmique via les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> et l'ouverture des canaux calciques ce qui permet l'entrée du calcium dans la cellule. La concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> libre est ainsi augmentée. D'autre part, l'activation des récepteurs TP active la voie PKC/CPI-17 et la voie RhoA-GTP/ROCK (qui sont détaillées au paragraphe 4.5.1.) (Figure 6).

L'ensemble de ces phénomènes contribue au maintien du niveau de phosphorylation de la MLC ce qui permet de maintenir le tonus et la vasoconstriction (Aburima A et al., 2013).

Dans l'HTAP, les patients présentent des productions anormalement élevées en TXA<sub>2</sub>. Il a été démontré que le TXA<sub>2</sub> est associé à l'aggravation de la vasoconstriction et de l'agrégation plaquettaire (Cave AC et al., 1993).

#### *3.4.5. Remodelage de l'endothélium.*

L'ensemble de ces anomalies de sécrétions au niveau de l'endothélium influencent l'expression génomique des nombreuses protéines telles que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et l'HIF-1- $\alpha/\beta$  (Hypoxia Inducible Factor 1 alpha and bêta) qui régulent des voies de signalisations qui provoquent la prolifération anormale des cellules endothéliales et l'hypertrophie de l'intima (Li QF et Dai AG, 2004).

La structure normalement en monocouche de l'endothélium se trouve alors désorganisée. Les molécules sécrétées par l'endothélium influencent aussi la morphologie plaquettaire de manière localisée en créant des agrégats qui limitent le passage du sang. On parle de thrombose et/ou d'embolie artérielle, car les vaisseaux sanguins sont obstrués. Des lésions plexiformes peuvent se former s'accompagnant de sclérose et de nécrose de l'intima (Ogata T et Iijima T, 1993).

Ces phénomènes accentuent le caractère irréversible de l'HTAP. S'ajoutant au phénomène d'obstruction des vaisseaux, les molécules vasoconstrictrices précédemment décrites et produites en excès par l'endothélium, augmentent le tonus des artères pulmonaires en stimulant la machinerie contractile des CML.

Ces molécules (ET-1, TXA<sub>2</sub>) ont une influence sur l'expression des gènes et des voies de signalisations directement impliquées dans la prolifération et la migration cellulaire tels que le VEGF et le MMP2 et le MMP9 (Li QF et Dai AG, 2004; Wang L et al., 2006).

### ***3.5. Électrophysiologie et anomalies des cellules musculaires lisses.***

#### *3.5.1. Régulation de la machinerie contractile.*

La média des artères pulmonaires est constituée de cellules musculaires lisses (CML) qui sont capables de se contracter et se relaxer en fonction des stimulus de leur environnement. Dans les conditions normales, l'activité contractile des CML permet le maintien d'un tonus à la résistance vasculaire qui contribue à l'écoulement normal du sang dans les artères pulmonaires.

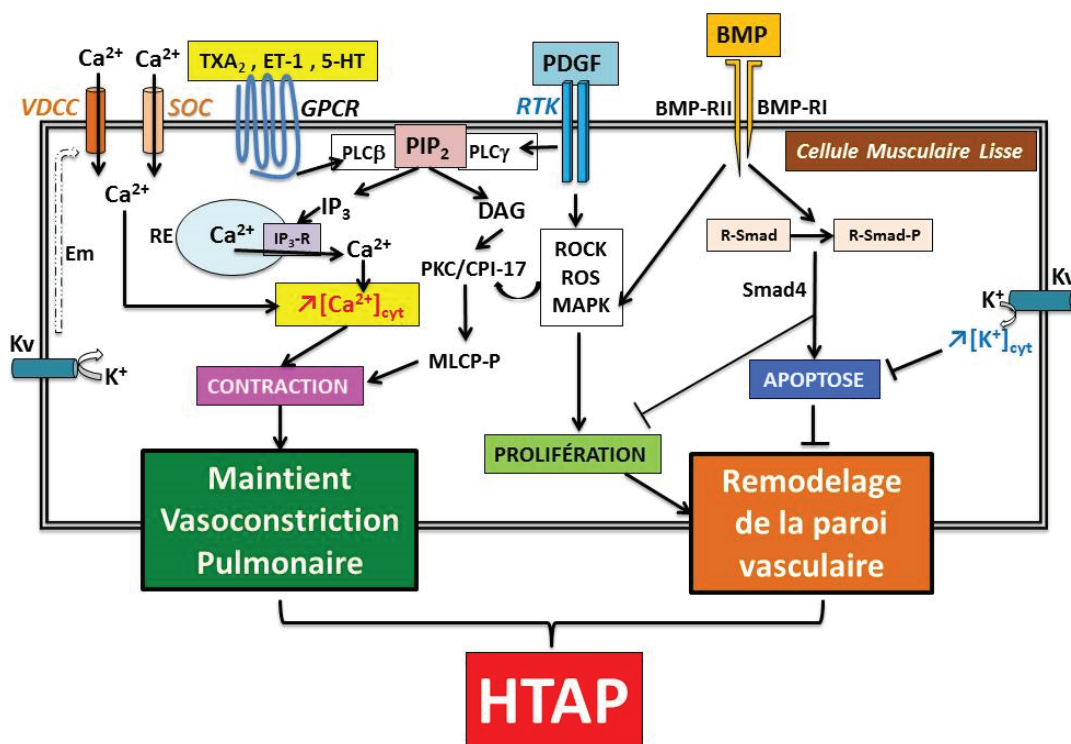
Lorsque l'endothélium sécrète de l'ET-1 ou du TXA<sub>2</sub>, ces stimuli se lient à leurs récepteurs spécifiques qui sont exprimés à la surface des CML, ce qui active la phospholipase C (PLC) qui clive alors la phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycérol (DAG) (Wynne BM et al., 2009). L'IP<sub>3</sub> se lie à ses récepteurs à la surface du réticulum endoplasmique (RE). Ainsi c'est l'ouverture des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> qui permettent le passage du Ca<sup>2+</sup> du RE vers le cytosol. Le Ca<sup>2+</sup> issu du RE peut activer des canaux calciques de type SOC (Store operated channel) quand le RE est dépleté en Ca<sup>2+</sup> et permettre entre autre, un entrée de Ca<sup>2+</sup> du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Ma J et Pan Z, 2003).

Lorsque la concentration en Ca<sup>2+</sup> est augmentée dans le milieu cytosolique. Le Ca<sup>2+</sup> se lie à la Calmoduline, il forme le complexe Calcium-calmoduline (Ca<sup>2+</sup>-CaM) qui active la Kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK). La MLCK, en présence d'ATP, phosphoryle la chaîne légère de myosine (MLC) en MLC-P, et cet état permet l'interaction de la myosine avec les filaments d'actine, ce qui provoque la contraction des CML et la vasoconstriction de la paroi des artères pulmonaires (Walsh MP, 1994).

D'autre part, le DAG active la PKC qui peut stimuler les canaux calciques de type ROC (Receptor operated channel) qui permettent l'entrée de Ca<sup>2+</sup> du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. La PKC phosphoryle aussi la CPI-17 (C-kinase potentiated Protein phosphatase-1 Inhibitor 17) en p-CPI-17. Cette CPI-17 phosphorylée inactive la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP) en la maintenant dans un état phosphorylé (MLCP-P). La MLC reste alors dans un état phosphorylé et la contraction est maintenue (Lincoln TM, 2007) (Figure 6).



Aussi activés par les molécules sécrétées par l'endothélium (FGF, PDGF) et par l'activation des GPCR ou des RTK (Récepteur à activité Tyrosine Kinase), la RhoA-GTP active la ROCK qui active la CPI-17 en CPI-17 phosphorylée (p-CPI-17), inactive la MLCP en MLCP-P et maintient l'état phosphorylé de la MLC ce qui accentue la contraction des CML et augmente la vasoconstriction des artères pulmonaires (Wirth A, 2010) (Figure 6).



**Figure 6. Dysfonctions des cellules musculaires lisses conduisant à l'HTAP.**

*Représentation des principaux canaux, récepteurs et voies de signalisations qui sont activés anormalement et qui contribuent à l'aggravation de l'hypertension artérielle pulmonaire. Schéma réalisé par Roddy Hiram*

Toute modification moléculaire, structurale et fonctionnelle qui influence le tonus des artères peut avoir des conséquences physiopathologiques à long terme plus ou moins irréversibles et néfastes sur l'organisme. La compréhension de l'électrophysiologie des cellules musculaires lisse permet d'expliquer certains dysfonctionnements ayant un impact sur leur contraction et leur prolifération, conduisant à l'HTAP.

### 3.5.2. Influence du potentiel membranaire.

Les CML sont sensibles à leur environnement et aux variations de concentration des composés du sang. Le pH normal du sang au niveau des artères pulmonaires est de 7,4. Il est variable en fonction de la production et de la concentration de proton dans le sang. Les CML possèdent à leur surface des canaux ioniques qui permettent le passage des ions dont la répartition asymétrique de part et d'autre de la membrane plasmique est responsable du gradient électrochimique (Thomeloe KS et Nelson MT, 2005).

Les concentrations ioniques intra- et extracellulaires (Tableau 3) constituent les bases pour étudier les propriétés électrophysiologiques des artères pulmonaires car elles régulent presque toutes les fonctions cellulaires telles que la contraction, la relaxation, la prolifération, la migration, l'apoptose, les communications intercellulaires et l'expression des gènes (Ganong W, 2005).

**Tableau 3. Concentrations ioniques intra- et extracellulaires des CML.**

Électrolyte x	$[x]_i$ en mM	$[x]_e$ en mM
K <sup>+</sup>	160	4
Na <sup>+</sup>	10	144
Ca <sup>2+</sup>	10 <sup>-4</sup>	2
Cl <sup>-</sup>	4	120
Mg <sup>2+</sup>	0,1	1
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10	28

*Les concentrations sont exprimées en mM (Ganong W, 2005).*

La membrane plasmique est semi-perméable et permet le passage des ions et des molécules de manière sélective. La membrane est garnie de protéines membranaires telles que les canaux et les pompes permettent le passage des ions et des récepteurs qui assurent la transduction des signaux. La membrane est ainsi caractérisée par un potentiel membranaire qui dans les conditions normales est appelé potentiel de repos (Casteels R et Kuriyama H, 1966).

Le passage des ions à travers la membrane ainsi que leur charge et leur concentration permettent de définir le potentiel d'équilibre électrochimique ( $E_x$ ) de chaque électrolyte donné par l'équation de Nernst (Ganong W, 2005),

$$E_x = -\frac{RT}{ZF} \cdot \ln \frac{[x]_i}{[x]_e}$$

**Équation 8. Équation de Nernst.**

$E_x$  est le potentiel d'équilibre de l'ion (en V), R est la constante des gaz parfaits ( $8,314 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), T est la température absolue exprimée en Kelvin (telle que  $T = t$  en degré Celsius + 273), F est la constante de Faraday ( $9,65.10^4 \text{ A.S.mol}^{-1}$ ), Z est la valence de l'ion,  $[x]_i$  et  $[x]_e$  correspondent respectivement à la concentration intra- ou extracellulaire de l'ion. Suivant l'équation de Nernst, à température de  $25^\circ\text{C}$  soit 298 K,  $E_{K^+} = -85 \text{ mV}$ ,  $E_{Na^+} = 60 \text{ mV}$ ,  $E_{Ca^{++}} = 140 \text{ mV}$ ,  $E_{Cl^-} = -25 \text{ mV}$ ,  $E_{HCO_3^-} = -27 \text{ mV}$  (Ganong W, 2005).

Au repos, dans les artères pulmonaires, le potentiel membranaire  $E_m$  des CML est de  $-70 \text{ mV}$ , proche du potentiel d'équilibre du potassium ( $K^+$ ), ce qui suggère que la membrane est plus perméable aux ions  $K^+$  qu'aux autres ions. Ainsi, les autres ions passent à travers des canaux ioniques spécifiques qui ont des faibles probabilités d'ouverture au repos. Les canaux potassiques ont en effet un rôle primordial dans l'excitabilité des CML. Activés, ils augmentent leur probabilité d'ouverture et la concentration en  $K^+$  est aussi augmentée. Ces événements provoquent une hyperpolarisation de la membrane. Les canaux calciques voltage-dépendants sont maintenus fermés. La concentration intracellulaire de calcium ( $Ca^{2+}$ ) sera plus faible ( $<10^{-7} \text{ M}$ ), ce qui provoque une relaxation des CML et une vasodilatation des artères (Mandegar M et al., 2002).

À l'inverse, quand les canaux potassiques tendent à se fermer, il y a diminution de la conductance en  $K^+$  et tendance à la dépolarisation de la membrane. Les canaux calciques voltage-dépendants s'ouvrent et le calcium entre dans la cellule. L'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire favorise le maintien de l'état phosphorylé de la MLC, ce qui induit la contraction des CML et une vasoconstriction des artères pulmonaires (Mandegar M et al., 2002).

Les mutations, ou anomalies génétiques liées aux canaux potassiques ou aux canaux voltage-dépendants ont ainsi été décrits comme ayant un rôle dans l'HTAP (Yuan JX-J et al., 1998).

### 3.5.3. Anomalies des canaux ioniques.

Il existe plusieurs types de canaux ioniques à la surface des CML, qui assurent le passage des ions  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$  et contribuent à la modulation des fonctions membranaires et à la stabilité des conditions physiologiques.

**Les canaux potassiques** se divisent en 6 types : Les  $BK_{Ca}$  (Big Potassium Channel), les  $SK_{Ca}$  (Small Potassium Channel), les  $K_V$ , les  $K_{ATP}$ , les  $K_{IR}$ , les  $K_T$ . Tous ces canaux possèdent des activateurs et inhibiteurs spécifiques. L'altération de leur expression ou de leur activité peut causer des anomalies hémodynamiques chroniques (Yuan JX-J et al., 1998).

Dans l'HTAP, il a été montré par exemple, que les canaux potassiques voltage-dépendants ( $K_V$ ), qui sont les principaux responsables des courants potassiques au repos et garants du potentiel membranaire de repos, peuvent subir des modifications de leur expression au niveau génomique, ou des inhibitions pharmacologiques qui diminuent soit leur expression, soit leur activité (probabilité d'ouverture) à la membrane des CML (Figure 6).

Leur mauvais fonctionnement ou non-fonctionnement induit un changement du potentiel de repos (dépolariation) et une augmentation de l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Comme décrit précédemment, cet événement provoque l'augmentation de la contraction des CML et de la vasoconstriction des artères pulmonaires (Shimoda LA et al., 2001).

**Les canaux calciques** sont de type L-VDC (Low-Voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channel), ROC (receptor operated channel) et SOC (store operated channel). Leur rôle est essentiel car ils permettent l'influx de calcium sans lequel la contraction des artères ne peut se produire. Les VDC sont les principaux déterminants de l'entrée de calcium, car ils dépendent des variations du potentiel membranaire, tandis que les autres canaux nécessitent une activation par des ligands pharmacologiques. Dans l'HTAP, le phénomène d'hypoxie conduit à la dépolarisation des membranes et modifie l'activité normale des VDC. Il y a de plus sécrétion anormalement élevée de vasoconstricteurs issus de l'endothélium, qui sont capables d'activer les ROC. L'ensemble permet d'élever la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  et augmente le niveau de contraction des CML (Nelson MT et al., 1990) (Figure 6).

**Les canaux chlores  $\text{Cl}^-$**  sont importants dans le mécanisme de régulation de la vasoconstriction et vasodilatation en réponse aux stimuli pharmacologiques et aux stretchings mécaniques des tissus. On distingue deux types des canaux  $\text{Cl}^-$ , les  $\text{Cl}^-$  dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  et les  $\text{Cl}^-$  sensibles aux changements de volume cellulaire. En effet, les ions  $\text{Cl}^-$  sont impliqués dans l'augmentation de volume des CML.

Lorsque les VDC et les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  provoquent l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, l'ouverture des canaux  $\text{Cl}^-$  est provoquée induisant la sortie de  $\text{Cl}^-$  vers l'extérieure de la cellule, la dépolarisation membranaire, l'ouverture des canaux calciques, l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu intracellulaire et donc l'augmentation de la contraction. Ainsi dans l'HTAP, l'activation des canaux chlores dépendants du calcium par l' $\alpha_1$ -adrenorecepteurs a été décrite comme pouvant provoquer la dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants (Sweeney M et Yuan JX-J, 2000; Orlowo MA, 2004).

Le TMEM16A (Transmembrane member 16A) aussi appelé Anoctamine-1 (ANO-1) est un canal chlore calcium-dépendant sensible au voltage, qui dans l'HTAP, est surexprimé à la membrane des CML et qui est activé quand le calcium intracellulaire est augmenté, accentuant les effets de vasoconstriction (Forrest AS et al., 2012).

#### 3.5.4. Remodelage de la média.

Les voies de signalisation qui sont activées directement ou indirectement par les récepteurs et canaux ioniques présents à la membrane des CML participent à d'autres phénomènes cellulaires autres que la contraction et qui ont une grande importance dans le développement de l'HTAP. En effet, l'augmentation du calcium intracellulaire active les CaMK et la PKC qui, en plus de l'activation des RTK par le PDGF, stimulent une cascade de phosphorylation, impliquant SOS<sub>1</sub> (guanine nucleotide exchange factors), Ras, Raf-1, MAPKK (Mitogen-Activated Protein Kinase kinase) puis MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Cette MAPK active la voie impliquant ERK<sub>1/2</sub>, c-Jun et AP-1 qui au niveau nucléaire activent l'expression génomique de protéines qui influencent l'augmentation de la prolifération cellulaire.

D'autre part, la PI3K activée par les RTK active la voie d'Akt, qui facilite la croissance cellulaire (Goncharova EA et al., 2002; Bennett BL, 2006; Firth AL et al., 2013). Le nombre des CML est alors anormalement élevé au niveau de la média. La taille des cellules est augmentée. Il y a hyperplasie et hypertrophie au niveau de la média. L'ensemble des CML étant capable de se contracter, la vasoconstriction des artères pulmonaires est augmentée, ce qui diminue le diamètre de la lumière et augmente la résistance au débit sanguin provoquant une augmentation de la pression artérielle pulmonaire.

D'autres agents tels que le FGF (Fibroblast growth factor), S1P (Sphingosine-1-phosphate) et le VEGF (Vascular endothelial growth factor) activent des voies de signalisation impliquées dans la migration cellulaire. Des CML envahissent alors l'intima et provoquent la musculation de cette tunique et accroissent le potentiel vasoconstricteur des artères pulmonaires (Tanimoto T et al., 2002).

Le récepteur BMPRII à la surface des cellules endothéliales et des CML lie son ligand spécifique le BMP et active la phosphorylation de R-Smad qui par l'action de Smad4 peut inhiber la prolifération et activer l'apoptose. Cependant comme décrit précédemment, dans l'HTAP, les patients peuvent présenter des anomalies d'expression génomique liées à l'expression du BMPRII ou des inhibitions du binding BMP-BMPRII (Morell NW, 2006).

Le remodelage de la média et de l'intima marqué par l'épaississement de la paroi dû à l'hyperplasie, l'hypertrophie, la muscularisation chronique et l'obstruction de la lumière des vaisseaux est un phénomène irréversible qui a pour conséquence d'augmenter la pression artérielle et aggraver l'HTAP (Sakao S et Tatsumi K, 2011).

#### **4. Modèles expérimentaux d'HTAP.**

Afin de mieux comprendre l'HTAP et faire évoluer la prise en charge des patients, plusieurs modèles expérimentaux ont été utilisés *in vivo* et *in vitro*. Comme décrit précédemment, l'HTAP est une pathologie multifactorielle et les modèles actuels ne permettent pas de reproduire tous les aspects de la pathologie avec exactitude, mais chaque modèle permet de mimer un ou plusieurs aspects de la maladie afin de reproduire un type d'HTAP d'intérêt par rapport à un autre.

##### *4.1. Modèles in vivo.*

Parmi les modèles *in vivo* rapportés dans la littérature, on distingue par exemple le modèle de rats hypoxiques chroniques, le modèle de rats à HTAP induite par la Monocrotaline (Wilson DW et al., 1992; Dumitrascu R et al., 2011); le modèle de rats Sugén 5416 associé à l'hypoxie, induisant une HTAP sévère et l'apparition de lésions plexiformes dues à l'inhibition de récepteur du VEGF impliqués dans l'angiogenèse (Nicolls MR et al., 2012; Vitali SH et al., 2014); le modèle de souris mutées pour des gènes impliqués dans l'HTAP comme le BMPRII (Beppu H et al., 2011); les souris surexprimant l'IL-6 (Steiner MK et al., 2009); les souris surexprimant le gène S100A4 qui active la voie de STAT3 (Dempsie Y et al., 2011); le modèle de primates infectés au VIH (plus précisément le virus d'immunodéficience simien) induisant une inflammation vasculaire (George MP et al., 2013).

L'ensemble de ces modèles animaux ont contribué à approfondir les connaissances sur la physiopathologie de l'HTAP et ont contribué à proposer des traitements (Stenmark KR et al., 2009).

Néanmoins, la limite principale de ces modèles réside dans les difficultés de translation inter-espèces. En effet, les médicaments qui pourraient être efficaces chez l'animal ne sont pas toujours probants chez l'homme et font parfois des effets inverses, aggravant la situation des patients (Mitchelakis ED et al., 2008).

#### 4.2. *Modèle in vitro.*

Bien que les modèles animaux présentent de nombreux avantages pour observer le développement d'un ou plusieurs aspects de l'HTAP, un modèle original *in vitro* a été proposé, utilisé dans notre laboratoire et a été décrit dans la littérature (Guibert et al., 2005; Morin et al., 2011). Ce modèle consiste à utiliser des artères pulmonaires humaines saines, disséquées, cultivées à l'incubateur et sur lesquelles une hyperréactivité et/ou une inflammation est induite par un traitement pharmacologique. Ces artères sont ensuite soumises à une stimulation par des agents vasoactifs tels que l'ET-1, le thromboxane ou la sérotonine afin d'évaluer leur pouvoir contractile (ce modèle est décrit avec détails dans l'article 1 et 2) (Hiram et al., 2014; Hiram et al., 2015). Des molécules candidates pour induire la vasodilatation et/ou la résolution de l'inflammation peuvent alors être testées en traitement ou en aigüe pour évaluer leur capacité à normaliser la tension isométrique des artères.

Ce modèle a permis de mettre en évidence des voies de signalisation au niveau endothélial et au niveau des CML, impliquées dans la mise en place et le maintien de l'HTAP (Morin C et al., 2011).

La limite principale est que ce type d'expérience ne reproduit pas le caractère chronique de la maladie ce qui ne permet pas d'observer le développement d'un remodelage de la paroi ou l'apparition de lésions plexiformes. De plus, s'ajoute la difficulté de travailler avec des artères pulmonaires humaines viables, issues de patients déjà atteints d'HTAP.



De nombreux traitements ont été proposés depuis les 15 dernières années afin d'améliorer les conditions de vie des patients.

### **5. Traitements.**

Les traitements actuels visent pour la plus part à provoquer la relaxation des artères pulmonaires, car la vasoconstriction induisant un rétrécissement mécanique de la lumière des artères pulmonaires est un processus clé dans l'installation de l'HTAP (Taichman DB et al., 2014). Les médicaments proposés visent à inhiber ou activer les voies de sécrétion et de signalisation endothéliales qui ont un rôle dans la régulation de la relaxation/contraction des CML (Bonham CA et al., 2015).

#### *5.1. Activateurs de la voie NO – Guanylate Cyclase soluble – GMPc.*

La voie de l'oxyde nitrique étant favorable à la vasodilatation, il existe des médicaments qui permettent de favoriser cette action. Parmi ces médicaments, il y a le 6R-BH4 (Saproptérine dihydrochloride) qui permet d'augmenter la production de NO à partir du eNOS. Une autre stratégie thérapeutique consiste à administrer du NO par inhalation pour augmenter sa disponibilité au niveau des artères pulmonaires via les bronches. De plus, le Riociguat est un médicament utilisé pour stimuler l'activation de la Guanylate Cyclase soluble pour augmenter la production de GMPc qui comme vu précédemment, facilite également la relaxation. Le médicament le plus utilisé est cependant le Sildénafil (Viagra) qui est utilisé pour inhiber la PDE5 (Prasad S et al., 2000) (Pauvert O et al, 2003). Agissant de la même manière, il existe aussi le Tadénafil (Galiè N et al., 2009) et le Vardénafil (Jing ZC et al., 2011) qui permettent de maintenir élevés les niveaux de GMPc intracellulaires et ainsi d'augmenter la vasodilatation des CML tout en diminuant leur prolifération (Figure7).

#### *5.2. Activateurs de la voie de la Prostacycline.*

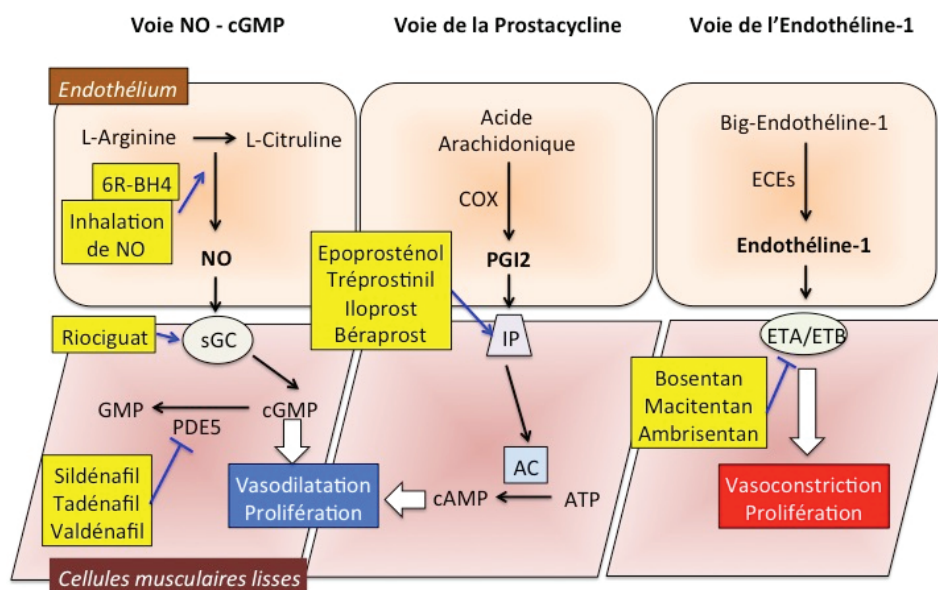
La voie de la Prostacycline, comme le NO, induit la vasodilatation. Les médicaments disponibles sont des agonistes du récepteur à la PGI<sub>2</sub>. Parmi ces médicaments, il existe l'Époprostenol, le Treprostinil, l'Iloprost et le Béraprost. En se liant aux récepteurs IP ils activent l'Adénylate Cyclase, ce qui augmente la production en AMPc (Figure 7).

Les CML se relaxent et les artères pulmonaires se dilatent d'avantage. Il y a de plus diminution de la prolifération (Bonham CA et al., 2015).

### 5.3. Antagonistes de la voie de l'Endothéline-1.

Dans l'HTAP, les concentrations en ET-1 sont augmentées. L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur. Les médicaments actuels sont des antagonistes des récepteurs à l'ET-1. L'Ambrisentan inhibe les récepteurs ET<sub>A</sub>. Le Bosentan et le Macitentan inhibent les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. L'inhibition spécifique de ces récepteurs diminue la contraction des CML et la vasoconstriction des artères. Le passage du sang et l'irrigation des poumons sont alors améliorés (Galiè N et al., 2008; Archer SL et al., 2010; Liu C et al., 2013) (Figure 7).

L'ensemble de ces traitements favorise la relaxation des artères pulmonaires. En revanche, ils ont le même effet vasodilatateur au niveau systémique, ce qui entraîne des effets secondaires au niveau cardiaque, rénal et cérébral ainsi que dans tous les systèmes, l'hémodynamie est finement régulée pour le maintien de l'homéostasie (Humbert M et al., 2004). De plus, ces traitements ne s'attaquent pas à l'obstruction des vaisseaux. Ils ont donc un effet ponctuel, qui soulage les patients mais ne les guérit pas définitivement de l'HTAP.



**Figure 7. Voies de signalisations ciblées dans le traitement de l'HTAP.**

Représentation du mode d'action des médicaments proposés actuellement pour réduire la vasoconstriction des artères pulmonaires chez les patients atteints d'HTAP. Schéma réalisé par Roddy Hiram

## 6. Inflammation.

Dans l'HTAP, l'adventice est la principale tunique des artères pulmonaires où s'effectue le recrutement accru de cellules immunitaires et pro-inflammatoires. Elle subit un remodelage qui l'épaissit significativement par rapport aux conditions normales.

L'adventice est composée de fibroblastes et de cellules de la défense immunitaire innée et acquise telles que les lymphocytes B et T, les cellules *Natural Killer T*, les cellules dendritiques, les cellules cytotoxiques T, les macrophages, les monocytes, les mastocytes et les granulocytes. Ces cellules sécrètent des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance qui se retrouvent dans la circulation sanguine pour répandre leurs effets, au niveau de l'endothélium et des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (Hassoun PM et al., 2009).

Les patients atteints d'HTAP ont des concentrations sanguines anormalement élevées en cytokines telles que l'IL-1 $\beta$  (Interleukine-1 $\beta$ ), l'IL-6, l'IL-8, TNF- $\alpha$  et en chimiokines telles que CCL2 (Chemokine C-C motif ligand 2), CCL5 aussi appelée RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) et CX3CL1 (Chemokine C-X3-C motif ligand 1) (Price LC et al., 2012).

Les cytokines et chimiokines stimulent les différents types cellulaires qui composent la paroi des artères pulmonaires et provoquent leur prolifération, migration, hypertrophie et différenciation, ce qui conduit à un ensemble de transformations morphologiques et fonctionnelles responsables du développement, de l'aggravation et de la sévérité de l'HTAP (Hassoun et al., 2009).

### 6.1. IL-1 $\beta$

L'IL-1 $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire dont les concentrations dans le sérum sont élevées chez les patients atteints d'HTAP (Humbert M et al., 1995). Il a été démontré dans un modèle murin d'HTAP induite à la Monocrotaline (MCT), que le fait de bloquer les récepteurs spécifiques de l'IL-1 $\beta$  réduisait l'hypertension pulmonaire et l'hypertrophie cardiaque droite (Dumitrascu R et al., 2011). Cela suggère donc que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en

réponse à un agent pharmacologique hautement toxique tel que la MCT (pyrrolizidine), joue un rôle important dans la genèse de l'HTAP. L'expression d'Adénylate cyclase qui permet la transformation de l'ATP en AMPc est diminuée en présence d'IL-1 $\beta$ , ce qui a pour conséquence de diminuer le pouvoir de relaxation vasculaire (El-Haroun H et al., 2004).

Dans les CML, IL-1 $\beta$  stimule IKK (I $\kappa$ B kinase alpha subunit) qui active la p38 et I $\kappa$ B $\alpha$  qui phosphorylés, permettent l'activation de NF $\kappa$ B phosphorylé (P-NF $\kappa$ B) qui va être transféré au niveau du noyau pour stimuler l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. D'autre part, IL-1 $\beta$  active mitogen-activated kinase kinase (MEKK) qui active MEK puis c-Jun N-terminal kinase (JNK) qui phosphoryle c-Fos et c-Jun pour former le complexe AP-1 (activator protein 1) qui agit au niveau du noyau en stimulant l'expression de gènes activateurs du remodelage de la paroi artérielle comme les métalloprotéinases matricielles 2 et 9 (MMP2 et MMP9).

Ces deux voies de signalisations stimulées par IL-1 $\beta$  activent des gènes qui codent pour des molécules comme ERK1/2, Smad4 et COX-2, impliquées dans le remodelage et l'hyperréactivité vasculaire (Lapointe MC et Isenovic E, 1999, Wang YZ et al., 2000).

## **6.2. IL-6.**

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée par tous les types cellulaires qui forment la paroi des artères pulmonaires. Les niveaux plasmatiques d'IL-6 sont élevés chez les patients atteints d'HTAP (Humbert M et al., 1995; Soon E et al., 2010). Ces augmentations de concentrations en IL-6 sont corrélées avec l'aggravation et la sévérité de la maladie.

L'IL-6 agit surtout au niveau des cellules inflammatoires et des cellules de la paroi vasculaire et participe au remodelage intense qui se produit dans le contexte de l'HTAP. Il y a ainsi stimulation du recrutement de lymphocytes T dans l'adventice, stimulation de la prolifération des CML et des cellules endothéliales, et stimulation de la production de chimiokines dans les cellules endothéliales (Steiner MK et al., 2009).

L'IL-6 se lie à son récepteur le CD126 (aussi appelé IL-6R) et active la phosphorylation de STAT3 (signal Transducer and Activator of Transcription 3). Le STAT3 phosphorylé se dimérise et passe dans le noyau pour activer la transcription de miR-17/92 qui bloque le récepteur BMPR2 (Brock M et al., 2009).

D'autre part, il y a surexpression de VEGFR2 (récepteur du VEGF) et de MMP9 (Matrix Metallopeptidase 9), une Endopeptidase impliquée dans la prolifération et la migration cellulaire (Steiner MK et al., 2009).

IL-6 stimule l'augmentation d'expression de VEGF et la différenciation des cellules endothéliales en cellules musculaires (Golembeski SM et al., 2005). Ce phénomène de muscularisation conduit au remodelage de la paroi vasculaire et à l'aggravation de l'HTAP par obstruction de la lumière des vaisseaux (Steiner MK et al., 2009).

### **6.3. *TNF $\alpha$***

Le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) est une cytokine qui est également surexprimée chez les patients atteints d'HTAP (Soon E et al., 2010). Il a été démontré que la surexpression de TNF $\alpha$  induit une diminution de l'expression de PGI<sub>2</sub> (Itoh A et al., 2003).

De plus, chez les rats traités à la MCT, le fait de bloquer le TNF $\alpha$  par l'Étanercept (un médicament utilisé dans certains rhumatismes inflammatoires) conduit à une diminution de l'apparition d'HTAP et à une amélioration des caractères hémodynamiques du poumon, ainsi qu'une diminution de l'inflammation pulmonaire et de l'hypertrophie cardiaque droite (Henriques-Coelho T et al., 2008). Le TNF $\alpha$  peut aussi agir au niveau des cellules endothéliales en diminuant la production de eNOS et de NO ce qui augmente la vasoconstriction des artères pulmonaires (Agnoletti L et al., 1999).

Le TNF $\alpha$  active son récepteur spécifique le TNFR qui active la PI3K $\gamma$  puis la PKC $\zeta$  et l'Akt aussi appelée protéine kinase B (PKB). Cela permet l'activation d'I $\kappa$ B $\alpha$  puis la phosphorylation de NF $\kappa$ B ainsi que l'activation du complexe AP-1 par la phosphorylation de c-Fos et c-Jun au niveau du noyau. Ces molécules activent l'expression de gènes codant pour MMP9, COX-2 et IL-6 impliqués dans la migration, la prolifération cellulaire et le remodelage des vaisseaux (Wang Q et al., 2013).

#### **6.4. RANTES.**

La chimiokine RANTES aussi appelé CCL5 module le recrutement des lymphocytes T, des éosinophiles, des monocytes et des cellules *Natural killer* dans les tissus pulmonaires en stimulant des récepteurs spécifiques exprimés à la surface de ces types cellulaires (Dorfmueller PI et al., 2002). Il a été démontré que les patients atteints d'HTAP sévère expriment de manière anormalement élevée l'ARN messager qui code pour la chimiokine RANTES (Pullamsetti SS et al., 2011). Par ailleurs, les cellules endothéliales sont les principales sécrétrices de RANTES. Cette chimiokine agit au niveau des différents types cellulaires en stimulant l'expression de récepteurs à d'autres chimiokines, comme le CX3CL1R (Dorfmueller PI et al., 2002).

Au niveau des lymphocytes T et des *Natural Killer T*, l'augmentation de l'activation de ces récepteurs stimule la voie de NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), qui est une voie de signalisation dépendante du  $Ca^{2+}$ . Les NFAT activées activent l'expression de Bcl-2 et inhibent l'expression des canaux potassiques Kv1.5. Il y a alors augmentation de la prolifération, diminution de l'apoptose, et augmentation de la vasoconstriction des artères pulmonaires (Bonnet S et al., 2007).

L'inflammation semble avoir un rôle majeur dans la genèse de l'HTAP du fait de la capacité des molécules pro-inflammatoires à déclencher quasiment toutes les dysfonctions cellulaires, moléculaires et génomiques qui caractérisent cette pathologie (Price LC et al., 2012).

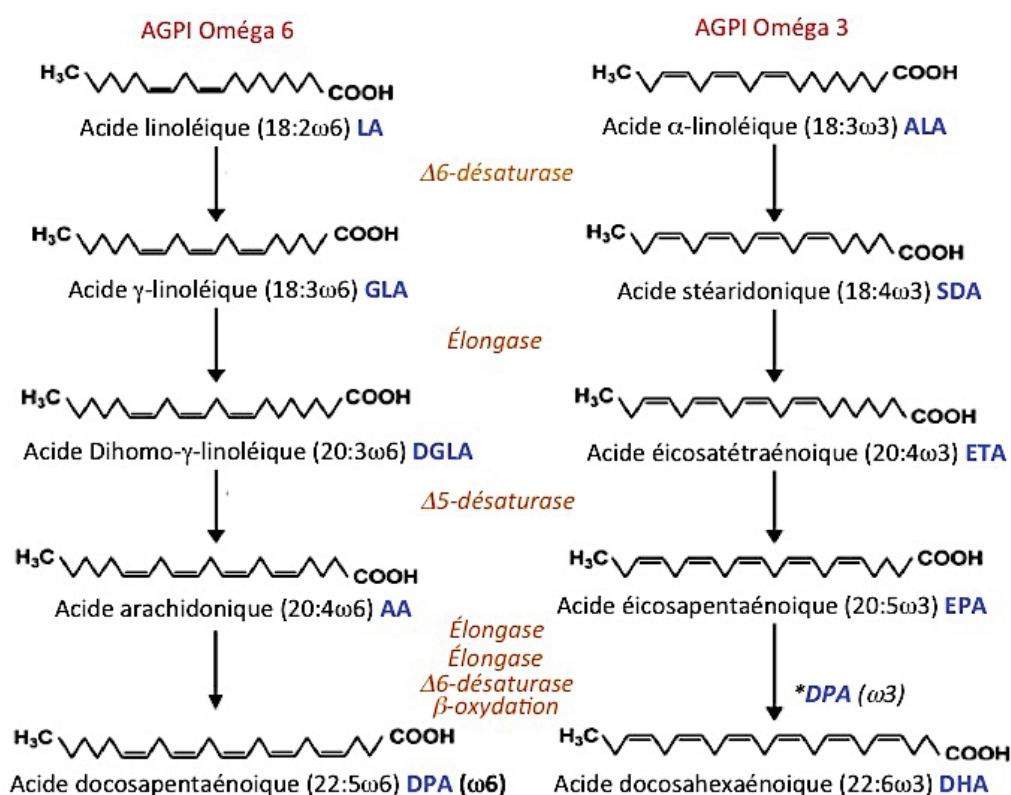
Il serait donc intéressant de savoir si le fait de contrer l'inflammation pourrait avoir des effets bénéfiques dans l'HTAP.

Dans d'autres pathologies marquées par un important statut inflammatoire comme l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, ou les maladies inflammatoires intestinales telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, les acides gras polyinsaturés de type Oméga-3 se sont avérés potentiellement efficaces, tels que le rapportent de nombreuses études sérieuses (Calder PC et al., 2002; Simopoulos AP et al., 2002; Harbige LS et al., 2003; Morin C et al., 2011).

### 7. Les Acides gras polyinsaturés à longue chaîne : EPA, DHA et leurs dérivés.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont identifiés par leur nombre de carbones et de doubles liaisons. Ils ont une extrémité méthylée (-CH<sub>3</sub>) et une extrémité carboxylée (-COOH). En fonction de la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthylée, on distingue les Oméga-6 si la double liaison est placée 6 carbones après le -CH<sub>3</sub> et les Oméga-3 si la double liaison est placée 3 carbones après le -CH<sub>3</sub>.

La nomenclature officielle est de type **X:Yn-6** (ou X:Y $\omega$ 6) et **X:Yn-3** (ou X:Y $\omega$ 3), où X est le nombre de carbones, Y est le nombre de doubles liaisons (Holub BJ, 2002; Russo GL, 2009) (Figure 8).



**Figure 8. Structure chimique et métabolisme des Oméga-6 et des Oméga-3.**

\* Nota Bene : il existe une forme de DPA dérivée de l'élongation de l'EPA aussi appelé Acide clupanodoïque tandis que le DPA dérivant des Oméga 6 est nommé acide d'Osbond. Schéma réalisé par Roddy Hiram



Les AGPI de type Oméga-6 et Oméga-3 sont indispensables à l'organisme. Ils sont dits essentiels et ne peuvent être synthétisés par l'organisme. Ils doivent donc être apportés par l'alimentation. Parmi les Oméga-6, l'acide arachidonique (AA; 20:4n-6) est le précurseur des éicosanoïdes comme les prostaglandines de série 2 (PGE<sub>2</sub>, PDG<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), les thromboxanes de série 2 (TXA<sub>2</sub>) et les leucotriènes de séries 4 (LTD<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>) ayant des effets pro-inflammatoires et vasoconstricteurs (Schmitz G et Ecker J, 2008).

Parmi les Oméga-3 par contre, l'EPA (acide eicosapentaénoic; 20:5n-3) et le DHA (acide docosahexaénoic; 22:6n-3) sont les précurseurs des éicosanoïdes comme les prostaglandines de série 3 (PGE<sub>3</sub>, PGD<sub>3</sub>, PGF<sub>3</sub>), les thromboxanes de série 3 (TXA<sub>3</sub>) et les leucotriènes de série 5 (LTD<sub>5</sub>, LTB<sub>5</sub>, LTA<sub>5</sub>) qui ont des effets plutôt anti-inflammatoires et vasodilatateurs (Schmitz G et Ecker J, 2008; Davidason MH, 2013).

Les Oméga-6 et les Oméga-3 sont tous utiles pour l'organisme mais un ratio qui penche plus vers la production de dérivés d'Oméga-6 est néfaste. Cependant, les Oméga-6 et Oméga-3 sont métabolisés par les mêmes types d'enzymes, qui sont les Δ<sub>6</sub>-, Δ<sub>5</sub>- et Δ<sub>4</sub>-désaturases, les élongases, les COX1-1/2, les LOX-5/12/15 et les CYP450 (Simopoulos AP, 2008). Il y a ainsi une compétition dans l'interaction avec ces enzymes pour pouvoir obtenir les dérivés métabolites issus des Oméga-6 ou des Oméga-3. Il faut donc garder un apport plus important en Oméga-3 pour maintenir des conditions optimales de santé (Stanley JC et al., 2007).

Depuis les 15 dernières années, l'intérêt de la recherche en santé se porte sur l'EPA et le DHA qui présentent des effets bénéfiques pour le développement fœtal et contre de nombreuses pathologies telles que les problèmes cardiovasculaires et neurodégénératifs comme par exemple le risque d'infarctus du myocarde et la maladie d'Alzheimer respectivement. Le syndrome métabolique (SMet), qui est un désordre du métabolisme de l'organisme qui préfigure le développement de maladies à grande morbidité telles que l'obésité, les troubles cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux, a récemment été décrit comme pouvant probablement induire de l'HTP due à des cardiopathies gauches ainsi que des remodelages vasculaires pulmonaires et l'élévation de pression pré-capillaire menant à l'HTAP chez les personnes atteintes (Vanderpool RR et al., 2014). De plus, une étude publiée en 2013 par Lorente-Cebrián et al., a rapporté des évidences sur le rôle bénéfique d'une alimentation enrichie en DHA et EPA sur des pathologies dues au SMet.



### 7.1. *MAG-EPA et MAG-DHA.*

De nouveaux précurseurs des EPA et DHA ont été synthétisés sous forme de MAG-EPA et MAG-DHA. Ils ont en effet une partie monoacylglycéride liée du côté –COOH de l'EPA et du DHA respectivement (Morin C et al., 2011) En effet, l'EPA et le DHA sont estérifiés en position sn-1 du glycérol pour construire la forme monoacylglycéride de l'EPA et du DHA respectivement. Cette forme lipidique neutre (contrairement à l'EPA et au DHA qui sont chargés négativement) a une bonne absorption au niveau intestinal et permet d'augmenter le ratio DHA/AA ce qui assure une synthèse plus élevée des métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation (Davidson MH, 2013).

Le DHA a été démontré comme pouvant prévenir l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique dans le contexte de l'asthme (Morin C et al., 2011). De plus le 19,20-EpDPE, un métabolite du DHA via la CYP450, et le MAG-DHA, diminuent la sensibilité calcique et la prolifération induites par l'ET-1 dans les artères pulmonaires (APH) (Morin C, Fortin S et Rousseau E 2011). Il a ainsi été démontré que le MAG-EPA pouvait résoudre l'inflammation dans un modèle allergique d'asthme. (Morin C et al., 2013). De plus, le MAG-EPA exerce un effet antiprolifératif sur les cellules de carcinome colorectal. (Morin C et al., 2013). Ces découvertes ont contribué à renforcer l'hypothèse que les Oméga-3 ou leurs dérivés agiraient au niveau moléculaire pour activer les mécanismes de résolution.

Le métabolisme du DHA et de l'EPA via l'action des enzymes 5-LOX, 12-LOX, 15-LOX et COX-2 donne des dérivés hydroxylés qui ont été démontrés comme ayant des rôles potentiels de résolution (Serhan CN et al., 2008). Certains écosanoïdes tels que les lipoxines et des médiateurs chimiques endogènes opèrent une action anti-inflammatoire en stimulant la sécrétion de mucus antimicrobien et en maintenant l'intégrité cellulaire et tissulaire des organes.

Ces dérivés sont regroupés sous la classe des médiateurs spécialisés dans la résolution ou SPM (Specialized pro-Resolving Mediators). Parmi ceux-ci, on distingue les Résolvines, les Protectines et les Marésines (Serhan CN et al., 2011; Recchiuti A, 2013).

Les Résolvines font l'objet d'un grand intérêt en recherche pour leur capacité à limiter l'inflammation en bloquant par exemple la production de transcrits induits par la stimulation réalisée par le *Tumor Necrosis Factors* (TNF) (Serhan CN et al., 2008).

### ***7.2. Les Résolvines : médiateurs spécialisés de résolutions.***

Lorsque le MAG-DHA ou le MAG-EPA sont clivés par la monoacylglycérol-lipase A1, il y a production de DHA et EPA respectivement. La 15-LOX et la 12-LOX peuvent alors métaboliser le DHA en 17S-HpDHA et 14S-HpDHA respectivement (Serhan CN et al., 2011; Recchiuti A, 2013). Le 17S-HpDHA interagit avec la 5-LOX pour donner une série de molécules tri-hydroxylées à 22 carbones appelées Résolvines de série D (RvD1, RvD2, RvD3 et RvD4). Quand le 17S-HpDHA subit une époxydation suivie d'une hydroxylation, les molécules appelées Protectines de série D sont obtenues (Neuroprotectine quand la réaction se produit dans le cerveau). Le 14S-HpDHA donne la Marésine (MaR1), molécule monohydroxylée à 22 carbones (Serhan CN et al., 2012).

L'EPA donne le 18R-HEPE par action de l'acétyl-COX-2 (COX-2 acétylé par l'Aspirine) ou de la CYP450. La réaction de ce métabolite avec la 5-LOX donne des Résolvines de série E (RvE1, RvE2, RvE3 et RvE4) (Serhan CN et al., 2011; Fredman G et Serhan CN, 2011).

En 2002 les Résolvines ont été décrites comme étant une nouvelle famille de produits bioactifs pouvant potentiellement contrer les signaux et l'expression de gènes pro-inflammatoires à partir d'échantillons de cerveaux et de tissus vasculaires humains (Serhan CN et al., 2002). À des concentrations nanomolaires (nM), la RvE1 arrête l'infiltration des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) de manière aussi efficace que des concentrations plus élevées (mM) en aspirine ou en dexaméthasone (Serhan CN et Petasis NA, 2011). De plus, la RvE1 a un effet protecteur contre l'inflammation en réduisant le recrutement des leucocytes de manière trois fois plus efficace que l'indométacine dans la péritonite induite par le zymosan (Hasturk H et al., 2005; Arita M et al., 2005).

Il a démontré que la RvD1 protège des anomalies dues à l'ischémie et limite l'infiltration des PMN (Hong S et al., 2003; Marcheselli VL et al., 2003; Serhan CN, 2007). De plus dans la maladie d'Alzheimer, la RvD1 a été démontré comme pouvant diminuer l'inflammation afin de permettre la phagocytose  $\beta$ -amyloïde et limiter la progression de la maladie (Lukiw WJ et al., 2005; Calder PC, 2006; Mizwicki MT et al., 2013).

En 2012 il a été démontré que la RvD1 et la RvE1 peuvent réduire l'inflammation due à la réaction allergique des voies respiratoires dans le contexte de l'asthme (Levy BD, 2012).

## **8. Hypothèse/problématique**

L'hypertension artérielle pulmonaire présente une composante inflammatoire qui est connue, mais qui n'est actuellement pas systématiquement ciblée dans les traitements proposés aux patients. Les agents pro-inflammatoires rapportés comme étant surexprimés dans l'HTAP sont aussi connus dans d'autres pathologies pour leur rôle activateur de dysfonctions cellulaires telles que l'inhibition de l'apoptose, la prolifération, l'hypertrophie et l'activation des effets vasoconstricteurs. Nous savons de plus, que le MAG-DHA et le MAG-EPA présentent des effets anti-hypercontractants dans un modèle *in vitro* d'asthme (Morin C et al., 2011) sur les bronches humaines, et les Résolvines D1 et E1 réduisent les effets de pathologies cardiovasculaires et neurodégénératives (Serhan CN et al., 2002).

### **8.1. Hypothèse de recherche**

Notre hypothèse de recherche est que l'inflammation pourrait être à l'origine des anomalies cellulaires et moléculaires qui engendrent des modifications fonctionnelles menant à l'apparition de l'HTAP. Les Résolvines D1 et E1 dérivés respectifs du MAG-DHA et du MAG-EPA pourraient alors contrer l'inflammation induite sur des artères pulmonaires humaines (ou un modèle de rats hypertendus à la Monocrotaline) afin de diminuer la prolifération, le remodelage de la paroi, l'hyperréactivité et l'hypersensibilité au  $Ca^{2+}$  des CML pour prévenir et/ou soigner l'HTAP.

### **8.2. Objectifs du projet de recherche**

L'HTAP est marquée par une hyperréactivité des vaisseaux, une hypersensibilité au  $Ca^{2+}$  des CML, une augmentation de la migration et de la prolifération cellulaire et par une forte expression de marqueurs de l'inflammation.

L'originalité du projet réside dans le fait que ces travaux se trouvent à l'interface de la chirurgie thoracique, de la pathologie et des sciences fondamentales. En effet, les artères pulmonaires humaines ont été obtenues grâce à la contribution des Drs Marco et Chantal Sirois, qui réalisaient des lobectomies sur des patients atteints de carcinomes pulmonaires au CHU de Sherbrooke.

Les portions de tissus pulmonaires jugés sains par les pathologistes Dr Edmond Rizcallah et Dre Sofia Marouan étaient acheminées dans le laboratoire de Dr Éric Rousseau où les artères pulmonaires étaient disséquées et cultivées pendant 24 h selon différentes conditions mimant les statuts pro-inflammatoires et/ou pro-vasoconstricteurs.

D'autre part, un devis d'étude a été élaboré afin d'induire l'HTAP par l'injection de monocrotaline chez le rat afin de décrire le développement de l'inflammation puis sa résolution.

### **Objectifs spécifiques :**

Les hypothèses de travail ont permis de fixer des objectifs spécifiques afin d'étudier pendant trois ans les questions que soulevaient notre hypothèse de recherche.

#### **Objectif #1**

Démontrer que via leurs dérivés métaboliques, le MAG-DHA et le MAG-EPA diminuent la sensibilité au  $Ca^{2+}$  et l'hyperréactivité induite sur des artères pulmonaires humaines *in vitro*.

#### **Objectif #2**

Décrire le rôle des Résolvines RvD1 et RvE1 sur les niveaux de phosphorylation de protéines régulatrices de la machinerie contractile (CPI-17, MYPT1) dans les artères pulmonaires humaines traitées *in vitro* à l'ET-1, un vasoconstricteur puissant.

#### **Objectif #3**

Évaluer le potentiel de résolution de la RvD1 et de la RvE1 sur des artères pulmonaires humaines rendues hyper-réactives par un traitement proinflammatoire au  $TNF\alpha$  et à l'IL-6.

#### **Objectif #4**

Analyser *in vivo*, le rôle curatif du MAG-DHA administré tardivement, dans un modèle de rats avec HTAP induite par la monocrotaline chez lesquels le statut inflammatoire est établi et où les modifications tissulaires sont à leur stade avancé.

## ARTICLE 1

### **Resolvin D1 reverses reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by ET-1, TNF- $\alpha$ and IL-6 in human pulmonary artery.**

**Auteurs de l'article:** Roddy Hiram, Edmond Rizcallah, Chantal Sirois, Marco Sirois, Caroline Morin, Samuel Fortin et Éric Rousseau.

**Statut de l'article:** publié dans American Journal of Physiology : **Heart and Circulatory Physiology**. 2014; 11 : H1547-H1558.

#### **Avant-propos:**

Cet article avait pour but d'induire sur des artères pulmonaires humaines, une hyperréactivité et une hypersensibilité au Ca<sup>2+</sup>, à partir d'un traitement avec l'ET-1 (un agent vasoconstricteur) ou d'un traitement au TNF $\alpha$  et à l'IL-6 (des agents proinflammatoires). Il s'agissait ensuite de tester le potentiel préventif de la RvD1 et de son précurseur le MAG-DHA afin de décrire le rôle de cette molécule sur la machinerie contractile et sur l'expression de protéines membranaires.

Le recrutement des patients, le transfert de tissus de la pathologie vers le laboratoire, la dissection des artères pulmonaires, la mise en oeuvre des expériences, l'analyse et l'interprétation des résultats et la rédaction du manuscrit ont été réalisés par M. Roddy Hiram sous la supervision de Dr Éric Rousseau.

Le devis d'étude et la révision du manuscrit ont été réalisés par M. Roddy Hiram et Dr Éric Rousseau. Les MAG-DHA, MAG-EPA et MAG-DPA ont été synthétisés et fournis par SCF-Pharma, sous la direction de Dre Caroline Morin et Dr Samuel Fortin.

Les lobectomies ont été réalisées par Dr Marco Sirois et Dr Chantal Sirois. Les resections pulmonaires saines étaient fournies par Dr Edmond Rizcallah du département de pathologie du CHUS.

**Résumé :**

L'hypertension pulmonaire est une maladie rare et progressive caractérisée par un statut inflammatoire et un remodelage vasculaire résultant en une augmentation des résistances artérielles pulmonaires. Durant les dix dernières années, des traitements ont été proposés. La plus part d'entre eux ciblent les voies de signalisation endothéliales qui stimulent la relaxation des cellules musculaires lisses. Cependant l'hypertension pulmonaire reste associée à une grande morbidité.

Nous émettons l'hypothèse que l'inflammation jouerait un rôle cruciale dans la sévérité de la vasoconstriction anormale observée dans l'hypertension pulmonaire. Le but de cette étude était de vérifier si la Résolvine D1 (RvD1), un agent antiinflammatoire potentiel, avait des effets sur la réactivité pharmacologique des artères pulmonaires humaines à partir d'un modèle *in vitro* d'hyperréactivité induite.

Les effets de la RvD1 et des MAG d'oméga-3 ont été mesurés en fonction de la contractilité et de la sensibilité au  $Ca^{2+}$  développées par les artères pulmonaires humaines prétraitées (ou non) en condition proinflammatoire avec 10 ng/ml de  $TNF\alpha$  ou 10 ng/ml d'IL-6; ou en condition hyperréactive avec 5 nM d'ET-1.

Les résultats démontrent que comparés aux contrôles, 24 h de prétraitement avec le  $TNF\alpha$ , l'IL-6 ou l'ET-1 augmente la réactivité pharmaco-mécanique et la sensibilité au  $Ca^{2+}$  des artères pulmonaires humaines stimulées avec 80 mM de KCl, 1  $\mu$ M de 5-hydroxytryptamine (5-HT), 30 nM U-46619 et 1  $\mu$ M de PDBu. En revanche, 300 nM de RvD1, ainsi que 1 $\mu$ M de MAG-DPA renversent les effets induits par les traitements proinflammatoires et vasoconstricteurs. Des analyses par Western Blot révèlent que la RvD1 diminue le niveau de phosphorylation de la CPI-17 et l'expression du TMEM16A (Transmembrane protein member 16A), mais augmente la détection du GPR32 (G protein-coupled receptor 32).

Les résultats démontrent que la RvD1, un dérivé trihydroxylé du DHA, diminue l'hyperréactivité des artères pulmonaires humaines en réduisant la phosphorylation de la CPI-17 et l'expression du TMEM16A.

**Resolvin D1 reverses reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by  
ET-1, TNF- $\alpha$  and IL-6 in human pulmonary artery.**

**Roddy Hiram<sup>1</sup>, Edmond Rizcallah<sup>2</sup>, Chantal Sirois<sup>3</sup>, Marco Sirois<sup>3</sup>, Caroline Morin<sup>1,4</sup>,  
Samuel Fortin<sup>4</sup> and Eric Rousseau<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> Department of Physiology and Biophysics, <sup>2</sup> Department of Pathology, <sup>3</sup> Service of Thoracic Surgery Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada and <sup>4</sup> SCF Pharma, Ste-Luce, QC, Canada.

Corresponding author: Eric Rousseau

Department of Physiology and Biophysics,  
Faculty of Medicine and Health Sciences,  
Université de Sherbrooke

3001, 12<sup>th</sup> avenue north,

J1H 5N4, Sherbrooke, QC, Canada

Tel: (819) 564-5306 Fax: (819) 564-5399

Email: [Eric.Rousseau@USherbrooke.ca](mailto:Eric.Rousseau@USherbrooke.ca)

**Running Title:** RvD1 normalizes induced over-reactivity in HPA.

**Keywords:** CPI-17, Docosapentanoic acid monoacylglyceride; Endothelin; Pulmonary hypertension; Resolvin D1.

**ABSTRACT**

Pulmonary Hypertension (PH) is a rare and progressive disease characterized by an inflammatory status and vessel wall remodeling, resulting in increased pulmonary artery resistance. During the last decade, treatments have been proposed; most of them target the endothelial pathways that stimulate smooth muscle cell relaxation. But PH remains associated with significant morbidity. We hypothesize that inflammation plays a crucial role in the severity of the abnormal vasoconstriction in PH. The goal of this study was to assess the effects of Resolvin D1 (RvD1), a potent anti-inflammatory agent, on the pharmacological reactivity of human pulmonary arteries (HPA) via an *in vivo* model of induced hyper-reactivity. The effects of RvD1 and monoacylglyceride (MAG)-compounds were measured on the contractile activity and  $Ca^{2+}$  sensitivity developed by HPA which were pretreated (or not) under pro-inflammatory condition either with 10 ng/ml  $TNF\alpha$  or 10 ng/ml IL-6; or hyperreactive condition (5 nM ET-1). Results demonstrate that, compared to controls, 24-h pre-treatment with  $TNF\alpha$ , IL-6 or ET-1 increased the reactivity and  $Ca^{2+}$  sensitivity of HPA as revealed by agonist challenges with: 80 mM KCl, 1  $\mu$ M 5-hydroxytryptamine (5-HT), 30 nM U-46619 and 1  $\mu$ M PDBu. However, 300 nM RvD1, as well as 1  $\mu$ M MAG-DPA strongly reverse the over responsiveness induced by both pro-inflammatory and hyperreactive treatments. In pre-treated pulmonary artery smooth muscle cells, Western blot analyses revealed that RvD1 treatment decreased the phosphorylation level of CPI-17 and expression of Transmembrane Protein member 16A (TMEM16A), while increasing the detection of G protein-coupled receptor 32 (GPR32). The present data demonstrate that RvD1, a trihydroxylated DHA derivative, decreases induced over-reactivity in HPA via a reduction in CPI-17 phosphorylation and TMEM16A expression.



## INTRODUCTION

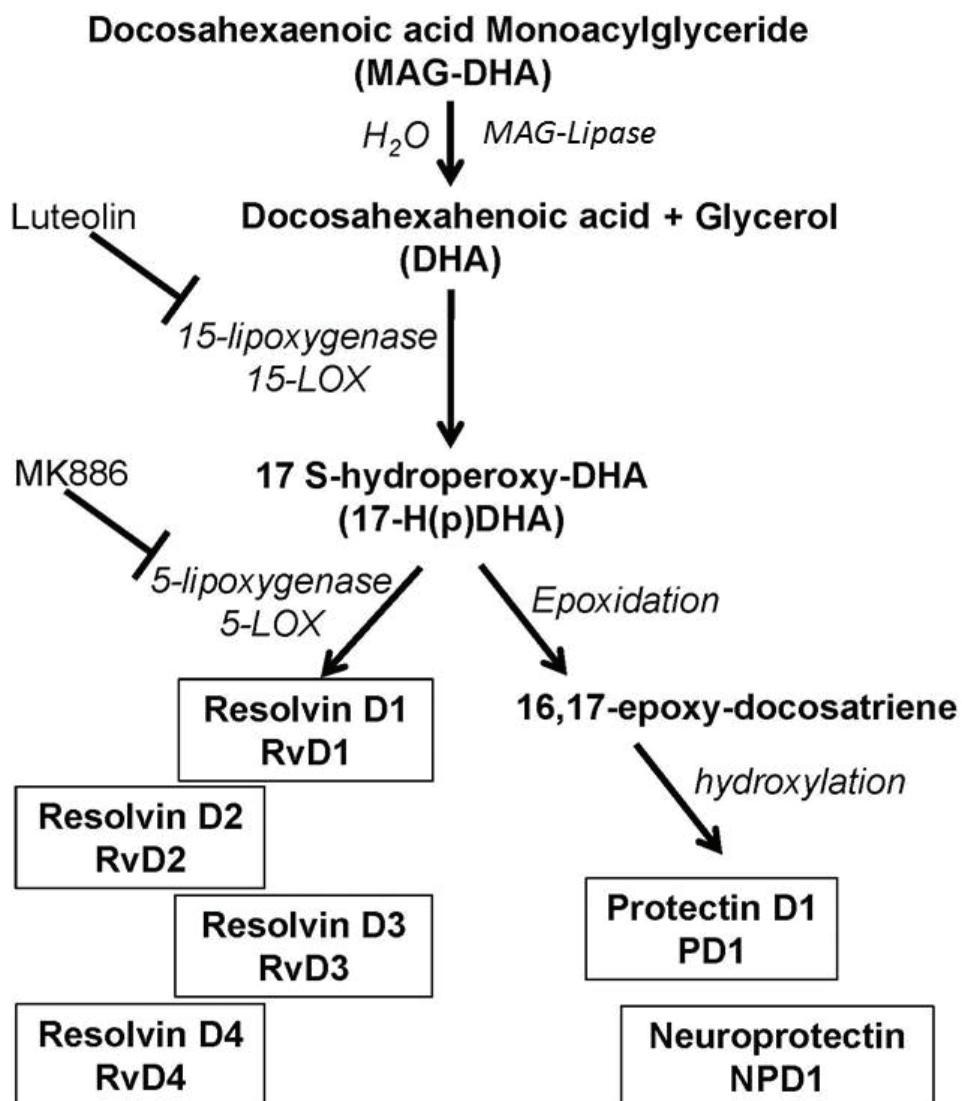
Pulmonary Hypertension (PH) is a rare, progressive and multifactorial disorder. Typically, PH is characterized by a progressive increase in pulmonary vascular resistance associated with an increase from 10 mmHg to 25 mmHg in pulmonary arterial blood pressure, and a significant proliferation of smooth muscle cells into the media of human pulmonary arteries (HPA) (14). The increase in vascular resistance is partially due to endothelial dysfunction leading to a considerable remodeling of the pulmonary artery wall. A complementary hypothesis has suggested that these alterations are induced by an increase in pro-inflammatory mediators released by dendritic cells, Natural Killer (NK) cells, macrophages, mast cells, T and B lymphocytes. These mediators include various cytokines such as Interleukins (IL), namely IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6, Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and chemokines such as chemokine ligands 2 (CXCL<sub>2</sub>) and 6 (CXCL<sub>10</sub>) (18). Moreover, the impact of inflammation in HPA has been assessed by the positive effects of anti-inflammatory treatments (42).

The genesis of PH pathophysiology is poorly understood, although several studies have shown that patients with PH present a higher level of endothelium-secreted endothelin-1 (ET-1) detected in the plasma and the lung. ET-1 is a powerful vasoconstrictor and mitogen for smooth muscle. ET-1 activates two receptors: ET<sub>A</sub>-receptors, expressed in smooth muscle cells, and ET<sub>B</sub>-receptors found in endothelial cells and in smooth muscle cells. Stimulation of ET<sub>A</sub>- and ET<sub>B</sub>-receptors in smooth muscle cells mediates the abnormal increase in vasoconstriction and cell proliferation typically observed in PH patients (5). While a number of different treatments have been proposed since the early 1980s, PH

remains associated with serious vascular injury, right ventricular failure and a higher morbidity (14).

Several clinical trials including diet supplementation with polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) have shown beneficial effects in various cardiovascular diseases (31). Among n-3 PUFA of interest, eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid monoglyceride (MAG-DPA) have been reported to modulate the expression of various anti-inflammatory genes and to exert inhibitory effects on thrombocyte aggregation as well as on lipogenesis (34). EPA and DHA also reduce the expression of pro-inflammatory genes such as TNF- $\alpha$  or NF $\kappa$ B (4). Over the last 20 years, development of *in vitro* models as well as several studies conducted by various groups, including our laboratory (25), has demonstrated that CYP450 EPA and DHA metabolites are highly active in smooth muscle cells from both vascular (1) and bronchial beds (28). For instance, the mode of action of 19,20-epoxydocosapentaenoic acid (19,20-EpDPE) and docosahexaenoic acid monoacylglyceride (MAG-DHA) has been assessed and their ability to decrease Ca<sup>2+</sup> sensitivity in human pulmonary explants has been demonstrated (23, 27). These observations allowed putting forward the hypothesis that a spectrum of long-chain n-3 PUFA derivatives was putatively able to reduce local inflammation, wall remodeling and typical over-reactivity in HPA. Within inflammatory exudates, n-3 PUFA-derived mediators including Resolvin E1 from EPA as well as Resolvin D1 (RvD1) and Protectin D1 from DHA are produced (13).

The metabolic cascade of MAG-DHA (Figure 1) in putative cells is relatively well known (34). The first metabolic step is the hydrolysis of the ester bond by phospholipase A1 (PLA1), in which MAG-DHA is hydrolyzed to DHA and glycerol. DHA molecules are subsequently transformed into 17-S-hydroxyperoxy-DHA by 15-LOX (17) and subsequently into Resolvin molecules upon action of 5-LOX. An alternative pathway involves the specific epoxydation of one of the double carbon bonds and localized hydroxylations resulting in the production of Protectins as previously reported (17).



**FIGURE 1: General scheme of the metabolic cascade of MAG-DHA and DHA into various metabolites, including Resolvins and Protectins.** Note that 15-LOX and 5-LOX represent key enzymes to produce the resolvins of D-series, while protectins and neuroprotectins require epoxidation and hydroxylation.

The potent anti-inflammatory and pro-resolving effects of these lipid mediators have been recently assessed and demonstrated (39). RvD1 has been shown to decrease eosinophils and pro-inflammatory mediators and to promote macrophage clearance of allergens in allergic airway responses (38), as well as display a specific ability to resolve inflammation in chronic inflammatory diseases such as asthma and pathological retinal angiogenesis (40). Peripheral and central RvD1 have also been shown to attenuate pain inflammation. (46) From a biochemical standpoint, Resolvin D1 is a trihydroxylated derivative of DHA. RvD1 via its interactions with its receptors, either ALX or GPR32, likely controls the expression of various miRNAs, transcription factors and major pro-inflammatory enzymes such as lipoxygenases (LOX) (8). These effects lead to the modulation of various molecular and cellular functions in resolving inflammation, a process correlated with an anti-proliferative activity (36).

Contraction in smooth muscle cells can be initiated by electrical, mechanical and chemical stimuli. In fact, passive stretching of smooth muscle cells causes contraction. Depolarization of smooth muscle cells induces the opening of voltage-dependent calcium channels that cause contraction as a result of the increase in intracellular calcium concentration. Numerous chemical stimuli such as angiotensin II (via AT<sub>1</sub> receptors), endothelin-1 (via ET<sub>A</sub>- and ET<sub>B</sub>- receptors) and thromboxane A<sub>2</sub> (via TP-receptors) lead to the activation of different signaling pathways such as IP<sub>3</sub>, PKC/CPI-17 and Rho-kinase, all of which converge to increase Ca<sup>2+</sup> release and sensitivity of the contractile machinery. Free calcium binds calmodulin and the Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complex activates the myosin light chain kinase (MLCK), which phosphorylates myosin light chains (MLC) leading to smooth muscle cell contraction.

Regulation of the contractile machinery has previously been demonstrated to involve the PKC-CPI-17 signaling pathway. In fact, the lower the CPI-17 phosphorylation level, the lower the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, due to a lower level of phosphorylation of the Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP), which in turn results in a higher dephosphorylation rate of the Myosin Light Chain (MLC) and a reduced tone (16).

Our hypotheses are that a pro-inflammatory status may induce a hyperreactivity in HPA and that RvD1 may induce an inhibition of the local inflammatory component in HPA. Therefore, RvD1 could become a potential mediator in reversing the induced rise in pulmonary arterial stiffness. The aim of the present study was to assess the effects of RvD1 and long chain monoacylglyceride precursors on pharmacologically-induced tone and pro-inflammatory conditions.

We report herein the first evidence that, *in vitro*, RvD1 prevents arterial wall over-reactivity in HPA. This effect appears to be related to a decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, lower TMEM-16A expression and reduced phospho-CPI-17/total CPI-17 ratio.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Culture of human pulmonary arteries***

This study was approved by our institutional Ethics Committee (protocol number 05-088-S1-R4). Consenting patients hospitalized for lung carcinoma were recruited and human lung tissues were obtained from the operating room via the Department of Pathology (12, 25). Tissue samples, declared “tumor-free” by the pathologist, were transported to our laboratory bathed in sterile Krebs solution, pH 7.4. Note that none of the patients were suffering from PH, so all tissues were recovered from control patients. Distal HPA were dissected under binocular control and artery segments of 4 millimeters of length and 0.5 – 0.8 millimeters in diameter were cultured for 24 h in Dulbecco’s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) containing 1% penicillin/streptomycin (Pen-Strep). HPAs were either untreated (control) or treated with 5 nM ET-1 or 5 nM ET-1 combined with either 300 nM RvD1 or monoacylglycerides and then incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> (12). Alternatively, to mimic the effects of pro-inflammatory conditions, HPA were cultured for 24h either in control conditions (untreated) or with either 10 ng/ml TNF $\alpha$  or 10 ng/ml IL-6 in the absence or presence of 300 nM RvD1.

### ***Isolation of pulmonary arterial smooth muscle (PASM) cells***

HPA rings were incubated 1 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in *Hank's Balanced Salt Solution (HBSS* from GIBCO) supplemented with 1% Pen-Strep, 0.2% type IV Collagenase and 0.05% type IV Elastase (30). In order to assess the quality of the smooth muscle cell preparation, immunofluorescence staining with a monoclonal anti-mouse  $\alpha$ -smooth muscle actin antibody and a goat anti-mouse IgG coupled to Alexa-fluor 488 as secondary antibody was performed and revealed that 95 % of cells were positive for this specific biomarker.

### ***Isometric tension measurements***

Tension measurements were performed exactly as previously described (29, 30). A basal tension of 0.8 g was applied to each HPA ring. The pharmacologically induced contractile responses by specific agonists and eicosanoids were assessed on active tensions, using transducer systems coupled to Polyview software (Grass-Astro-Med Inc, West Warwick, RI) enabling to perform data acquisition and analysis. The amplitudes of maximum tensions were expressed for a given agonist concentration (1  $\mu$ M 5-HT, 1  $\mu$ M PDBu or 30 nM U-46619) normalized to the control response to 80 mM KCl, for each tested HPA ring.

### ***$\beta$ -Escin permeabilization and $Ca^{2+}$ sensitivity***

Arterial rings were mounted in organ baths to which a 0.8 g tension was applied. After measuring the contractile response elicited by 80 mM KCl in isosmotic Krebs solution, rings were incubated for 25 min in low  $Ca^{2+}$  relaxing solution (p $Ca^{2+}$  9) and permeabilized at 25°C with 50  $\mu$ M  $\beta$ -Escin. Tension developed by the permeabilized arterial rings was measured at 37°C according to free- $Ca^{2+}$  concentrations expressed in terms of pCa (pCa = -log [ $Ca^{2+}$ ]). Step increases in free  $Ca^{2+}$  (from pCa = 9.0 to 5.3) induced reproducible concentration response curves to free  $Ca^{2+}$  concentrations indicating successful permeabilization under these conditions. (30, 37)

### ***SDS-PAGE and Western blot analyses***

Western blots were performed using specific antibodies against CPI-17, phospho-CPI-17, TMEM16A, GPR32 and  $\beta$ -actin proteins. Blot immunostainings were revealed on Kodak film and digitized and analyzed using ImageJ software or Lab-Image software 2.7-2. (29)



***Drugs and chemical reagents***

RvD1, U-46619 and MK886 were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan). Serotonin (5-HT), IL-6 and Luteolin were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Endothelin-1, PDBu, Anti-CPI-17 and anti-phospho-CPI-17 were purchased from Cedarlane (Burlington, Ontario, Canada). TNF- $\alpha$  and Anti-TMEM16A were purchased from Abcam (Toronto, Ontario, Canada). MYPT-1 and P-MYPT-1 (phosphorylated form of MYPT-1 on Thr 696) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (California, United States). MAG-DHA and MAG-DPA were purified by SCF-Pharma (Rimouski, Quebec, Canada). DMEM/F-12 and penicillin-streptomycin were obtained from Gibco Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada).

***Data presentation and statistical analysis***

Results are expressed as means  $\pm$  SEM, with n indicating the number of rings for each set of experiments. Western blot analyses are expressed with n indicating the number of experiments. Statistical analyses were performed using a Student *t* test or one-way or two way ANOVA with Sigma Plot 12.0 and SPSS 14.0 software (SPSS-Science, Chicago, IL). Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$  (\*). EC<sub>50</sub> values were determined from data curve fittings performed with Sigma Plot 12.0 algorithm.

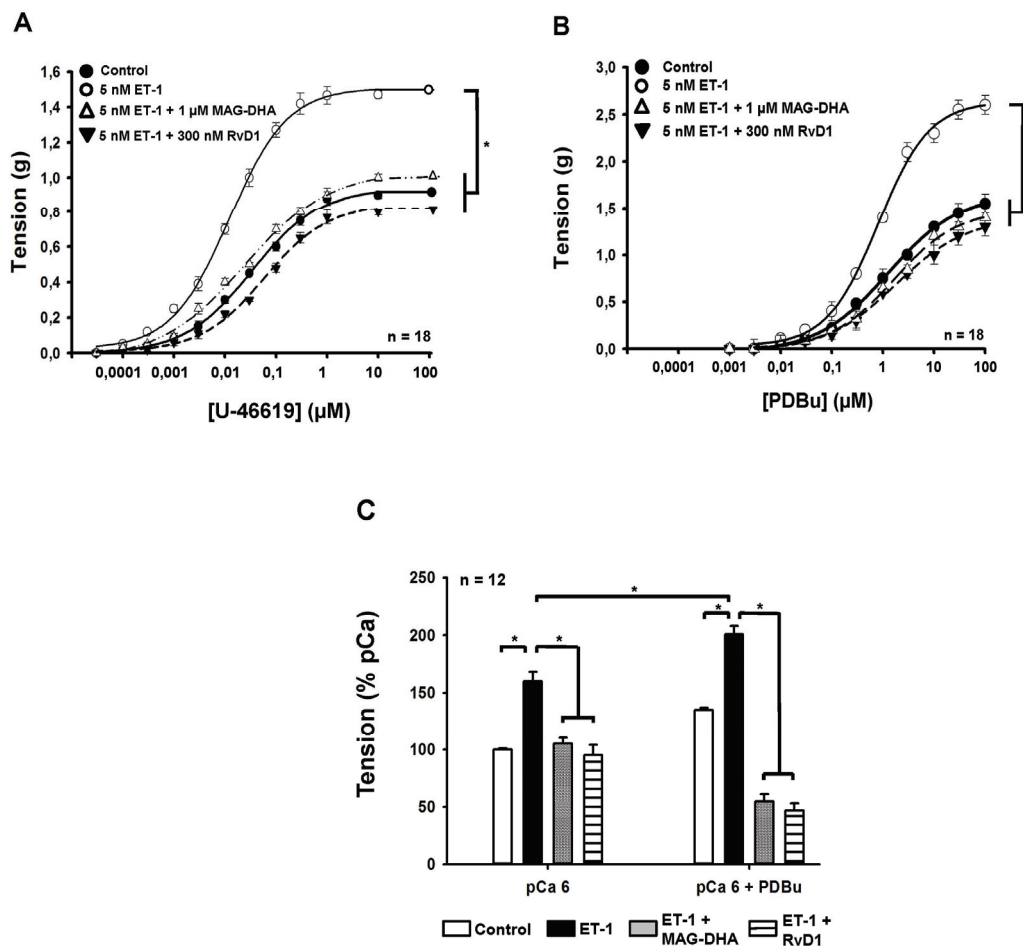
## RESULTS

### *Effects of MAG-DHA and RvD1 on Ca<sup>2+</sup> sensitivity and cumulative concentration-response curves to U-46619 and PDBu.*

Two major pathways have been demonstrated to play major roles as effectors on the contractile machinery: i) a GPCR-dependent signaling pathway that enhances contractility by increasing intracellular Ca<sup>2+</sup> release from IP<sub>3</sub>-dependent stores (21) and ii) a PKC-dependent CPI-17 pathway, which inactivates MLCP and modulates the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the contractile machinery in HPA smooth muscle cells (21). U-46619, a thromboxane A<sub>2</sub> analog which stimulates TP receptors, is a pharmacological agonist known to increase HPA tone. [Figure 2A](#) depicts the cumulative concentration-response curves (CCRC) to U-46619 in control and 5 nM ET-1-treated HPA in the absence or presence of either 300 nM RvD1 or 1 μM MAG-DHA. CCRC demonstrated that 24 h pre-treatment with 5 nM ET-1 induced a hyperresponsiveness to U-46619 with an apparent EC<sub>50</sub> value of 0.01 μM comparatively to 0.04 μM in control conditions. Conversely, treatment with 300 nM RvD1 or 1 μM MAG-DHA significantly reduced the induced reactivity with apparent EC<sub>50</sub> values of 0.05 μM and 0.03 μM, respectively.

CCRC to PDBu showed that, compared to control conditions, 24 h pretreatment with 5 nM ET-1 significantly increased the responsiveness to the PKC-activator ([Figure 2B](#)). However, 300 nM RvD1 or 1 μM MAG-DHA significantly reduced the concentration-dependent effect of PDBu on ET-1-pretreated tissues, returning mean tension to that of control values with apparent EC<sub>50</sub> values of 1.31, 1.33, 0.78 and 1.20 μM, respectively. These data suggest that both RvD1 and MAG-DHA modulate HPA hyperresponsiveness via inhibition of two complementary pathways controlling the contractile machinery in HPA.

The mean tonic response of  $\beta$ -escin-permeabilized explants to a single  $\text{Ca}^{2+}$  step from pCa 9.0 to pCa 6.0 was assessed in the absence and presence of PDBu under four independent experimental conditions. PDBu has in effect been used to stimulate the PKC/CPI-17 pathway in order to enhance tone. [Figure 2C](#) shows that 5 nM ET-pretreatment significantly increased the tension response to pCa 6 comparatively to control conditions. The addition of 1  $\mu\text{M}$  PDBu further enhanced the mean amplitude of the active tensions whereas 300 nM RvD1 or 1  $\mu\text{M}$  MAG-DHA normalized the responses to pCa 6. Moreover, in the presence of PDBu, RvD1 and MAG-DHA significantly decreased the tonic responses and had an inhibitory effect even in control conditions. Together, these results suggest that RvD1, as well as MAG-DHA treatments, impair  $\text{Ca}^{2+}$  reactivity via a PKC-dependent pathway.



**FIGURE 2: Effect of MAG-DHA and RvD1 on  $\text{Ca}^{2+}$  reactivity and on U-46619- and PDBu-induced tension in human pulmonary arteries.** (A) Cumulative concentration-response curve (CCRC) to U-46619 on HPA in Control (untreated) or pretreated with 5 nM ET-1 in the absence or presence of 1 μM MAG-DHA or 300 nM RvD1. (n = 18, \*  $p < 0.05$ ). (B) Cumulative concentration-response curve to PDBu on HPA either in Control (untreated) or pretreated with 5 nM ET-1 in the absence or presence of 1 μM MAG-DHA or 300 nM RvD1. (n = 18, \*  $p < 0.05$ ). (C) Contractile responses to  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization (pCa 6) in the presence or absence of 1 μM PDBu, under the same experimental conditions as described above. (n = 12, \*  $p < 0.05$ )

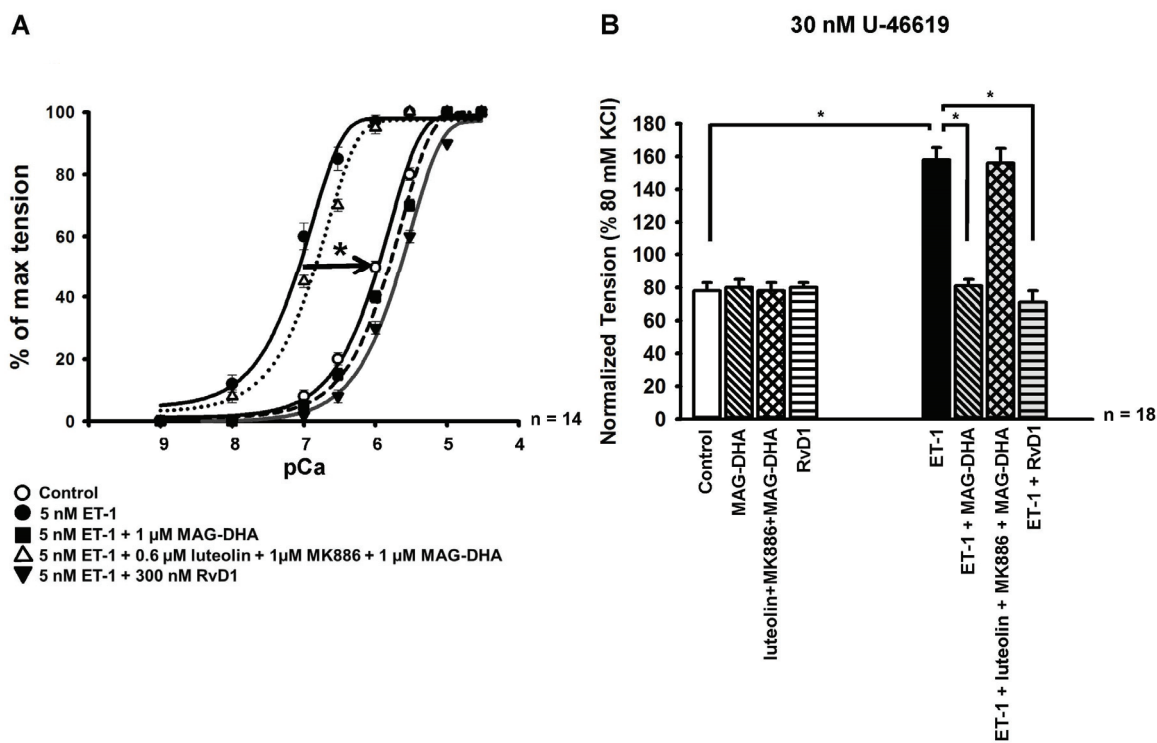
***Pro-resolving effect of MAG-DHA in absence of enzymatic inhibitors.***

Tension measurements were performed on  $\beta$ -escin-permeabilized preparations to assess the effect of RvD1 and MAG-DHA on  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity on ET-1-pretreated HPA. The  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of myofilaments was evaluated following 5 treatment conditions in permeabilized arteries as illustrated by the CCRC to free  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (Figure 3A).

Results revealed that 5 nM ET-1 treatment ( $\text{EC}_{50} = 0.08 \mu\text{M}$ ) induced hypersensitivity to free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration when compared to control conditions ( $\text{EC}_{50} = 1.02 \mu\text{M}$ ). In contrast, 5 nM ET-1 plus 300 nM RvD1 or 1  $\mu\text{M}$  MAG-DHA induced a shift in the half maximal effective concentration value toward higher  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations with  $\text{EC}_{50}$  values of 2.2 and 1.54  $\mu\text{M}$ , respectively, and thereby reduced  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity induced by ET-1-pretreatment. No significant differences were quantified in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity developed from control, 5 nM ET-1 + 300 nM RvD1 and 5 nM ET-1 + 1  $\mu\text{M}$  MAG-DHA-treated HPA. The combined treatment with 15-LOX and 5-LOX inhibitors (0.6  $\mu\text{M}$  luteolin and 1  $\mu\text{M}$  MK886, respectively) prevented the effect induced by 1  $\mu\text{M}$  MAG-DHA on  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of HPA with an  $\text{EC}_{50} = 0.13 \mu\text{M}$ . These results suggest that MAG-DHA is metabolized by lipoxygenase enzymes in mediating its regulatory effects on human pulmonary arterial tone.

Further experiments were performed to ascertain whether MAG-DHA needs to be metabolized in order to normalize the contractile responses in ET-1-pretreated HPA. Following various pretreatments, cultured HPA were stimulated with 30 nM U-46619 after which mean responses were compared (Figure 3B). ET-1 pretreatment had a significant effect on the mean contractile response when compared to control HPA. Of note, 1  $\mu\text{M}$  MAG-DHA and 300 nM RvD1 essentially exhibited similar inhibitory effects on the over-

reactivity triggered by 30 nM U-46619. However, the inhibitory effect of MAG-DHA was blunted in the presence of 0.6  $\mu$ M luteolin and 1  $\mu$ M MK886 (15-LOX and 5-LOX inhibitors, respectively). This result suggests that MAG-DHA must be metabolized in order to induce its inhibitory effects, which was further reproduced with a lower concentration of RvD1. Of interest, RvD1, MAG-DHA or MAG-DHA in the presence of luteolin and MK886 had no effect on the contractile response under control conditions (Fig. 3B).



**FIGURE 3: Normalizing effects of MAG-DHA and RvD1 on HPA reactivity.**

(A) CCRC to free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration steps on  $\beta$ -escin-permeabilized HPA following 24 h culture in untreated (Control) or pretreated with 5 nM ET-1 in the absence or presence of 1  $\mu\text{M}$  MAG-DHA or 300 nM RvD1 or 1  $\mu\text{M}$  MAG-DHA + 0.6  $\mu\text{M}$  luteolin + 1  $\mu\text{M}$  MK886. (n = 14, \*  $p < 0.05$ ).

(B) Bar graph displaying the mean contractile amplitudes induced by 30 nM U-46619 on 24 h cultured HPA either in absence (Control) or with 5 nM ET-1 alone or in the presence of 1  $\mu\text{M}$  MAG-DHA or 1  $\mu\text{M}$  MAG-DHA + 0.6  $\mu\text{M}$  luteolin + 1  $\mu\text{M}$  MK886 or 300 nM RvD1. Note that the effect of MAG-DHA was blunted in the presence of luteolin and MK886. (n = 18, \*  $p < 0.05$ )

***Effect of RvD1 on the pharmacological induced tone of HPA.***

The influence of RvD1 on the reactivity of HPA was assessed *in vitro* on cultured tissues under three specific conditions: HPA were cultured for 24 h either in control condition (untreated) or in the presence of 5 nM ET-1 or with 5 nM ET-1 + 300 nM RvD1. [Figures 4A and 4B](#) depict the normalized response to 80 mM KCl. Pretreatment with 5 nM ET-1 induced an over-reactivity which was abolished by 300 nM RvD1 treatment. [Figure 4C](#) shows that RvD1 had a similar effect upon acute stimulation with 1  $\mu$ M 5-hydroxytryptamine (5-HT). Lastly, the addition of 300 nM RvD1 significantly decreased the mean response induced by 5 nM ET-1 pretreatment ([Figure 4D](#)), leading to a normalized tone in response to 1  $\mu$ M 5-HT. Of note, regardless of the pharmacological stimulus used, RvD1 had basically no effect under control condition. Altogether, these data suggest that RvD1, a trihydroxylated derivative of DHA, was able to prevent the over-reactivity induced by KCl and 5-HT on ET-1-pretreated HPA.

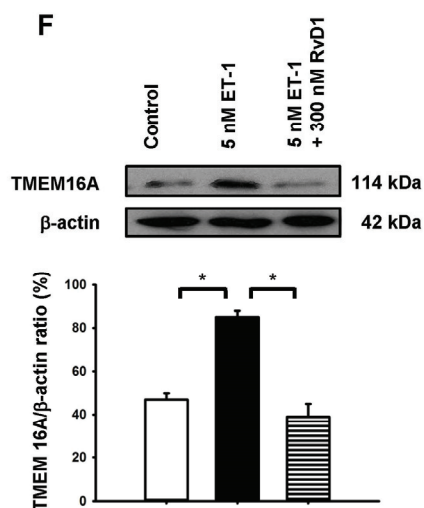
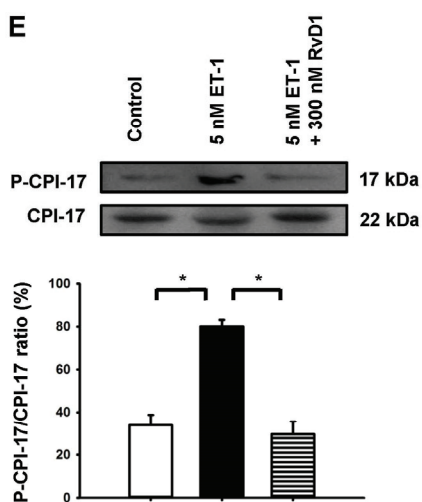
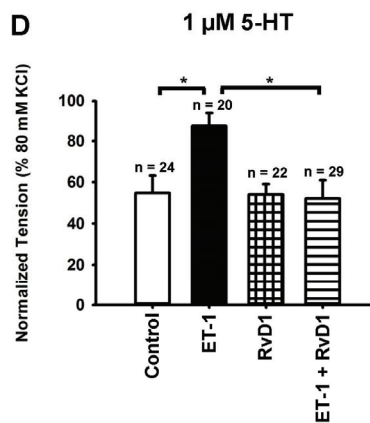
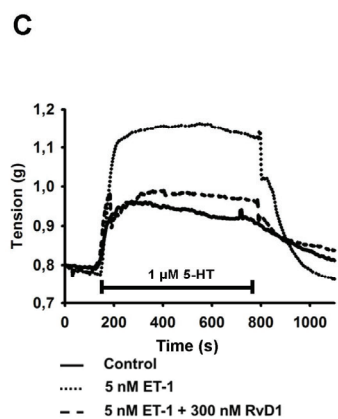
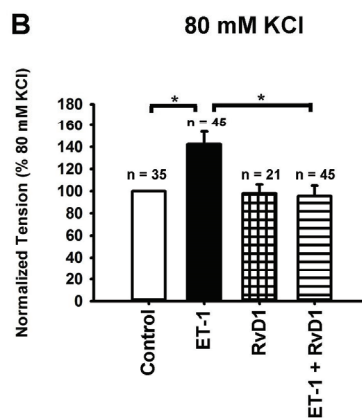
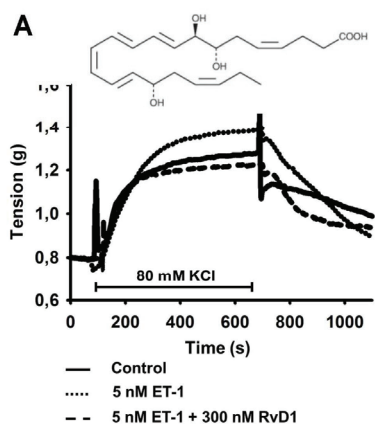
A well-known effector between PKC and the contractile machinery is the CPI-17 protein (16). Thus, the expression and phosphorylation of CPI-17 were assessed by Western blot analyses in PASM cell lysates under control and 5 nM ET-1 or 5 nM ET-1 + 300 nM RvD1 pretreated experimental conditions. [Figure 4E](#) demonstrates that 5 nM ET-1 significantly increased the phosphorylation of CPI-17 compared to control conditions. However, RvD1 significantly decreased CPI-17 phosphorylation compared to the level observed in 5 nM ET-1-treated HPA ([Figure 4C, lower panel](#)). Lastly, the activated state of CPI-17 has previously been shown to modulate the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of PASM cells (23).



Furthermore, TMEM16A, a calcium-dependant chloride channel reported to play an important role in enhancing tone of PASM cells, was assessed by Western blot analyses. **Figure 4F** shows that 5 nM ET-1 significantly increased the expression of TMEM16A compared to control while RvD1 reversed this ET-1-induced over-expression. Altogether, these results suggest that RvD1, whose anti-inflammatory effect has been established, also displays strong inhibitory effects on CPI-17 phosphorylation and TMEM16A expression, and thus could result in the lower reactivity of HPA upon ET-1 stimulation (26), a condition mimicking typical HPA hyperreactivity observed in severe PH.

**FIGURE 4: Effects of RvD1 on HPA in response to pharmacological-induced tone and on two putative effectors.** (A) Representative recordings of the contractile activity induced by 80 mM KCl and Resolvin D1 (RvD1) in the absence or presence of 5 nM ET-1. **The chemical structure of RvD1 is presented in the upper portion.** (B) Corresponding mean bar graph displaying the mean contractile amplitudes induced by 80 mM KCl either in Control (untreated) or following a 5 nM ET-1 pre-treatment in the absence or presence of 300 nM RvD1. (C) Typical recordings of the contractions induced by 1  $\mu$ M 5-HT on cultured HPA under the same experimental conditions. (D) Mean responses to 1  $\mu$ M 5-HT corresponding to experimental conditions as described above. (\*  $p < 0.05$ ) (E) Western blot analyses of phospho-CPI-17 / total CPI-17 ratio in assessing the putative effects of 5 nM ET-1 and 5 nM ET-1 + 300 nM RvD1 on PASM cell lysates in comparison to Control conditions. (n = 9, \*  $p < 0.05$ ). (F) Western blot analyses using TMEM16A antibodies. The densities of the immunoreactive bands are expressed as a function of the b-actin immunoreactive band. (n = 9, \*  $p < 0.05$ )

  
*S'il vous plait, voir la figure correspondante à la page suivante.*

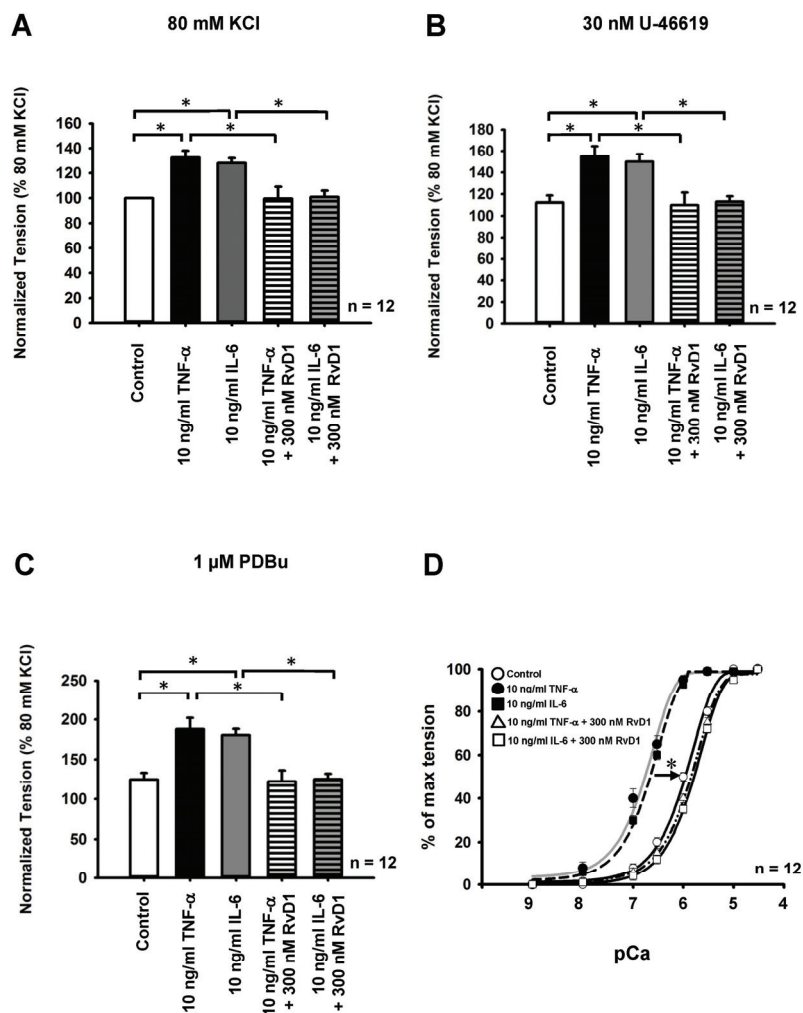


***Inhibitory effect of RvD1 on TNF- $\alpha$  and IL-6-pretreated HPA.***

To assess whether a pro-inflammatory condition may lead to HPA over-reactivity, tissue sections were treated under various experimental conditions in which pharmaco-mechanical properties were measured as previously assessed on human bronchi (29). HPA were cultured for 24 h, either in control condition (untreated) or in the presence of 10 ng/ml TNF- $\alpha$  or 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 300 nM RvD1; or in the presence of 10 ng/ml IL-6 or 10 ng/ml IL-6 + 300 nM RvD1. [Figure 5A](#) displays the normalized response to 80 mM KCl. Compared to control conditions, pre-treatment with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  or 10 ng/ml IL-6 induced a significant over-reactivity, as revealed by an approximate 35% increase in mean amplitude of the contractile response. Despite the presence of TNF $\alpha$  or IL-6, 300 nM RvD1 treatments abolished this over-reactivity, leading to a normalized tension. [Figures 5B](#) shows the mean responses to acute stimulation with 30 nM U-46619 on cultured HPA. Compared to control conditions, TNF- $\alpha$  and IL-6 (10 ng/ml) consistently induced an over-reactivity (+ 47%) whereas, in contrast, 300 nM RvD1 abolished the over-reactivity induced by U-46619 on TNF- $\alpha$ - and IL-6-pretreated HPA. [Figure 5C](#) displays a similar effect upon acute stimulation with 1  $\mu$ M PDBu. Compared to control conditions, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  and 10 ng/ml IL-6 pre-treatments significantly increased (+ 52%) the mean contractile response to acute stimulus whereas 300 nM RvD1 treatments significantly decreased the mean response induced by 1  $\mu$ M PDBu. Given the results obtained with PDBu, we furthermore assessed the putative change in Ca<sup>2+</sup> sensitivity.

[Figure 5D](#) displays the CCRC to free Ca<sup>2+</sup> concentrations in control, 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 300 nM RvD1 and 10 ng/ml IL-6 + 300 nM RvD1. Results demonstrate that TNF- $\alpha$  and IL-6 pretreatment increased HPA Ca<sup>2+</sup> sensitivity when

compared to control (with EC<sub>50</sub> values of 0.18 μM, 0.2 μM and 1.08 μM, respectively), while RvD1 reduced the Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by TNF-α and IL-6 pretreatment with an apparent EC<sub>50</sub> of 1.40 μM, a value in proximity to the EC<sub>50</sub> observed in control conditions. Altogether, these data suggest that RvD1 was able to prevent the over-reactivity and the Ca<sup>2+</sup> hypersensitivity triggered by TNFα on cultured HPA.



**FIGURE 5: Effect of RvD1 on TNF- $\alpha$  and IL-6-induced reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity in human pulmonary arteries.** (A) Bar graph of the contractile activity induced by 80 mM KCl on 24 h cultured HPA in Control (untreated) or following 10 ng/ml TNF- $\alpha$  or 10 ng/ml IL-6 pre-treatments in the absence or presence of 300 nM RvD1 ( $n = 12$ , \*  $p < 0.05$ ). (B) Bar graph displaying the mean contractile amplitudes induced by 30 nM U-46619 on 24 h cultured HPA either in Control, or with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  or IL-6, in the absence or presence of 300 nM RvD1 ( $n = 12$ , \*  $p < 0.05$ ). (C) Bar graph displaying the mean contractile amplitudes induced by 1  $\mu$ M PDBu on HPA under the same experimental conditions as described above ( $n = 12$ , \*  $p < 0.05$ ). (D) CCRC to free Ca<sup>2+</sup> concentrations on b-escin-permeabilized cultured HPA under the same experimental conditions. Note that TNF- $\alpha$  and IL-6 pretreatments consistently increased the Ca<sup>2+</sup> sensitivity (dark circles and dark square respectively), which was abolished by the combined addition of TNF- $\alpha$  and RvD1 (white triangles) or IL-6 and RvD1 (white squares). RvD1 also normalized the Ca<sup>2+</sup> sensitivity with an EC<sub>50</sub> value close to that recorded in Control conditions (open circles) ( $n = 12$ , \*  $p < 0.05$ ).

***Effect of MAG-DPA on human pulmonary artery active tone.***

The above results provide evidence of the positive impact of the MAG-DHA metabolite, RvD1, to reverse hyperreactivity in HPA. Recently, a novel monoglyceride with a molecular structure similar to MAG-DHA has been synthesized and its properties investigated in an *in vivo* rat model of PH (26). The following series of experiments was designed to delineate the effects of this docosapentaenoic acid (22:5n-3) monoglyceride (MAG-DPA), a long-chain n-3 PUFA presumed to yield pro-resolving molecules, on the over-reactivity induced by ET-1 (43) in response to various pharmacological agents.

In [Figure 6A](#), HPA were challenged with 5-nM ET-1 or 5-nM ET-1 + 1  $\mu$ M MAG-DPA in the presence of 1  $\mu$ M 5-HT. HPA responses confirm that ET-1 treatment induced a larger response than control (untreated) while the mean contractile responses were reduced upon combined ET-1 + MAG-DPA treatment.

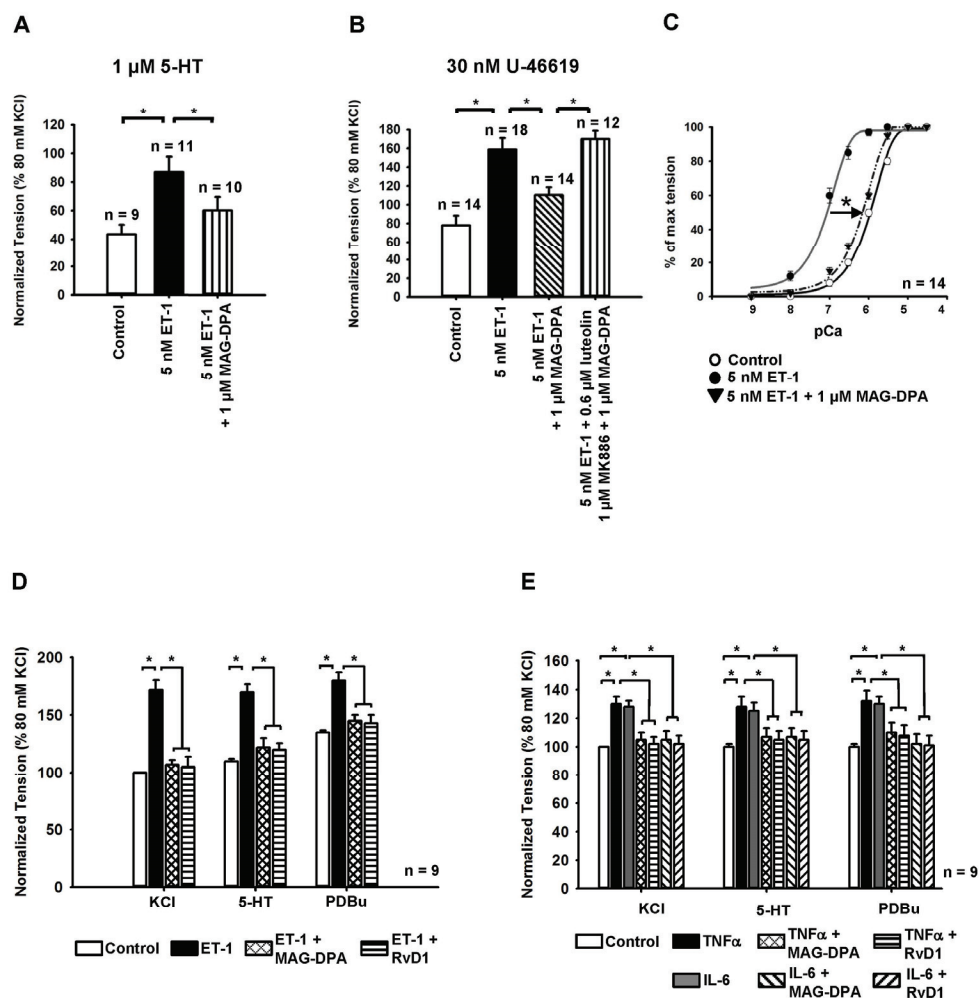
Twenty-four hour treatment with 5 nM ET-1 induced a consistent over-reactivity to 30 nM U-46619 ([Figure 6B](#)) while 1  $\mu$ M MAG-DPA treatment significantly disrupted the effect of ET-1 and maintained the agonist-induced tone to that of normal tension values. These results are consistent with the previously reported effects of MAG-DPA on carcinoma cells as well as in a rat model of PH (26, 27). Of note, combined treatment with 5 nM ET-1, 0.6  $\mu$ M luteolin and 1  $\mu$ M MK886 in the presence of 1  $\mu$ M MAG-DPA abolished the effect of the MAG-compound on the U-46619 tonic response.

The relative sensitivity of the myofilaments to  $\text{Ca}^{2+}$  was also quantified on  $\beta$ -escin-permeabilized HPA under the same experimental conditions. [Figure 6C](#) displays the CCRC to free  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in control, 5 nM ET-1 and 5 nM ET-1 + 1 $\mu$ M MAG-DPA.

Results demonstrate that ET-1 pretreatment increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity when compared to controls (with  $\text{EC}_{50} = 0.08 \mu\text{M}$  and  $1.08 \mu\text{M}$ , respectively), while MAG-DPA reduced the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity induced by ET-1 pretreatment on HPA tissues with an apparent  $\text{EC}_{50}$  value of  $0.63 \mu\text{M}$ , a value near the  $\text{EC}_{50}$  recorded in control conditions.

To test the potential curative effects of MAG-DPA and RvD1 on pre-established hyperreactivity, HPA were first treated in the absence (control) or presence of  $5 \text{ nM}$  ET-1, followed by treatment 12 hours later with a combination of  $5 \text{ nM}$  ET-1 +  $1 \mu\text{M}$  MAG-DPA or  $5 \text{ nM}$  ET-1 +  $300 \text{ nM}$  RvD1 during 12 h (Figure 6D). Comparatively to controls, ET-1 treatment significantly increased the reactivity in response to  $80 \text{ mM}$  KCl,  $1 \mu\text{M}$  5-HT and  $1 \mu\text{M}$  PDBu. However, delayed treatment with  $1 \mu\text{M}$  MAG-DPA or  $300 \text{ nM}$  RvD1 was able to significantly reverse this over-reactivity and maintain the agonist-induced tone near that of normal tension values.

The same treatment design was performed under pro-inflammatory conditions (Figure 6E), where HPA were first treated with  $10 \text{ ng/ml}$   $\text{TNF}\alpha$  or  $10 \text{ ng/ml}$  IL-6 and treated 12 h later with  $10 \text{ ng/ml}$   $\text{TNF}\alpha$  (or  $10 \text{ ng/ml}$  IL-6) +  $1 \mu\text{M}$  MAG-DPA or with  $10 \text{ ng/ml}$   $\text{TNF}\alpha$  (or  $10 \text{ ng/ml}$  IL-6) +  $300 \text{ nM}$  RvD1. Comparatively to controls,  $\text{TNF}\alpha$  and IL-6 treatment induced a significant increase in reactivity in response to  $80 \text{ mM}$  KCl,  $1 \mu\text{M}$  5-HT and  $1 \mu\text{M}$  PDBu. However, a 12 h treatment with  $1 \mu\text{M}$  MAG-DPA or  $300 \text{ nM}$  RvD1 was sufficient to significantly reverse the observed over-reactivity and reestablish normal agonist-induced tone values.



**FIGURE 6: Effect of MAG-DPA on active tone of human pulmonary arteries.**

(A) Bar graph of the contraction induced by 1 μM 5-HT on 24 h cultured human pulmonary arteries in Control (untreated) condition, or following 5 nM ET-1 pre-treatment in the absence or presence of 1 μM MAG-DPA. (\* $p < 0.05$ ) (B) Bar graph displaying the mean contractile amplitudes induced by 30 nM U-46619 on 24 h cultured HPA either in Control conditions or with 5 nM ET-1 in the absence or presence of 1 μM MAG-DPA or 1 μM MAG-DPA + 0.6 μM luteolin + 1 μM MK886. (\* $p < 0.05$ ). (C) CCRC to free  $\text{Ca}^{2+}$  steps on  $\beta$ -escin-permeabilized cultured HPA either in Control or pre-treated with 5 nM ET-1 in the absence or presence of 1 μM MAG-DPA. Note the increase in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity by ET-1 pretreatment (dark circles), which was abolished following the combined addition of ET-1 and MAG-DPA (dark triangles). (n = 14, \*  $p < 0.05$ ). (D) Bar graph displaying the mean contractile amplitudes induced by 80 mM KCl, 1 μM 5-HT and 1 μM PDBu on HPA cultured either in absence (Control) or with 5 nM ET-1 alone during 12 h and then cultured for an additional 12 h in the presence of 5 nM ET-1 + 1 μM MAG-DPA or 5 nM ET-1 + 300 nM RvD1. (n = 9, \*  $p < 0.05$ ). (E) Bar graph of the contraction induced by 80 mM KCl, 1 μM 5-HT and 1 μM PDBu on HPA cultured either in absence (Control) or presence of 10 ng/ml TNFα or 10 ng/ml IL-6 alone during 12 h and then cultured for an additional 12 h in the presence of 10 ng/ml TNFα (or 10 ng/ml IL-6) + 1 μM MAG-DPA or 10 ng/ml TNFα (or 10 ng/ml IL-6) + 300 nM RvD1. (n = 9, \*  $p < 0.05$ )



***Detection of TMEM16A, of phospho-CPI-17 and of phospho-MYPT-1 expression under MAG-DPA treatments.***

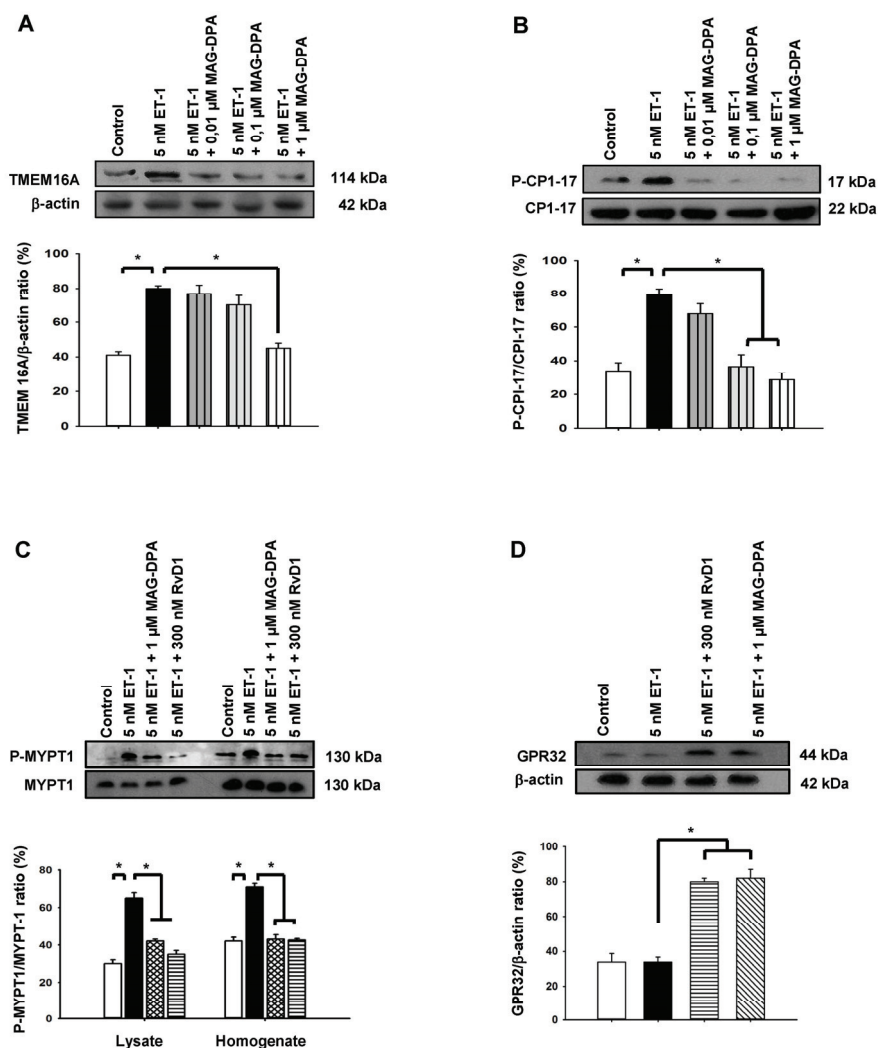
Western blot analyses were performed to assess whether or not MAG-DPA was able to down regulate the surface membrane biomarker TMEM16A in PASM cell lysates, under control or pretreated experimental conditions with either 5 nM ET-1, 5 nM ET-1 + 0.01  $\mu$ M MAG-DPA, 5 nM ET-1 + 0.1  $\mu$ M MAG-DPA or 5 nM ET-1 + 1  $\mu$ M MAG-DPA (Figure 7A). Results show that, compared to controls, 5 nM ET-1 significantly increased the staining of a specific immunoreactive band consistent with the relative molecular weight of TMEM16A (114 kDa), whereas 1  $\mu$ M MAG-DPA incurred a significant inhibition of this up-regulation induced by ET-1 pretreatment. CPI-17 phosphorylation in PASM cell lysates was also detected under the same experimental conditions (Figure 7B). Quantitative results suggest that MAG-DPA induced a concentration-dependent decrease in phospho-CPI-17/total CPI-17 ratio, as compared to the enhanced ratio detected upon 5nM ET-1 treatment.

The final step of all the convergent pathways that lead to the contraction of smooth muscle cells is the phosphorylation of the myosin light chain (MLC). The phosphorylation levels of the MLC were therefore tested under hyper-reactive conditions as well as under the influence of MAG-DPA and RvD1. Western blot analyses were performed on PASM cell lysates and HPA homogenates in order to detect the phosphorylated myosin phosphatase target subunit 1 (P-MYPT-1) which is the myosin-binding subunit of myosin light chain phosphatase (Figure 7C). Results revealed that 5 nM ET-1 significantly increased the level of P-MYPT-1/MYPT-1 ratio, whereas 1  $\mu$ M MAG-DPA or 300 nM RvD1 reversed the effect of ET-1 treatment.

Altogether, these data indicate that submicromolar concentrations of MAG-DPA exhibit strong inhibitory effects on the hyperreactivity and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity induced by ET-1. Furthermore, results suggest that these functional effects are likely mediated by a metabolic byproduct since in the presence of the enzymatic inhibitors 5-LOX and 15-LOX, the same concentration of MAG-DPA was no longer effective as shown above in Figure 6B. Given the comparable structures of MAG-DPA and MAG-DHA, it could be suggested that this MAG-DPA effector metabolite is also a RvD1-like product, of which potential applications remain to be determined.

#### ***Detection of the RvD1 receptor GPR32***

Lastly, Western blot analyses performed on lysate preparations of PASM cell cultures following pharmacological pretreatments (Figure 7D) demonstrated that a 24 h pretreatment with 5 nM ET-1 did not significantly modulate the expression of GPR32. However, 300 nM RvD1 and 1  $\mu\text{M}$  MAG-DPA significantly enhanced the detection and membrane expression of GPR32 as shown in Figure 7D (right lanes).



**FIGURE 7: Detection of TMEM16A, phospho-CPI-17, phosphor-MYPT-1 and GPR32 receptor.**

(A) TMEM16A immunoreactive bands (114 kDa) in cell lysates were expressed as the relative TMEM16A/ $\beta$ -actin ratio under control condition or 5 nM ET-1 or 5 nM ET-1 in the presence of increasing concentrations of MAG-DPA (0.01 to 1  $\mu$ M). (n = 9, \*  $p$  < 0.05). (B) Western blot analyses were performed using antibodies against phospho-CPI-17 and total CPI-17. The relative density ratio of P-CPI-17/total CPI-17 was used to quantify the comparative effects of increasing concentrations of MAG-DPA (0.01 to 1  $\mu$ M). (n = 9, \*  $p$  < 0.05). (C) Western blot analyses were performed using antibodies against phospho-MYPT-1 and total MYPT-1. The relative density ratio P-MYPT-1/MYPT-1 was used to quantify the effects of 1  $\mu$ M MAG-DPA and 300 nM RvD1 on 5 nM ET-1 treatment in cell lysates and HPA homogenates. (n = 6, \*  $p$  < 0.05) (D) Western blot analyses using specific antibodies against the GPR32 receptor and  $\beta$ -actin. The immunoreactive bands as well as the calculated density ratio attest to the presence of the GPR32 receptor in PASM cells. (n = 6, \*  $p$  < 0.05)

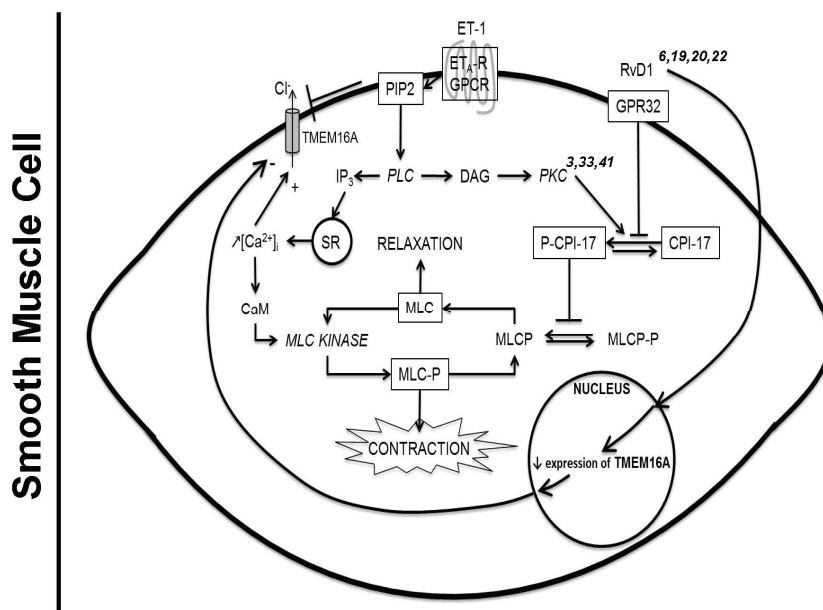
## DISCUSSION

Herein, we investigated the ability of RvD1 and its precursors to reverse the over-reactivity and enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity triggered by ET-1,  $\text{TNF}\alpha$  and IL-6 pre-treatments on smooth muscle cells in a human model of organ cultured pulmonary arteries. The n3-PUFA trihydroxyl-derivative is well known for its anti-inflammatory and pro-resolving properties in blood cells and bronchi (38, 39). Given that we wanted to address the putative role of inflammation in pulmonary arteries, we therefore decided to challenge HPA with either nanomolar concentrations of ET-1,  $\text{TNF}\alpha$  or IL-6 and to test the contractile responses in the absence and presence of RvD1 or its MAG precursors.

### *RvD1 and MAG compounds reverse the over-reactivity induced by ET-1 in HPA*

ET-1 has previously been shown to be over-expressed and released in the lung of patients with pulmonary hypertension (9) due to endothelial dysfunctions. Upon binding to its receptor, ET-1 activates phospholipase C (PLC) which hydrolyses  $\text{PIP}_2$  into  $\text{IP}_3$  and DAG.  $\text{IP}_3$  activates the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from endoplasmic reticulum stores while DAG is reported to activate protein kinase C (PKC), which in turn phosphorylates CPI-17 (Figure 8). The latter has also been shown to inactivate MLCP through phosphorylation of MYPT-1, its catalytic subunit (27). A third pathway, which is activated by the ET-1 receptor, is the RhoA/ROCK pathway (44). This specific pathway is recognized to phosphorylate CPI-17, which in turn phosphorylates and inactivates the catalytic subunit of the MLCP (16 and Fig. 8). These regulatory pathways result in an increased contractile reactivity and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity. Nevertheless, the pharmacological options for PH treatment remain limited despite the recent use of endothelin-1 receptor antagonists (10). In the present study, RvD1

was found to abolish the hyperresponsiveness induced by short-term (24 h) ET-1 pretreatment of HPA explants. Indeed, in the presence of submicromolar concentrations of RvD1, the contractile responses to pharmacological agonists such as Serotonin (5-HT) and U-46619 were maintained near the level recorded under control conditions (cultured and untreated HPA). The present data also show that treatment with MAG-DHA or MAG-DPA resulted in a consistent inhibition of the pharmacological responses enhanced by ET-1, thus confirming that, among others, micromolar concentrations of Resolvin precursors were also able to induce a similar effect. In contrast, these effects were abolished in the presence of 5 LOX and 15 LOX inhibitors, thus confirming that both MAG compounds had to be metabolized in order to generate significant effects on HPA. These observations are consistent with other reports along these lines of evidence (27).



**FIGURE 8: Schematic diagram of the molecular and cellular events summarizing the inhibitory effect of RvD1 on active arterial tone and Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by the activation of ET-1 receptors in a virtual pulmonary artery smooth muscle cell.** This scheme is consistent with the data reported in the present work and in the following references (3, 6, 15, 19, 20, 22, 33 and 41).

***Change in Ca<sup>2+</sup> sensitivity***

Ca<sup>2+</sup> sensitizing mechanisms are also primed under pathophysiological conditions, with ET-1 previously shown to largely enhance the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of myofilaments in smooth muscle cells, including PASM cells (23). This increase in Ca<sup>2+</sup> sensitivity is transduced into an amplified contractility in each PASM cell leading to a stronger tone in HPA. A better understanding of the modulation of the Ca<sup>2+</sup> sensitivity is thus of key interest in pulmonary hypertension, a disease marked by an increased tonicity of the artery wall. Control and reversal of this Ca<sup>2+</sup> sensitivity would therefore represent a non-negligible benefit in the treatment of this type of anomaly. In the present study, RvD1 considerably reduced the Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by ET-1, thereby suggesting that the activation of GPR32 (RvD1 receptor) results in a strong modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. The present data also demonstrate that submicromolar concentrations of MAG-DPA were also able to reverse the hyper Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by ET-1 on human pulmonary arteries *in vitro*, implying the perspective that one or more Resolvin-type metabolites from MAG-DPA could exert this beneficial effect.

***RvD1 abolishes the resulting effects induced by pro-inflammatory conditions.***

The effect of TNF- $\alpha$  and IL-6 pretreatments on pharmacological reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity was also investigated on human pulmonary arteries in order to further assess the putative effects of RvD1. The present findings demonstrate that a pro-inflammatory status, induced by TNF- $\alpha$  or IL-6 treatment, enhanced the reactivity and the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile machinery regardless of the agonist used. Inflammation has indeed been shown to be one of the critical events in the genesis of pulmonary hypertension (42).

Accordingly, patients treated with anti-inflammatory medications present notable improvement, although very little is known regarding the mechanisms involved. Of significant interest herein is the demonstration that a low concentration of TNF- $\alpha$  or IL-6 consistently induced an increase in arterial tone, as well as a log-shift in Ca<sup>2+</sup> sensitivity. Both effects were abolished by 300 nM RvD1 despite the presence of TNF- $\alpha$  or IL-6, strongly suggesting a complete resolution of the molecular events related to the pro-inflammatory condition.

#### ***Mode of action of RvD1 on smooth muscle cells***

Our data also suggest that RvD1 displays its effects through a decrease in the activation level of the CPI-17 regulatory protein (lower phosphorylation state), which was also targeted by MAG-DHA and MAG-DPA in independent sets of experiments, as reported above.

The ability of RvD1 to decrease the responses to PDBu as well as the data obtained from Western blot analyses attest that the PKC-CPI-17 pathway was likely involved in the down regulation of the isotonic reactivity of HPA smooth muscle myofilaments.

Hence this mode of action, which has previously been delineated in airway smooth muscle cells and HPA tissues, therefore opposed the sensitizing effects of IL-6, TNF- $\alpha$  (29) and ET-1 (34). The PKC-CPI-17 pathway directly impacts and regulates the contractile machinery, due to an observed higher dephosphorylation rate of the Myosin Light Chain (MLC) when the level of CPI-17 phosphorylation is low (16). These events are translated into a significant decrease in HPA tension.

These results further suggest that RvD1 decreases both the pharmacological responsiveness as well as  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of HPA. Moreover, the current data are consistent with a previous report demonstrating that DHA was able to decrease VEGF production as well as CPI-17, MYPT-1 and ERK1/2 phosphorylation levels in HPA, which clearly opposed ET-1 effects (24). According to current knowledge, a change in MYPT-1 phosphorylation is likely to modulate tension, while a lower ERK1/2 phosphorylation level is related to a lower proliferation rate (15).

***RvD1 and MAG-DPA normalize the expression of TMEM16A***

The  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel TMEM16A has been proposed to be a biomarker of PH, since its expression and activity is up-regulated in this disorder (11). Taking into account the role of TMEM16A, we endeavored to identify a cascade of events, which could lead to PH.  $\text{PIP}_2$  has recently been shown to be an inhibitor of TMEM16A (35). When  $\text{PIP}_2$  is hydrolyzed as a result of activation of GPCR by specific agonists such as ET-1, there is an increase in tone. There is also a concomitant down-regulation of TMEM16A due to a decrease in  $\text{PIP}_2$  in the internal membrane leaflet (35). Under these conditions, TMEM16A would nevertheless be more active, because of the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  induced by  $\text{IP}_3$  from the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores.

Enhanced cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations would activate TMEM16A; the ensuing higher open probability of  $\text{Cl}^-$  channels would increase the anionic membrane conductance and facilitate membrane depolarization (2).

Depolarized cell membrane would in turn activate voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VDCC) allowing  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the smooth muscle cell thus resulting in tone increase. Even a slight increase in  $\text{Ca}^{2+}$  flux would likely increase tone due to the concomitant



increases in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in this *in vitro* model. Interestingly, our findings show that RvD1 decreased the level of TMEM16A expression initially enhanced by ET-1 pretreatment. According to our data, we propose that RvD1 plays an indirect inhibitory role on the expression of this channel protein, although it does not necessarily modify its activation. Hence, Resolvin treatments could result in putative antihypertensive effects. These observations warrant further study to assess the putative electrophysiological effects of RvD1.

Thus, synthetic compounds such as MAG-DHA and MAG-DPA are of potential interest as biochemical precursors of low cytotoxicity, with the ability to produce Resolvins of the D series (Fig. 1) and thereby neutralize or minimize the inflammatory component and over-reactivity developed by HPA under pathophysiological conditions.

### ***Limitations***

The present study was performed *in vitro* on pulmonary arteries from control patients which did not present disease and from which the PH profile (inflamed and hyperreactive vessels) was pharmacologically induced. This is viewed as a relative limitation since this study could not be performed on tissues from patients with PH given that lobectomy on PH patients is not a recommended procedure.

Despite the previous reports by the group of Serhan (39), we did not assess the effects of RvD1 on the expression of specific miRNA in HPA tissues, and is therefore a limitation of the present study. Indeed, miR-204 was recently demonstrated to be involved in the proliferative and anti-apoptotic phenotype of pulmonary artery smooth muscle cells (7).

In conclusion, we report herein the first evidence that RvD1 is a potent modulator of triggered pharmacological responsiveness in HPA *in vitro*. This biological agent and its precursors were able to reduce Ca<sup>2+</sup> sensitivity in HPA smooth muscle cells, likely via a reduction in phosphorylation levels of the CPI-17 protein and a negative regulation of MLCP. RvD1 also decreased the expression of TMEM16A, a specific marker of pulmonary hypertension. Altogether, these data provide new insights into the modulating effects and pro-resolving properties potentially occurring within the pulmonary artery wall. Resolvin D1 and its receptor may therefore represent new prospective and protective clinical targets in countering the over-reactivity of inflammatory components in human pulmonary hypertension.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Mr. Pierre Pothier for critical review of the manuscript. This work was supported by a grant from the Heart and Stroke Foundation of Canada/Quebec to Eric Rousseau and Caroline Morin. Roddy Hiram is the recipient of a studentship from the Health Respiratory Training Program of Quebec supported by the CIHR.

#### **CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT:**

The authors have declared no conflicts of interests. Samuel Fortin is the owner of SCF Pharma, which has an exclusive worldwide license of the patented compositions and uses of MAG-DHA and MAG-DPA.

**REFERENCES**

1. **Arnold C, Markovic M, Blossey K, Wallukat G, Fisher R, Dechend R, Konkel A, Von Schaky C, Luft C. F, Muller D. N, Rothe M, Schunk W-H.** Arachidonic acid-metabolizing cytochrome P450 enzymes are targets of  $\omega$ -3 fatty acids. *The journal of biological chemistry*. 285: 32720-32733, 2010
2. **Bulley S, Neeb ZP, Burris SK, Bannister JP, Thomas-Gatewood CM, Jangsangthong W, Jaggar JH.** TMEM16A/ANO1 channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries. *Circ Res*. 111(8): 1027-1036, 2012
3. **Braun U.M, Szalai P, Strasser R. H, Borst M. M.** Right ventricular hypertrophy and apoptosis after pulmonary artery banding: regulation of PKC isozymes. *Cardiovasc Res*. 59(3):658-67, 2013
4. **Calder C. P.** n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and inflammatory diseases. *The American Journal of clinical nutrition*. 83: 1505-1519, 2003
5. **Chen YF, Oparil S.** Endothelin and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 35: 49-53, 2000
6. **Clària J, Dalli J, Yacoubian S, Gao F, Serhan CN.** Resolvin D1 and Resolvin D2 Govern Local Inflammatory Tone in Obese Fat. *J Immunol*. 189(5):2597-605; 2012
7. **Courboulin A, Paulin R, Giguere N, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet E, Biardel S, Provencher S, Cote J, Simard M, Bonnet S.** Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med*. 208(3):535-548, 2011
8. **Fredmann G, Serhan C. N.** Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution *Biochem J*. 437: 185–197, 2011

9. **Galié N, Manes A, Branzi A.** The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res.* 61(2): 227-237, 2004
10. **Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE.** Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *Journal of Hypertension.* 20(8): 1493-1499, 2002
11. **Gray M. A, Winpenny J.P.** The anoctamin (TMEM16) gene family: calcium-activated chloride channels come of age. *Exp Physiol.* 97: 175-176, 2012
12. **Guibert C, Savineau J. P, Crevel H, Marthan R, Rousseau E.** Effect of short-term organoid culture on the pharmaco-mechanical properties of rat extra- and intrapulmonary arteries. *Br J Pharmacology.* 146: 692-701, 2005
13. **Haworth, O, Cernadas, M, Yang, R, Serhan, CN, Levy, BD.** Resolvin E1 regulates interleukin-23, interferon-g and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nature Immunology.* 8: 873-879, 2008
14. **Hoepfer M. M.** The new definition of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal.* 34: 790-791, 2009
15. **Humbert M, Morell NW, Archer SL, Stenmark KR, Maclean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M.** Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 43: 13S-24S, 2004
16. **Kitazawa T, Eto M, Woodsome T. P, Brautigan L. D.** Agonists Trigger G Protein-mediated Activation of the CPI-17 Inhibitor Phosphoprotein of Myosin Light Chain Phosphatase to Enhance Vascular Smooth Muscle Contractility. *J Bio Chem.* 275:9897-9900, 2000

17. **Kohli P, Levy B. D.** Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 158: 960-971, 2009
18. **Laura C. Price; S. John Wort; Frédéric Perros; Peter Dorfmueller; Alice Huertas; David Montani; Sylvia Cohen-Kaminsky; Marc Humbert.** Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest journal*. 141(1): 210-221, 2012
19. **Chong Hoon L.** Resolvins as new fascinating drug candidates for inflammatory diseases. *Arch Pharm Res*. Vol 35, No 1, 3-7, 2012
20. **Lee HJ, Park MK, Lee EJ, Lee CH.** Resolvin D1 inhibits TGF- $\beta$ 1-induced epithelial mesenchymal transition of A549 lung cancer cells via lipoxin A4 receptor/formyl peptide receptor 2 and GPR32. *Int J Biochem Cell Biol*. 45(12):2801-7, 2013
21. **Makhlouf G. M.** Ca<sup>2+</sup> release and contraction induced by IP3 and contractile agonists in mammalian gastric smooth muscle. *Molecular Cell and Biochemistry Journal*. 82: 137-143, 1988
22. **Spite M, Serhan C. N.** Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circ Res*. 107(10): 1170-1184, 2010
23. **Morin C, Fortin S, Rousseau E.** 19,20-EpDPE, a bioactive CYP450 metabolite of DHA monoacylglyceride, decreases Ca<sup>2+</sup> sensitivity in human pulmonary arteries. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 301:H1311-H1318, 2011
24. **Morin C, Fortin S, Rousseau E.** Docosahexaenoic Acid Monoacylglyceride Decreases Endothelin-1 Induced Ca<sup>2+</sup> Sensitivity and Proliferation in Human Pulmonary Arteries. *Am J Hypertens*. 7: 757-763, 2012
25. **Morin C, Guilbert C, Sirois M, Echave V, Gomes M. M, Rousseau E.** Effects of w-hydroxylase product on distal human pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294: 1435-1443, 2008

26. **Morin C, Hiram R, Rousseau E, Blier P, Fortin S.** Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Heart and Circulatory Physiology*. DOI: 10.1152/ajpheart.00814.2013, 14 June 2014
27. **Morin C, Rousseau E, Fortin S.** Anti-proliferative effects of a new docosapentaenoic acid monoacylglyceride in colorectal carcinoma cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 89(4): 203-213, 2013
28. **Morin C, Sirois M, Echave V, Albadine R, Rousseau E.** 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets PPARgamma and p38 mitogen-activated protein kinase to mediate its anti-inflammatory effects in the lung: role of soluble epoxide hydrolase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 43: 564-575, 2010
29. **Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes M. M, Rousseau E.** EET displays anti-inflammatory effects in TNF-alpha stimulated human bronchi: putative role of CPI-17. *American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology*. 38(2):192-201, 2009
30. **Morin C, Sirois M, Echave V, Rizcallah E, Rousseau E.** Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *American Journal of Physiology*. 296: L130-L139, 2009
31. **Mozaffarian D, Wu JH.** Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*. 58 (20): 2047-2046, 2011
32. **Needleman P, Raz A, Minkes MS, Ferrendelli JA, Sprecher H.** Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79: 944-948, 1979

33. **Nishizuka Y.** Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of PKC. *Science*. 258(5082):607-14, 1992
34. **Nowak J. Z.** Anti-inflammatory pro-resolving derivatives of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Post Hig Med Journal*. 64: 115-132, 2010
35. **Pritchard H. A. T, Albert A. P, Leblanc N, Greenwood Iain A.** Inhibitory Role of PIP2 on Calcium-Activated Chloride Channel Activity. *Biophysical Journal*. 106(2): 144a, 2014
36. **Qu X, Zhang X., Yao J., Song J., Nikolic-Paterson D., Li J.** Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation. *J Pathol*. 228: 506-519, 2012
37. **Rodat-Despoix L, Aires V, Ducret T, Marthan R, Savineau J. P, Rousseau E, Guibert C.** Signalling pathways involved in the contractile response to 5-HT in human pulmonary artery. *European Respiratory Journal*. 34(6): 1338-1347, 2009
38. **Rogerio A. P, Haworth O, Croze R, Oh S. F, Uddin M, Carlo T, Pfeffer M. A, Priluck R, Serhan C. N, Levy B. D.** Resolvin D1 and its aspirin-triggered epimer AT-RvD1 promote the resolution of allergic airways responses. *Journal of Immunology*. 189(4): 1983-1991, 2012
39. **Serhan C. N., Chiang N., Van Dyke T.E.** Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*. 8: 349-361, 2008
40. **Serhan C. N, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N.** Novel Anti-Inflammatory -- Pro-Resolving Mediators and Their Receptors. *Curr Top Med Chem*. 11(6): 629-647, 2011

41. **Shi Y, Wang C, Han S, Pang B, Zhang N, Wang J, Li J.** Determination of PKC isoform-specific protein expression in pulmonary arteries of rats with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Med Sci Monit.* 18(2):BR69-75, 2012
42. **Stenmark K. R, Rabinovitch M.** Emerging therapies for the treatment of pulmonary hypertension. *Pediatr Crit Care Med.* 11(2):S85-90, 2010
43. **Swanson D, Block R, Mousa S. A.** Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in nutrition Journal.* 3:1-7, 2012
44. **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S.** Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 389:990-994, 1997
45. **Wei B, D'Amico T, Samad Z, Hasan R, Berry M. F.** The impact of pulmonary hypertension on morbidity and mortality following major lung resection. *European Journal of Cardio-thoracic surgery.* 10:1093-95, 2013
46. **Xu Z. Z, Zhang L, Liu T, Park J. Y, Berta T, Yang R, Serhan C. N, Ji R. R.** Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature Medecine.* 16(5):592-597, 2010



## ARTICLE 2

### **Resolvin E1 normalizes contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and smooth muscle cell migration rate in TNF- $\alpha$ - and IL-6-pretreated Human Pulmonary Arteries.**

**Auteurs de l'article:** Roddy Hiram, Edmond Rizcallah, Sofia Marouan, Chantal Sirois, Marco Sirois, Caroline Morin, Samuel Fortin and Eric Rousseau.

**Statut de l'article:** publié dans American Journal of Physiology : **Lung Cellular and Molecular Physiology**. 2015; 309(8):L776-88.

#### **Avant-propos:**

Le projet consistait à traiter des artères pulmonaires humaines en conditions proinflammatoires avec le TNF $\alpha$  et l'IL-6 et observer si cette condition influence la contractilité, la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> et la migration des cellules musculaires lisses isolées. Le rôle préventif de la RvE1 a été étudié sur l'expression de marqueurs de l'inflammation, sur le remodelage vasculaire et sur les protéines régulatrices de la machinerie contractile.

Sous la supervision de Dr Éric Rousseau, M Roddy Hiram a réalisé le recrutement des patients à la clinique préopératoire, le transfert de tissus du département de pathologie vers le laboratoire, la dissection des artères pulmonaires sous la loupe binoculaire, l'exécution des expériences, l'analyse et l'interprétation des données obtenue et la rédaction du manuscrit.

M. Roddy Hiram, Dr Éric Rousseau et Dr. Caroline Morin ont travaillé sur le devis d'étude et la révision du manuscrit. Les MAG-DHA, MAG-EPA et MAG-DPA ont été synthétisés et fournis par SCF-Pharma, sous la direction de Dre Caroline Morin et Dr Samuel Fortin.

Dr Marco Sirois et Dr Chantal Sirois ont effectué les lobectomies et les resections pulmonaires saines étaient fournies par Dr Edmond Rizcallah et Dr Sofia Marouan.

**Résumé :**

L'hypertension pulmonaire est une maladie rare dont la physiopathologie se caractérise par une augmentation des médiateurs proinflammatoires, des dysfonctions endothéliales chroniques et une forte migration des cellules musculaires lisses. Durant la dernière décennie, de nombreux traitements ont été proposés pour relaxer les artères pulmonaires mais aucun ne présentait d'efficacité dans la résolution de l'hypertension pulmonaire. Notre hypothèse est que les médicaments aidant à relaxer les artères ne sont pas des solutions à long-terme, mais ce serait plutôt l'inflammation qu'il faudrait cibler pour limiter les dysfonctions menant à la vasoconstriction anormale.

Le but de la présente étude était d'évaluer les effets antiinflammatoires de la Résolvine E1 (RvE1) ainsi que les effets concomittants sur la migration des cellules musculaires lisses et la réactivité des artères pulmonaires humaines.

Le rôle et le mode d'action de la RvE1 et de son précurseur le MAG-EPA a été évalué sur des artères pulmonaires humaines traitées en conditions proinflammatoires avec une combinaison de 10 ng/ml de TNF $\alpha$  et 10 ng/ml d'IL-6.

Nos résultats démontrent que le TNF $\alpha$  et l'IL-6 induisent une hypersensibilité au Ca<sup>2+</sup> et une hyperréactivité en réponse à des stimulations pharmacomécaniques avec 80 mM de KCl, 1  $\mu$ M de PDBu et 30 nM de U-46619. De plus, le traitement proinflammatoire augmente le niveau de migration des cellules musculaires lisses isolées à partir d'artères pulmonaires humaines. Le niveau de phosphorylation des protéines régulatrices de la contraction (CPI-17, MYPT-1) et des voies de signalisations proinflammatoires (C-Fos, C-Jun, NF $\kappa$ B) sont aussi significativement augmentés comparés aux conditions contrôles. 300 nM de RvE1 peuvent normaliser ces dysfonctions induites par l'inflammation.

En conclusion, la RvE1 peut résoudre l'hyperréactivité artérielle humaine en inhibant les effets des marqueurs de l'inflammation.

**Resolvin E1 normalizes contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and smooth muscle cell migration rate in TNF- $\alpha$ - and IL-6-pretreated Human Pulmonary Arteries.**

**Roddy Hiram<sup>1</sup>, Edmond Rizcallah<sup>3</sup>, Sofia Marouan<sup>3</sup>, Chantal Sirois<sup>4</sup>, Marco Sirois<sup>4</sup>, Caroline Morin<sup>1,5</sup>, Samuel Fortin<sup>5</sup> and Eric Rousseau<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Physiology, <sup>2</sup>Department of Obstetrics-Gynecology, <sup>3</sup>Department of Pathology, <sup>4</sup>Service of Thoracic Surgery, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada and <sup>5</sup>SCF Pharma, Ste-Luce, QC, Canada.

Corresponding author: Eric Rousseau  
Department of Obstetrics-Gynecology  
Faculty of Medicine and Health Sciences,  
Université de Sherbrooke  
3001, 12<sup>th</sup> avenue north,  
J1H 5N4, Sherbrooke, QC, Canada  
Tel: (819) 821 8000 ext 75306  
Fax: (819) 564-5399  
Email: [Eric.Rousseau@USherbrooke.ca](mailto:Eric.Rousseau@USherbrooke.ca)

**Running Title:** RvE1 maintains normal artery tone via resolution of inflammation.

**Keywords:** CPI-17, NF $\kappa$ B, over-reactivity, pulmonary hypertension, RvE1, RvD1,

**ABSTRACT**

Pulmonary hypertension (PH) is a rare disease in which pathophysiology is characterized by an increase in pro-inflammatory mediators, chronic endothelial dysfunctions and a high migration rate of smooth muscle cells (SMC). During the course of the last decade, various treatments have been proposed to relax the pulmonary arteries, none of which have been effective in resolving PH. Our hypothesis is that artery-relaxing drugs are not the long term solution, but rather the inhibition of tissue inflammation, which underlies human pulmonary artery (HPA) dysfunctions that lead to abnormal vasoconstriction. The goal of the present study was to assess the anti-inflammatory effects of Resolvin E1 (RvE1) with concomitant effects on SMC migration and on HPA reactivity. The role and mode of action of RvE1 and its precursor, monoacylglyceride eicosapentaenoic acid (MAG-EPA), were assessed on HPA under pro-inflammatory conditions, involving a combined pre-treatment with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  and 10 ng/ml IL-6. Our results show that TNF- $\alpha$  and IL-6 treatment induced hyperreactivity and Ca<sup>2+</sup> hypersensitivity in response to pharmacomechanical stimuli, including 80 mM KCl, 1  $\mu$ M PDBu and 30 nM U-46619. Furthermore, the pro-inflammatory treatment increased the migration rate of SMC isolated from HPA. The phosphorylation level of regulatory contractile proteins (CPI-17, MYPT-1) and pro-inflammatory signaling pathways (C-Fos, C-Jun, NF- $\kappa$ B) were also significantly increased when compared to control conditions. Conversely, 300 nM RvE1 was able to normalize all of the above abnormal events triggered by pro-inflammation. In conclusion, RvE1 is able to resolve human arterial hyper-reactivity via the resolution of inflammatory markers.

## INTRODUCTION

Pulmonary hypertension (PH) is a multifactorial disorder of the lung vasculature, characterized by an abnormal blood pressure of 25 mmHg due to severe remodeling of the arterial wall, pulmonary arterial vasoconstriction (6, 43, 45) and an overall marked component of inflammation-mediated damages (19, 43). Inflammation is thus suspected to be a key component of the induction and exacerbation of the pathogenesis of various chronic lung diseases (24, 40). Several pro-resolving compounds have recently been identified including lipoxin A4 (LXA<sub>4</sub>), which is derived from arachidonic acid (19), as well as D- and E-series Resolvins which are derived from specific omega-3 fatty acids such as DHA and EPA, respectively. Dietary supplementations with omega-3 polyunsaturated fatty acids ( $\omega$ -3 PUFA) have been shown to confer beneficial effects on many of these pathologies (4). Indeed,  $\omega$ -3 PUFAs and several of their metabolites interact with specific receptors and several enzymes, thus limiting the conversion of arachidonic acid into pro-inflammatory eicosanoids (41), thereby inducing the generation of a range of specialized pro-resolving mediators (SPM). These mediators display positive effects on various intracellular and nuclear signaling pathways involved in the pathophysiology of a number of diseases, including cardiovascular (30) and neurodegenerative disorders (44). Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) have been described as essential fatty acids and are obtained through dietary sources such as fish oils (13). These compounds or their derivatives are able to modulate the expression and synthesis of various pro-inflammatory molecules such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (49), nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (23) and interleukins (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-13) (7). Hence, several of these cytokines are in part responsible for the

remodeling of the arterial wall in PH, a central event that increases the severity of this lung disease (43).

Specifically, remodeling of the arterial wall involved increased migration and proliferation of endothelial cells which results in an obstruction of the artery that enhances the vascular resistances and dramatically increases the blood pressure. Proliferation of pulmonary artery smooth muscle (PASM) cells, also called muscularization, severely increases the thickness of the artery wall. PASM cells in PH have been described to present various differential properties such as dysfunctions of voltage-dependent potassium channels (29), enhanced expression of TMEM16A (10) and increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity (25) which together, are associated with abnormal vasoconstriction.

$\text{Ca}^{2+}$  sensitization mechanisms involve specific agonists such as endothelin-1 (ET-1) or thromboxane A2 (TXA2) that activate the specific regulatory proteins of the contractile machinery. Their stimulation induces the rise of cytosolic calcium concentration, but also an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity due to the activation of PKC/CPI-17 and Rho-kinase pathways which in turn allows to maintain the phosphorylated state of the myosin light chain (MLC), resulting in an abnormal tension of the vascular smooth muscles of the media which increases the tone of the pulmonary arteries (PA). This phenomenon is summarized under the term of: “human pulmonary artery (HPA) hyperreactivity”.

Over the past decade, our laboratory has developed an *in vitro* model of induced pro-inflammatory conditions resulting in a hyper-reactivity of human pulmonary arteries (HPA) (26, 27). Monoacylglycerides of DHA (MAG-DHA) and EPA (MAG-EPA) have moreover been synthesized and used as neutral precursors of DHA and EPA in order to assess their ability to play beneficial effects on this HPA model of induced-hyperresponsiveness, *in vitro*.

Recent results have shown that the treatments with MAG-DHA and its derived products via 15-lipoxygenase (15-LOX) and 5-lipoxygenase (5-LOX), for example RvD1 (a D-series Resolvin), were able to normalize HPA hyper-responsiveness induced by pretreatment with pro-inflammatory compounds (TNF- $\alpha$  and IL-6) and by endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor agent (14).

EPA metabolism has also been documented to yield a number of anti-inflammatory compounds, more specifically when aspirin was used to block cyclooxygenase 2 (COX-2) and produce aspirin-triggered compounds (36). As a matter of fact, EPA metabolism by COX-2 favors the production of some anti-inflammatory (PGE<sub>3</sub>, LTB<sub>5</sub>) and several pro-inflammatory mediators (PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>) (8). However, under the condition where aspirin blocks COX-2 activity, EPA was shown to be transformed into 18 R-HEPE which in turn was metabolized by 5-LOX into E-series Resolvins, including the 5S,12R,18R-trihydroxy-6Z,8E,10E,14Z,16E-eicosapentaenoic acid, also called Resolvin E1 (RvE1) (46). RvE1 has already been reported to attenuate inflammatory pain (48) and has been identified in plasma; its anti-inflammatory action has been confirmed via its specific receptor, Chemerin Receptor 23 (ChemR23) (11). However, it is not clear how RvE1 could impact the arterial tone. Moreover, as described above, the migration and proliferation of the PASM cells is crucial during the arterial remodeling which leads to abnormal vasoconstriction. The role of RvE1 and its receptor ChemR23 on these events are not well understood yet, in the context of PH.

We hypothesized that ChemR23 may be expressed in human pulmonary arterial smooth muscle cells and that a pro-inflammatory status triggered by the combination of TNF- $\alpha$  and IL-6 *in vitro* on HPA could in turn be normalized by curative treatments with RvE1. The aim of the present work was therefore to demonstrate that RvE1 and its precursor MAG-

EPA induce a powerful resolution of inflammatory markers as well as normalize HPA hyper-responsiveness and PASM cell migration through the inhibition and/or modulation of various pro-inflammatory intracellular signaling pathways.

## **MATERIAL and METHODS**

### ***Drugs and chemical reagents:***

Resolvin E1 (RvE1), U-46619 and MK886 were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan).

Serotonin (5-HT), IL-6, type IV Collagenase and type IV Elastase were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Endothelin-1, PDBu, Anti-CPI-17, anti-phospho-CPI-17, anti-phospho-c-Jun (Ser63), anti-phospho-c-Fos (Ser32), anti-COX-2, anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , anti-NF- $\kappa$ B and anti-phospho-NF- $\kappa$ B were purchased from Cedarlane (Burlington, Ontario, Canada).

TNF- $\alpha$ , anti-TNF- $\alpha$  and Anti-TMEM16A were purchased from Abcam (Toronto, Ontario, Canada).

Antibodies against PKC  $\zeta$ , MYPT-1 and P-MYPT-1 (phosphorylated form of MYPT-1 on Thr 696) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (California, USA).

Eicosapentaenoic acid monoacylglyceride (MAG-EPA) was synthesized and purified by SCF-Pharma (Rimouski, Québec, Canada).

DMEM/F-12 and penicillin-streptomycin were obtained from Gibco Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada).



***Culture of human pulmonary arteries:***

This study was approved by our institutional Ethics Committee (protocol number 05-088-S1-R4). Patients hospitalized for lung carcinoma were recruited after providing informed consent and lung tissue samples were obtained from the Service of Thoracic Surgery via the Department of Pathology (12). Tissue samples confirmed as “tumor-free” by the pathologist were transferred to our laboratory bathed in fresh sterile Krebs solution at pH 7.4. Given that recruited patients did not have pulmonary hypertension, tissue samples were hence deemed to be obtained from control patients (N=49). HPA were dissected under a binocular microscope and arterial segments of 4 millimeters in length and 0.5 – 0.8 millimeters in diameter were cultured for 24 h in Dulbecco’s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) containing 1% penicillin/streptomycin (Pen-Strep). In order to mimic pro-inflammatory conditions, HPA were cultured in either control conditions (untreated) or with 10 ng/ml TNF $\alpha$  and 10 ng/ml IL-6, in the absence or presence of 300 nM RvE1, for 24 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> (12). The optimal concentration to observe an effect has been chosen according to previous reports that have performed concentration response curve experiments to assess the effects of Resolvins (38, 46).

***Isolation of pulmonary arterial smooth muscle (PASM) cells:***

HPA segments were incubated for 1 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (GIBCO) supplemented with 1% Pen-Strep, 0.2% type IV Collagenase and 0.05% type IV Elastase (29). The quality of the smooth muscle cell preparation was assessed exactly as previously described (29) and in which 98% of cells were positive for  $\alpha$ -smooth muscle actin, a fairly specific biomarker of vascular smooth muscle cells.

***Cell Migration assay:***

Migration was assayed in a Transwell filter system (6.5 mm diameter, 8  $\mu$ m pore size; Costar Corning, NY). PASM cells were seeded in upper transwells (20 x 10<sup>3</sup> cells / well) in 160  $\mu$ l DMEM/F12 in the absence of FBS or other agents, and incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. In the lower chamber, 600  $\mu$ l of DMEM/F12 + 1% PEN/STREP + 5 % FBS were then added in the absence (control) or presence of TNF- $\alpha$  + IL-6 (10 ng/ml of each cytokine), both conditions in the absence or presence of RvE1 (according to the combined treatment described below in the Results section). After 24 h incubation period under the various experimental conditions, cells in the upper area of the membrane were removed with a dry Q-tip while the cells that had migrated to the lower surface were fixed in absolute methanol and stained with 0.25 % Crystal Violet for cell counting under a confocal microscope. Averages of five random fields were analyzed per condition.

***Isometric tension measurements:***

Tension measurements were performed on prepared HPA rings as previously described (28). A basal 0.8 g tension was applied to each cultured ring. Pharmacologically-induced contractile responses by specific agonists, Resolvins and MAG-EPA were assessed using transducer systems coupled to Polyview software (Grass-Astro-Med Inc., West Warwick, RI) enabling to perform data acquisition and analysis. The amplitudes of maximum tensions are expressed for a given agonist concentration (1  $\mu$ M PDBu or 30 nM U-46619) normalized to the control response to 80 mM KCl for each tested HPA ring.

***β-escin permeabilization and Ca<sup>2+</sup> sensitivity:***

Arterial rings were mounted in organ baths as previously described (37). Active tone developed by the permeabilized arterial rings were subsequently measured at 37°C according to free-Ca<sup>2+</sup> concentrations expressed in terms of pCa (pCa = - log [Ca<sup>2+</sup>]). Reproducible concentration-response curves to free Ca<sup>2+</sup> concentrations induced by step increases in free Ca<sup>2+</sup> (from pCa = 9.0 to 5.3) indicated successful permeabilization.

***SDS-PAGE and Western blot analyses:***

Western blots were performed using specific antibodies against PKC ζ, CPI-17, P-CPI-17, MYPT-1, P-MYPT-1, TMEM16A, c-Fos, c-Jun, COX-2, IκBα, NF-κB, VEGF, MMP9, TNF-α and β-actin proteins. Blot immunostainings were revealed on Kodak film and digitized and analyzed using ImageJ software or Lab-Image software 2.7-2. (28)

***Data presentation and statistical analysis:*** Results are expressed as means ± SEM, with n indicating the number of rings for each set of experiments and N the number of subjects involved. Western blot analyses are depicted with n indicating the number of experiments. Statistical analyses were performed using a Student t test or one-way or two way ANOVA, as appropriate, with Sigma Plot 12.0 and SPSS 14.0 software (SPSS-Science, Chicago, IL). EC<sub>50</sub> values were determined from data curve fittings performed with Sigma Plot 12.0 algorithm. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$  (\*).

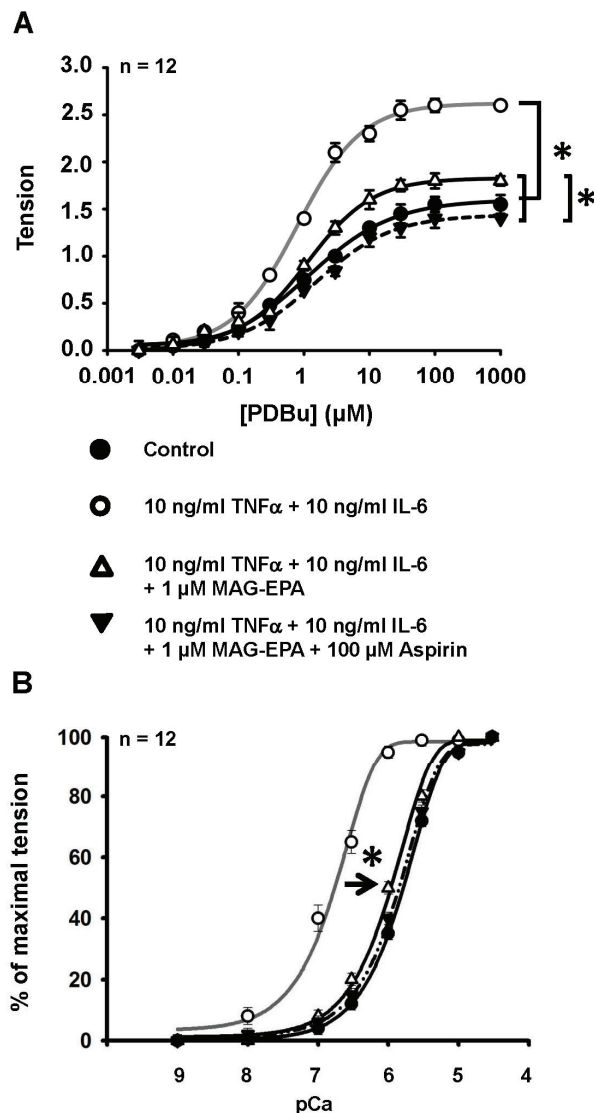
## RESULTS

### *Effect of MAG-EPA on HPA-induced hyperresponsiveness and Ca<sup>2+</sup> hypersensitivity.*

Phorbol 12-13-dibutyrate (PDBu) is a permeable compound previously shown to activate PKC-dependent pathways in vascular smooth muscle cells and to increase Ca<sup>2+</sup> sensitivity and tone (18). [Figure 1A](#) represents the cumulative concentration-response curves (CCRC) to PDBu of HPA in control (no treatment and cultured for 24 h) or treated conditions, either with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 alone or combined with 1  $\mu$ M MAG-EPA or 1  $\mu$ M MAG-EPA + 100  $\mu$ M Aspirin. A 24 h pretreatment with TNF- $\alpha$  combined with IL-6 induced a significant over-reactivity (+62% of normalized tension) to PDBu, with an apparent EC<sub>50</sub> value of 0.8  $\mu$ M, comparatively to 1.2  $\mu$ M in control conditions. Treatment with 1  $\mu$ M MAG-EPA or with 1  $\mu$ M MAG-EPA + 100  $\mu$ M Aspirin significantly reduced the over-reactivity induced by the pro-inflammatory treatment, decreasing the apparent EC<sub>50</sub> values to 1.1  $\mu$ M and 1.4  $\mu$ M, respectively. To ascertain the changes in Ca<sup>2+</sup> sensitivity of myofilaments upon pro-inflammatory or pro-resolving treatments, the tonic responses of  $\beta$ -escin-permeabilized HPA were recorded and analyzed.

[Figure 1B](#) displays the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of myofilaments following the specific treatments described above in permeabilized arteries as a function of pCa. CCRC to free Ca<sup>2+</sup> concentrations revealed that 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 induced a significant increase in Ca<sup>2+</sup>-sensitivity (corresponding to a leftward shift of the pCa response curve (open circles)) when compared to control conditions (dark circles). This observation was consistent with the recorded apparent EC<sub>50</sub> values of 0.17  $\mu$ M and 1.12  $\mu$ M for treated and untreated (control) conditions, respectively. The combined treatment of TNF- $\alpha$  with either 1  $\mu$ M MAG-EPA or 1  $\mu$ M MAG-EPA + 100  $\mu$ M Aspirin normalized the Ca<sup>2+</sup>

sensitivity initially induced by the pro-inflammatory condition, with EC<sub>50</sub> values of 1.07 μM and 1.10 μM, similar to the control EC<sub>50</sub> value of 1.12 μM. These consistent data suggest that MAG-EPA and its aspirin-triggered metabolites normalize HPA-induced over-reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by pro-inflammatory conditions.



**FIGURE 1: Effects of MAG-EPA pre-treatment on the pharmaco-mechanical responses to PDBu and Ca<sup>2+</sup> sensitivity under pro-inflammatory conditions. (A)**

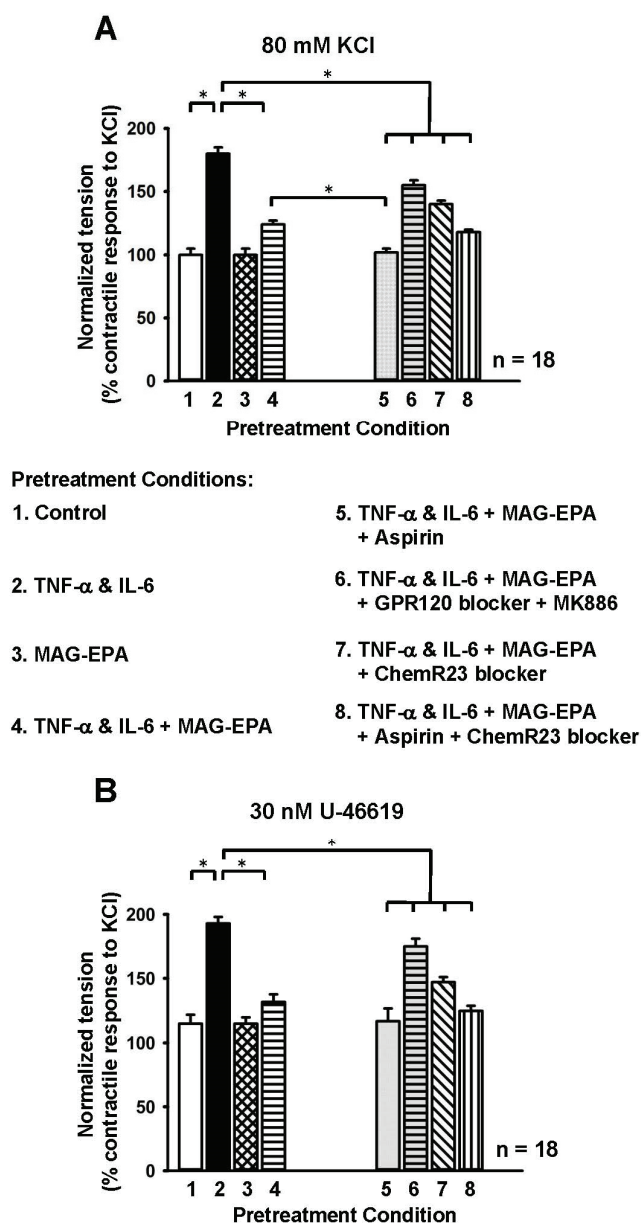
Cumulative concentration-response curve (CCRC) to PDBu on HPA after 24 h in culture under either Control (untreated) (●) conditions or pretreated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 (○) in the absence or presence of 1  $\mu\text{M}$  MAG-EPA ( $\Delta$ ) or 1  $\mu\text{M}$  MAG-EPA + 100  $\mu\text{M}$  Aspirin (▼) (n = 12, \* p < 0.05).

**(B)** Ca<sup>2+</sup> sensitivity of myofilaments in HPA permeabilized with 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -escin after 24 h in culture under Control (untreated) (●) conditions or pretreated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 in the absence (○) or presence of 1  $\mu\text{M}$  MAG-EPA ( $\Delta$ ) or 1  $\mu\text{M}$  MAG-EPA + 100  $\mu\text{M}$  Aspirin (▼) (n=12, \* p < 0.05).

***Effects of MAG-EPA in the presence of specific inhibitor and receptor antagonists***

Aspirin (acetyl salicylic acid, ASA) has previously been reported to modify the metabolism of EPA and to promote pro-resolving metabolites from MAG-EPA (5). However ASA alone basically has no significant effects on control conditions (5, 46). In the following set of experiments, MK886 was used to inhibit the 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) enzyme while two specific peptide blockers were used to block the resolving receptors GPR120 (the EPA receptor (31)) and ChemR23 (the receptor for chemerin and Resolvin E1 (11)), respectively.

Figures 2A and B show that in response to distinct stimuli, either 80 mM KCl or 30 nM U-46619, HPA previously treated for 24 h with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 displayed a significant over-reactivity when compared to controls (untreated). While 1  $\mu$ M MAG-EPA alone had no effect in control condition, the same concentration of MAG-EPA in the presence of 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 during 24 h significantly decreased the over-reactivity (-62%). This tonic response was further normalized when 1  $\mu$ M MAG-EPA was combined with 100  $\mu$ M Aspirin despite the presence of TNF- $\alpha$  and IL-6. In order to block 5-LOX activation and EPA metabolite production, 1  $\mu$ M MK886 was used in combination with 1  $\mu$ M peptide blocker against GPR120 under pro-inflammatory condition in the presence of 1  $\mu$ M MAG-EPA. Despite a small but significant decrease in over-reactivity following blockade of GPR120, there was a significant loss of resolving effect in the presence of the specific Chemr23 blocking peptide. Together these results suggest that MAG-EPA or one of its metabolites displays coherent resolving effects that are partially antagonized by the use of GPR120 and ChemR23 receptor antagonists. These latter findings furthermore suggest that an EPA metabolite (such as RvE1) likely plays a key role in this resolving process.



**FIGURE 2: Effects of MAG-EPA in the absence and presence of receptor antagonists on the contractile responses to KCl and U-46619.** (A) Bar graph displaying the mean contractile amplitudes induced by 80 mM KCl and (B) 30 nM U-46619 on 24h cultured HPA in Control (untreated) conditions or pretreated with: 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6, 1  $\mu$ M MAG-EPA or 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 + 1  $\mu$ M MAG-EPA; or combined with either 100  $\mu$ M Aspirin, 1  $\mu$ M GPR120 peptide blocker + 1  $\mu$ M MK886, 300 nM ChemR23 peptide blocker or 100  $\mu$ M Aspirin + 300 nM ChemR23 peptide blocker. (n = 18, \*  $p$  < 0.05). Compared to combined TNF- $\alpha$  + IL-6 treatment (column 2), addition of MAG-EPA (column 4) alone or in association with Aspirin (column 5) was efficient in normalizing the over-reactivity to KCl and U-46619 triggered by the pro-inflammatory condition.

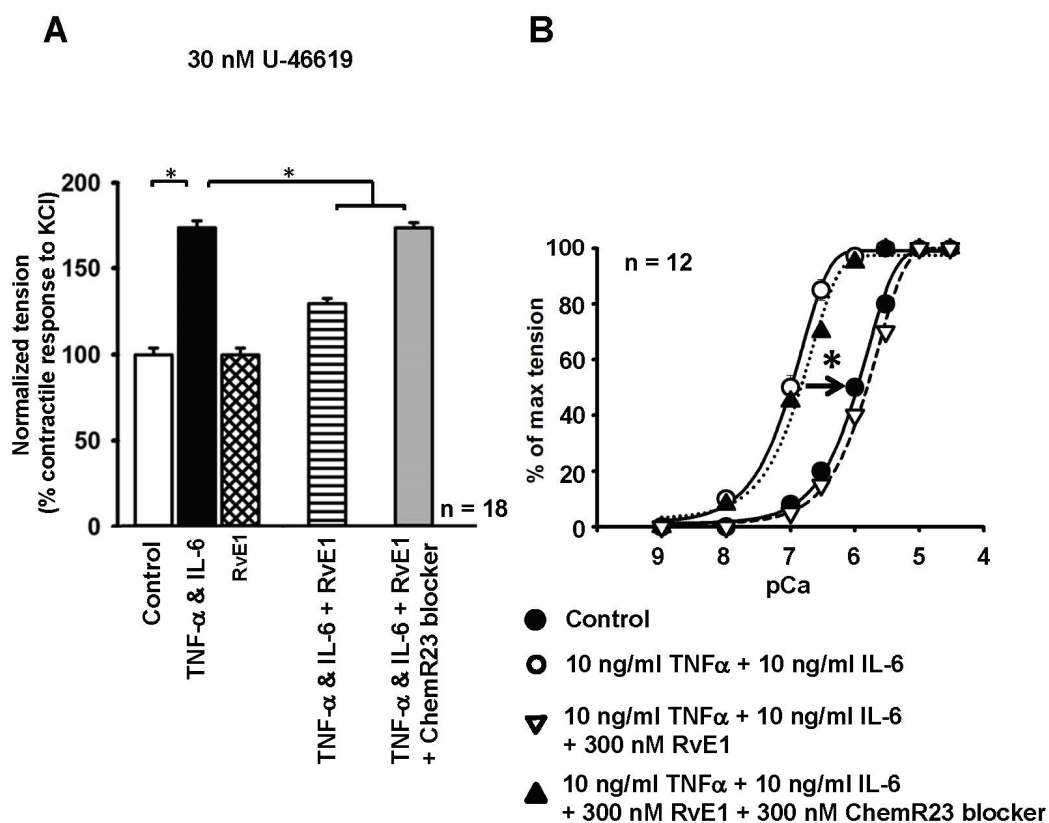


***RvE1 inhibition of HPA-induced hyperresponsiveness and Ca<sup>2+</sup> hypersensitivity.***

The effects of RvE1 were next quantified *in vitro* on HPA in control and pretreated conditions. In [Figure 3A](#), while normalized responses to 30 nM U-46619 were observed under control conditions, 24 h pretreatment with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 induced an over-reactivity (dark column) which was largely prevented by 300 nM RvE1 treatment. Of note, 300 nM RvE1 alone had no effect on control conditions. Furthermore, in TNF- $\alpha$  and IL-6 pretreated HPA, the presence of 300 nM RvE1 and 300 nM ChemR23 blocking peptide largely abolished the pro-resolving effect induced by RvE1.

CCRC to free Ca<sup>2+</sup> concentrations in [Figure 3B](#) reveal increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity after pretreatment of HPA with TNF- $\alpha$  plus IL-6 when compared to control (with EC<sub>50</sub> values of 0.09  $\mu$ M and 1.09  $\mu$ M, respectively), while 300 nM RvE1 reduced the Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by the pro-inflammatory pretreatment with an apparent EC<sub>50</sub> value of 1.4  $\mu$ M, similar to the EC<sub>50</sub> value (1.09  $\mu$ M) observed in control conditions.

However, when RvE1 was combined with the ChemR23 blocking peptide, no change in Ca<sup>2+</sup> sensitivity was observed when compared to the effect of pro-inflammatory treatment (TNF- $\alpha$  plus IL-6), as confirmed by the apparent EC<sub>50</sub> values 0.13 and 0.09  $\mu$ M, respectively. These data reveal that RvE1, via its specific receptor ChemR23, can prevent TNF- $\alpha$  and IL-6 induced over-reactivity and hypersensitivity in HPA *in vitro*.



**FIGURE 3: Effect of Resolvin E1 under control and pro-inflammatory conditions in the absence and presence of Chem23 blocking peptide.**

(A) Bar graph displaying the mean contractile amplitudes induced by 30 nM U-46619 on 24 h cultured HPA either in Control condition or pretreated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6, 300 nM RvE1 alone, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 + 300 nM RvE1 or 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 + 300 nM RvE1 + 300 nM ChemR23 peptide blocker (n = 18, \*  $p < 0.05$ ).

(B) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of myofilaments on HPA permeabilized with 50  $\mu$ M  $\beta$ -escin after 24 h in culture under the same conditions as described above (n = 12, \*  $p < 0.05$ ).

***Role of RvE1 on the regulation of the contractile machinery of PASM cells cultured under pro-inflammatory conditions.***

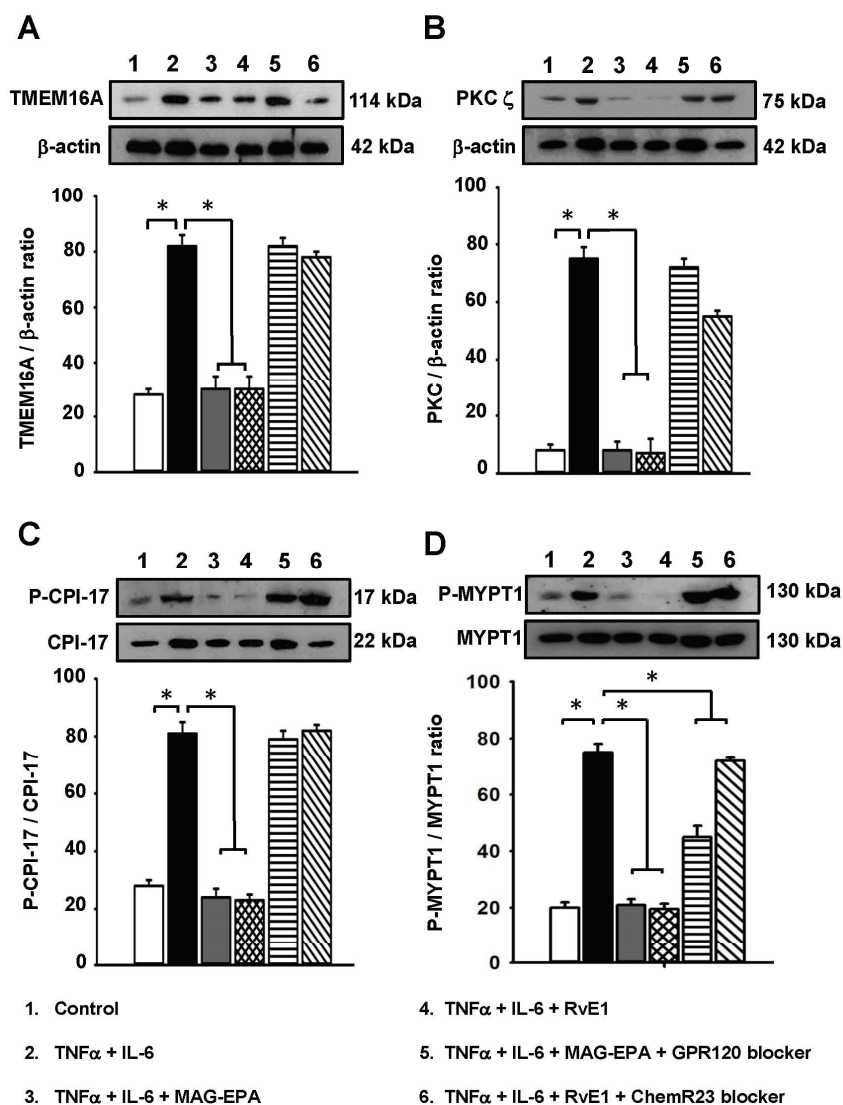
Regulation of the contractile machinery is central for the normal activity of pulmonary artery smooth muscle (PASM) cells from HPA. Over-reactivity and enhanced  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity are the result of a dysregulation of pharmaco-mechanical coupling and putative changes in phosphorylation levels of regulatory proteins involved in the control of contraction-relaxation processes.

In [Figure 4A](#), Western blot analyses performed on microsomal fractions from PASM cells demonstrate that TMEM16A, a calcium- dependent chloride channel and recognized marker of pulmonary hypertension, was highly expressed in PASM cells cultured in the presence of 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 (Lane 2) comparatively to control (Lane 1). However, addition of 1  $\mu\text{M}$  MAG-EPA (Lane 3) or 300 nM RvE1 (Lane 4) inhibited the enhanced expression of TMEM16A induced by pro-inflammatory conditions. Note that selective blocking peptides for ChemR23 and GPR32 respectively abolished the effects of RvE1 and RvD1 ([Fig. 4A lanes 5 and 6](#)).

[Figure 4B](#) represents a Western blot analysis of the detection of PKC $\zeta$  performed on cytosolic fractions from PASM cells treated under the same experimental conditions as described above. When compared to control, TNF- $\alpha$  + IL-6 induced an increase in expression of PKC $\zeta$  while MAG-EPA or its exogenously added metabolite, RvE1, largely inhibited the induced over-expression. Conversely, the independent blocking of respective EPA and RvE1 receptors induced a loss of the inhibitory effect of MAG-EPA and RvE1.

The phosphorylation levels of CPI-17 and MYPT-1 were next quantified on cytosolic fractions from the same experimental conditions and compared to control. TNF- $\alpha$  + IL-6 induced a major increase in phosphorylation levels of both CPI-17 and MYPT-1 in PASM cells (Figure 4C and 4D, respectively), which was well correlated with the extensive vasoconstriction of HPA under the same pro-inflammatory conditions (Fig.1A).

Pre-treatments with either MAG-EPA or RvE1 basically normalized the phosphorylation levels of CPI-17 whereas the blockade of EPA or RvE1 receptors resulted in a loss of this inhibitory effect. Altogether, these data suggest that pro-inflammatory treatments give rise to an important and abnormal increase in the activation of the contractile machinery of PASM cells which in turn is responsible of the abnormal increase in HPA vasoconstriction. This inflammatory-induced event is conversely inhibited and resolved in the presence of pro-resolving mediators such as RvE1 and its precursors.



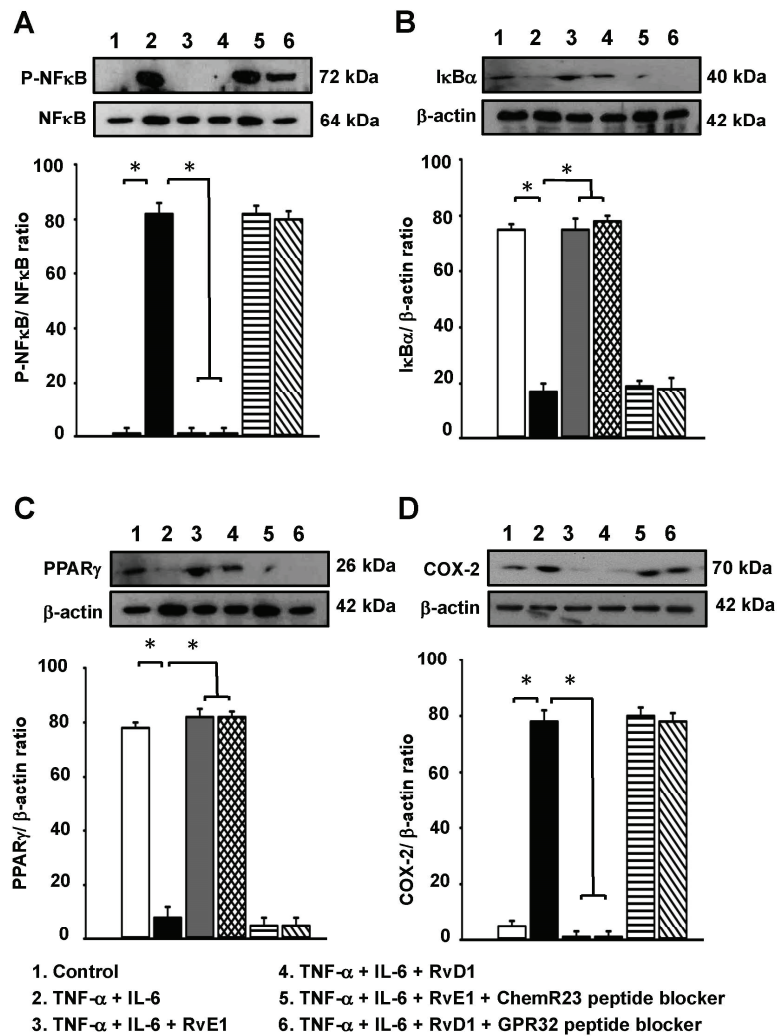
**FIGURE 4: Quantitative immunoblotting analysis of TMEM16A and regulatory proteins under pro-inflammatory and pro-resolving conditions.**

Western blot analyses were performed using antibodies against TMEM16A (pulmonary hypertension marker) (10) and against PKC  $\zeta$ , P-CPI-17 and P-MYPT-1 (contractile machinery regulatory proteins). (A) Relative expression levels of TMEM16A were quantified in microsomal fractions derived from pulmonary artery smooth muscle (PASM) cells. (B) Quantification of PKC  $\zeta$  protein levels in PASM cell lysates. (C) Relative phosphorylation level of CPI-17 and total CPI-17 in PASM cell lysates, (D) Phosphorylation level of MYPT-1 in the same preparation. PASM cells were synchronized and cultured for 24 h, either under Control (untreated) condition or pretreated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 alone or combined with: 1  $\mu$ M MAG-EPA, or 300 nM RvE1, or 1  $\mu$ M MAG-EPA + 1  $\mu$ M GPR120 peptide blocker, or 300 nM RvE1 + 300 nM ChemR23 peptide blocker (n = 8, \*  $p$  < 0.05).

***Comparative analysis of RvE1 and RvD1 treatments on pro-inflammatory markers.***

The activation of signaling pathways involved in the inflammation process is relatively complex and involves various proteins and nuclear factors. Among these, NF- $\kappa$ B, which is under the control of TNF- $\alpha$  receptors, is known to be phosphorylated prior to its translocation into the nucleus where it activates the transcription of several genes including VEGF or MMP9, both of which participate in artery wall remodeling (27). [Figure 5A](#) demonstrates that, compared to control (untreated), the phosphorylation level of NF- $\kappa$ B was increased in the nuclear fraction of PASM cells treated for 24 h under pro-inflammatory conditions with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6. In contrast, 300 nM RvE1 or 300 nM RvD1 (a D-series Resolvin) abolished the increase in normalized phosphorylation ratio. Moreover, the specific inhibition of RvE1 or RvD1 binding on their respective receptors resulted in a complete loss of their apparent resolving properties. I $\kappa$ B $\alpha$  plays an important role in the ability of NF- $\kappa$ B to be phosphorylated and translocated into the nuclei. Of interest, normalized I $\kappa$ B $\alpha$  levels in the cytoplasm depicted in [Figure 5B](#) was inversely proportional to p-NF- $\kappa$ B detection in the nuclei when assessed under the same conditions described in [Figure 5A](#). One of the most relevant inhibitors of pro-inflammatory effects is PPAR $\gamma$ (28). The expression of PPAR- $\gamma$  was detected in the homogenates from HPA and expressed as a function of  $\beta$ -actin ([Figure 5C](#), upper panel). Upon pro-inflammatory treatment with 10 ng /ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6, the relative detection level of PPAR- $\gamma$  was significantly decreased in the cytoplasm ([Figure 5C](#), lower panel). However, this reduced detection was significantly enhanced to values similar to that in controls upon addition of 300 nM RvE1 or 300 nM RvD1 to the pro-inflammatory condition. Conversely, the presence of specific peptide blockers against

both ChemR23 and GPR32 receptors eradicated the beneficial effects of their respective RvE1 or RvD1 ligands. Lastly, COX-2, which is usually expressed in the endoplasmic reticulum membrane and nuclear envelope, becomes inducible during inflammation to produce prostaglandin intermediates involved in abnormal cell growth and inflammation severity. As depicted in [Figure 5D](#), Western blot analysis of microsomal fractions obtained from HPA reveals that, compared to the control, the expression level of COX-2 was significantly increased in intracellular compartments following 24 h pro-inflammatory treatment with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6. However, in the presence of either RvE1 or RvD1, COX-2 detection was basically abolished whereas the blockade of ChemR23 and GPR32 receptors with specific peptide blockers antagonized the respective effect of RvE1 and RvD1 ([Fig. 5 D](#)) Taken together, these data demonstrate that, under stringent pro-inflammatory conditions, E- or D-series Resolvins are instrumental in reversing these inflammatory effects which are consistently antagonized by the specific blocking peptides.



**FIGURE 5: Relative detection levels of inflammatory markers of interest in HPA.**

Western blot analyses were performed on HPA homogenates, using selective antibodies against several pro- and anti-inflammatory markers, including (A) P-NF-κB, NF-κB, (B) IκBα, (C) PPARγ and (D) COX-2.

The HPA were cultured for 24 h, in either control condition, or with 10 ng/ml TNF-α + 10 ng/ml IL-6 alone or combined with: 300 nM RvE1, or 300 nM RvD1, or 300 nM RvD1 + GPR32 peptide blocker, or 300 nM RvE1 + 300 nM ChemR23 peptide blocker. Note that the P-NF-κB/total NF-κB ratio (A) was quantified, while the other markers (B, C and D) are expressed as a function of β-actin (n= 8, \*  $p < 0.05$ ).



***RvE1 and RvD1-controlled regulation of inflammatory marker expression in smooth muscle cells.***

Phosphorylation of c-Fos and c-Jun is generally increased under inflammatory conditions (1). Together, these two protein subunits form the AP-1 complex, which translocate into the nucleus and activates the transcription of specific genes such as MMP9 (16) and VEGF (25), both of which are known to promote pulmonary artery wall remodeling and an exponential increase in cell migration (15).

As seen in [Figure 6A](#) and [6B](#), pro-inflammatory conditions (TNF- $\alpha$  + IL-6) induced an enhanced phosphorylation of c-Fos and c-Jun in the nuclear fraction, which was completely abolished by the addition of 300 nM RvE1 or RvD1. However, upon inclusion of specific blocking peptides, RvE1 and RvD1 were unable to bind to their respective receptor, resulting in the loss of phosphorylation of both protein subunits.

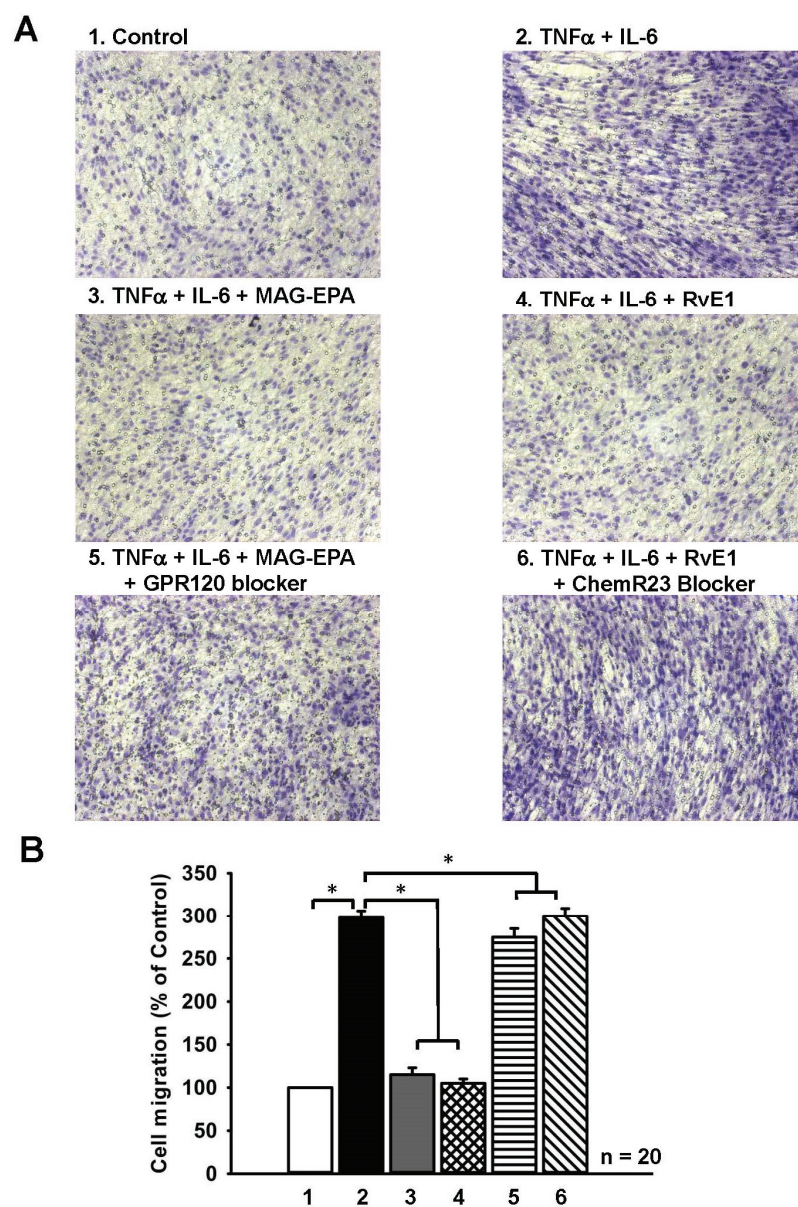


***Effect of RvE1 on PASM cell migration rate.***

The migration rate of primary PASM cells isolated from HPA was assessed under six experimental conditions following 24h treatment: Control (untreated); pro-inflammatory conditions with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6; pro-resolving conditions with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 supplemented with 1  $\mu$ M MAG-EPA or 300 nM RvE1; and finally with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 + 1  $\mu$ M MAG-EPA or 300 nM RvE1 in the presence of 1  $\mu$ M GPR120 peptide blocker or 300 nM ChemR23 peptide blocker.

Representative images of the lower side of the Transwells (Figure 7A) and the corresponding quantitative analysis based on crystal violet colorimetry (Figure 7B) reveal that pro-inflammatory treatment induced a large increase in the migration rate of PASM cells when compared to control. Treatment with either MAG-EPA or RvE1 significantly limited the cell migration rate similar to that observed in control conditions. However, the blockade of either the EPA receptor by the GPR120 peptide blocker or the RvE1 receptor by the ChemR23 peptide blocker resulted in a loss of this inhibition of cell migration (Figure 7B).

These results suggest that RvE1 and its precursor are able to normalize the abnormal migration rate triggered by the pro-inflammatory condition and typically observed during HPA wall remodeling.



**FIGURE 7: Migration rate of human PASM cells under pro-inflammatory and pro-resolving conditions.**

(A) Photomicrographs of migration assays performed on HPA smooth muscle cells from the underside of a Boyden chamber membrane. Cells were seeded and allowed to migrate during 24 h from the upper side to the underside of the Transwell. The upper side contained DMEM-F12 with 0.3 % FBS and 1 % PEN/STREP whereas the lower chamber contained either DMEM-F12 with 0.3 % FBS and 1 % PEN/STREP alone (Control) (1) or supplemented with either 10 ng/ml TNF- $\alpha$  + 10 ng/ml IL-6 (2) alone or combined with: 1  $\mu$ M MAG-EPA (3); 300 nM RvE1 (4); 1  $\mu$ M MAG-EPA + 1  $\mu$ M GPR120 peptide blocker (5); or 300 nM RvE1 + 300 nM ChemR23 peptide blocker (6). (B) Bar graphs displaying the quantitative analysis of migrating cells as a function of the conditions described above (n = 20, \* p < 0.05).

***Effect of RvE1 and RvD1 on the overexpression of VEGF and MMP9 in inflammatory conditions.***

During inflammation, the activation of intracellular pro-inflammatory pathways leads to the activation of the transcription of various genes that encode for proteins involved in the control of multiple events leading to tissue dysfunctions, including abnormal cell growth, cell differentiation, cell migration (i.e. VEGF) and degradation of the extracellular matrix (i.e. MMP9). These events play important roles in the pathology of pulmonary artery wall remodeling in an experimental or clinical context of PAH. Immunoblotting analyses of PASM cells were therefore performed to assess the expression levels of VEGF (Figure 8A) and MMP9 (Figure 8B) following a 24h culture under identical experimental conditions as described above. Results revealed that pro-inflammatory treatment increased the expression levels of both VEGF and MMP9 when compared to control whereas RvE1 or RvD1 largely inhibited this induced overexpression. This inhibition was however lost when specific peptide blockers of resolving receptors were combined to their ligand in the presence of TNF- $\alpha$  and IL-6. These data clearly demonstrate that E or D series Resolvins modulate the expression of VEGF as well as MMP9 in primary isolated smooth muscle cells derived from HPA.



## DISCUSSION

In the present study, we investigated the ability of Resolvins to prevent the abnormal increase in pharmacological reactivity and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity induced by *in vitro* pro-inflammatory conditions on short-term cultured human pulmonary arteries. Our experimental design, aimed at enhancing the contractile properties of HPA using a combined treatment of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the absence or presence of RvE1, enabled to show that the normal functional as well as biochemical properties were largely maintained upon either RvE1 or RvD1 treatment in the presence of pro-inflammatory conditions. These lipid mediators, derived from EPA and DHA metabolism, represent new bioactive trihydroxylated omega-3 derivatives which have previously been reported to reverse dermal inflammation, dendritic cell migration and interleukin production (11). Results herein further demonstrate that MAG-EPA, an EPA donor and RvE1 precursor, is also able to prevent human arterial over-reactivity, enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and PASM cell migration, suggesting a putative role of these compounds in limiting media remodeling typical of pulmonary hypertension. Of importance, these pro-resolving conditions appear to override pro-inflammatory signaling.

***1. RvE1 and MAG-EPA prevent the over-reactivity induced by TNF- $\alpha$  and IL-6 in HPA.*** In the present study, the regulatory signaling pathways involved in the increase in HPA contractility triggered by the presence of pro-inflammatory mediators were normalized upon addition of the  $\omega$ -3 derivatives RvE1 or MAG-EPA. TNF $\alpha$  and IL-6, which bind to their specific receptors TNF-R and CD126 respectively, induce an activation of the protein kinase C (PKC)  $\zeta$  pathway leading to the phosphorylation of

CPI-17. Thereafter, phosphorylation of MYPT1 is increased and contraction of PASM cells is enhanced. In the presence of pharmacological stimuli, additional effects could be observed. For instance, TXA<sub>2</sub> (U-46619) activates IP<sub>3</sub>-induced increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration. TXA<sub>2</sub> also activates Rho A-Rho Kinase pathway; while PDBu directly stimulates PKC/CPI-17 pathway. Together, these cellular events contribute to increase the arterial reactivity in response to pro-inflammatory treatments.

The resulting effect is an over-reactivity of HPA which has often been targeted in PH treatments. However, even if vessel relaxations were observed, such treatments failed to resolve the hypertension, likely in part because these treatments did not specifically tackle the inflammatory process. Our current data are consistent with the hypothesis that inflammation plays a central role in the induction of PH and may thus contribute in increasing the severity of this disease. Herein, we demonstrate that under pro-inflammatory conditions, RvE1, as well as its precursor MAG-EPA, is able to normalize the arterial tone as well as the phosphorylation level of the proteins that regulate the contractile machinery of PASM cells. Interestingly, these effects were either partially or largely abolished when RvE1 and EPA receptors were blocked with specific antagonists. The direct link between inflammatory conditions and over-reactivity of HPA, while often suggested, has never been clearly assessed. This study confirms that inflammation can lead to an increased reactivity and that RvE1 and MAG-EPA can prevent the abnormal pharmacological reactivity. The present data are consistent with previous reports assessing the effect of MAG-DHA in an *in vivo* rat model of monocrotalin-induced pulmonary hypertension (27) or the effects of RvD1 on tissue and intracellular signaling in HPA (14).



## ***2. Pro-resolving effects of RvE1 in HPA***

The combined use of pro-inflammatory molecules, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, leads to the activation and up-regulation of various signaling pathways in PASM cells (3). The present data show that the detection of their functional transducers, such as PKC  $\zeta$ , P-CPI-17, P-MYPT1 and TMEM16A are down regulated in the presence of RvE1 and MAG-EPA.

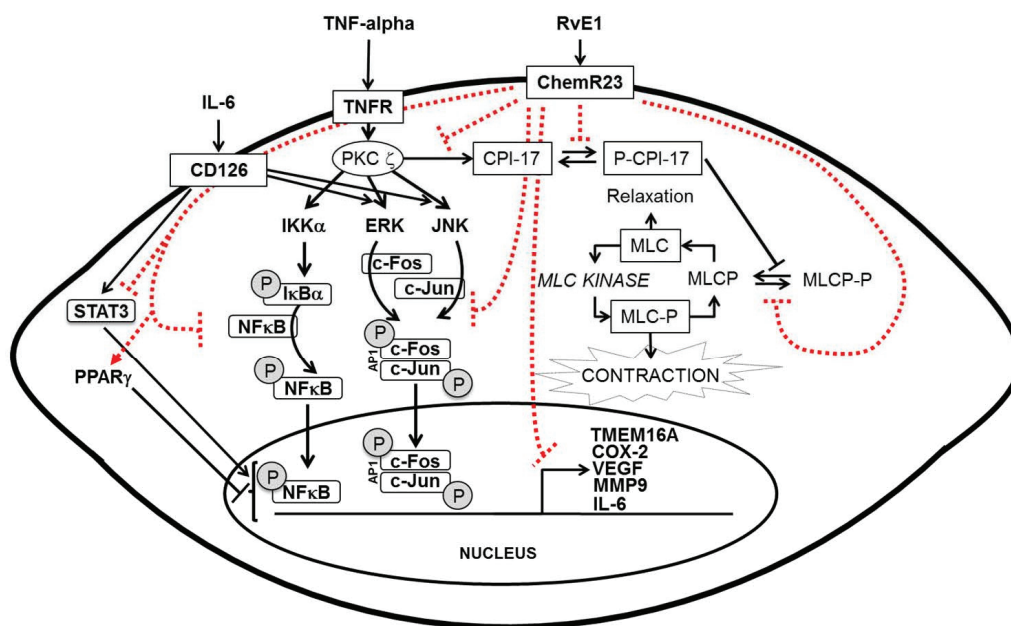
*2.1. Role of RvE1 and RvD1 on NF $\kappa$ B pathway.* The combined stimulation of TNF-R1 and CD126 induces the activation of IKK $\alpha$  which phosphorylates I $\kappa$ B $\alpha$ , which in turn phosphorylates NF $\kappa$ B in the cytosol. Phospho-NF $\kappa$ B translocates into the nucleus to promote specific gene transcriptions. The canonical role of NF $\kappa$ B has not been assessed in PASM cells in the context of PH.

However, in a rat model of the disease, NF $\kappa$ B was found to activate fibroblast growth factor 2 (FGF<sub>2</sub>) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) thereby promoting PASM cell migration and proliferation (33), both events of which are central and typical in pulmonary artery hypertension. Our results clearly demonstrate that nanomolar concentrations of RvE1 and RvD1 (16) down-regulate the phosphorylation level of NF $\kappa$ B in HPA.

*2.2. Role of RvE1 and RvD1 on AP-1 signaling pathway.* TNF- $\alpha$  mediated activation of AP-1 has been reported to play an essential role in the genesis of PH, mainly via the accumulation of collagen in the lung (32). Moreover Steiner et al. 2009 (42) suggested that the up-regulation of cytokines such as IL-6 contributes to the development of PH. Accordingly, when TNF-R and CD126 are stimulated, the combined activation of PKC $\zeta$  and STAT3 pathways leads to activation of ERK and JNK (Figure 9) to phosphorylate c-

Fos and c-Jun, respectively (14). A complex called AP-1 is henceforth formed and translocated into the nucleus. AP-1 thereafter binds to specific DNA sequences to promote the transcription of various genes involved in matrix degradation, collagen expression, cell growth and migration. Our current data demonstrate that nanomolar concentrations of either RvE1 or RvD1 are able to lower the detection of AP-1 subunits into the nucleus of PASM cells, a key observation further explaining the events occurring during the PASM cell migration assay and during hyperplasia of the media in chronic PH (45).

## Effects of RvE1 on TNF- $\alpha$ and IL-6 activated pathways in PASM cells



**FIGURE 9: Schematic diagram summarizing the cellular and molecular events triggered by TNF- $\alpha$  and IL-6, as well as the pro-resolving effects and signaling induced by RvE1 through its receptor Chem23.** AP-1: activator protein 1; CD126: Interleukin 6 receptor; ChemR23: Chemerin receptor 23; COX-2: cyclooxygenase 2; CPI-17: Protein kinase C (PKC)-potentiated inhibitory protein of 17 kDa; c-Fos: proto-oncogene; ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases; I $\kappa$ B $\alpha$ : Inhibitor of NF- $\kappa$  light polypeptide gene enhancer in B-cells alpha; IKK $\alpha$ : I $\kappa$ B kinase alpha subunit; IL-6: Interleukin 6; JNK: c-Jun N-terminal kinase; MLC: myosin light chain; MLCP: MLC phosphatase; MMP9: matrix metalloproteinase 9; NF $\kappa$ B: Nuclear factor-kappa B; PKC: protein kinase C; PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated gamma; TNF-R, tumor necrosis factor receptor; VEGF: vascular endothelial growth factor.

2.3. Resolvins accentuate the effects of anti-inflammatory proteins: example of PPAR $\gamma$ .

In 2003, Ameshima et al. reported that PPAR $\gamma$  expression is decreased in the lung of patients with PH (2). The anti-inflammatory properties of PPAR $\gamma$  have been demonstrated in which the latter reduces cytokine production by monocytes (17) and inhibits NF $\kappa$ B and AP-1 transcription pathways.

Conversely, the lack of PPAR $\gamma$  expression is associated with abnormal endothelial cell growth (due an increase in VEGF) (2), inhibition of apoptosis and angiogenesis, and increased cell migration (due to accumulation of MMP-9) (21). Our current data are consistent with the results of these studies as witnessed by the substantial reduction in PPAR $\gamma$  expression under pro- inflammatory conditions (TNF $\alpha$  + IL-6), whereas this down-regulation is reversed in the presence of RvE1 and RvD1.

These observations suggest that all proteins for which expression depends on the activation of NF $\kappa$ B and/or AP-1 are also likely to be down regulated in the presence of RvE1 and RvD1.

These effects induced by Resolvins could also result in a decrease or halting of arterial wall remodeling putatively induced by pro-inflammatory signaling pathways. While further studies are needed to assess this hypothesis, the present findings provide new insight regarding the expression of key proteins involved in arterial wall hyperplasia.

### ***3. Resolvins curb the expression of proteins involved in arterial wall remodeling in PH.***

The transcription rate of various proteins involved in a large range of disorders is increased under pro-inflammatory conditions. For example, COX-2 leads to the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid (AA) (36). VEGF triggers an increase and abnormal growth of endothelial cells concomitant with an enhanced migration of macrophages, monocytes, PASM and endothelial cells (33). MMP9 is involved in the deterioration of the extracellular matrix (9) and typically induces pathological arterial wall remodeling and hypertrophy due to activation of cell migration (20). The present data attest that treatment of HPA with RvE1 as well as RvD1 prevents and blocks the detection of these biomarkers of arterial wall remodeling. Data also confirm that during inflammation, the ensuing tissue modifications promote the severity of this disease, leading to obstruction of the arteries and enhancement of pulmonary arterial tension. Consistent with these observations and according to previous reports whereby PASM cell migration plays a crucial role in PH (33), assessment of PASM cell migration rate in this study confirmed the beneficial impact of Resolvins under pro-inflammatory conditions. Indeed, PASM cell migration was increased in response to inflammation and is likely maintained in PH hence contributing to the severity of the disease. However, both RvE1 and its precursor MAG-EPA, via the activation of their respective receptors, were able to curb the migration of PASM cells triggered by inflammation. Further studies are nonetheless needed to clarify the pathways involved in this regulation. For example, Ca<sup>2+</sup> dependent aquaporin called AQP1 present in the cell membrane of PASM cells has been reported to be involved in this mechanism (22).

#### ***4. Limitations of the study***

The present study was essentially performed on lung samples obtained from patients devoid of PH. Pulmonary arteries and isolated cells from these patients were therefore treated *in vitro* to develop the characteristics of the disease targeted in this study (inflammation, over-reactivity and  $\text{Ca}^{2+}$  hypersensitivity).

It would obviously be of interest to perform the present analysis directly on lung samples from patients with PH. Furthermore, it would be of interest to investigate if the expression of ChemR23 and GPR32 would be altered on lung tissues affected by PH. However, such tissues are very rare and difficult to obtain. For the time being, we do not have access to fresh tissues from PH patients.

However, efforts are currently under way for future collaborations with the Tissue Data Bank of the Respiratory Health Network of the FRQS in order to overcome this issue. Lastly, studies from Potus et al. have reported a key role of miR204 in healing PH in a mouse model (34), while Recchiuti et al. have reported that RvD1 regulates specific miRNAs involved in the resolution of inflammation (35). It would thus be of key interest to investigate the effects of RvE1 on miRNA expression under pro-inflammatory conditions in HPA. Moreover, the inhibitory role of short chain fatty acids on histone deacetylase (HDAC) was reported by Vinolo et al., in 2011 (47).

According to these observations, further studies would be required to explain the wide range of RvE1 and RvD1 effects observed on PASM cells.

## **5. Conclusion**

The present study attests that RvE1 and RvD1 as well as MAG-EPA induce a down regulation of NFkB and AP-1 pathways, which are key activators of transcriptional factors directly involved in the inflammatory responses of various cell types, including PASM cells. Moreover, RvE1 treatment was able to prevent HPA over-reactivity in response to pharmacological challenges under pro-inflammatory conditions. These findings demonstrate that inflammation is a process that can induce tonic responses which are potentially relevant in the context of PH. These observations open new perspectives about the key role of RvE1, that could be further assessed in future studies using a well-known model of MCT-induced PH on rats *in vivo*, following an curative experimental protocol. RvE1 and its analogs display resolving effects which suggest that these Specialized Proresolving Mediators (11) could be used as new therapeutic tools in the prevention and successful treatment of pro- inflammatory induced over-reactivity in HPA.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Mr. Pierre Pothier for critical review of the manuscript. This work was supported by a grant from the Heart and Stroke Foundation of Canada/Quebec to Eric Rousseau and Caroline Morin. Roddy Hiram is the recipient of a studentship from the Health Respiratory Training Program of Quebec supported by the CIHR.

## **CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT:**

The authors declare no conflicts of interests. Samuel Fortin is the owner and CEO of SCF Pharma, which has an exclusive worldwide license of the patented compositions and uses of MAG-DHA.

## REFERENCES

1. **Ahmad M., Theofanidis P. and Medford R.M.** Role of Activating Protein-1 in the Regulation of the Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Gene Expression by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 20; 273(8):4616-21, 1998.
2. **Ameshima S., Golpon H., Cool C.D., Chan D., Vandivier R.W., Gardai S.J., Wick M., Nemenoff R.A., Geraci M.W. and Voelkel N.F.** Peroxisome Proliferator- Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) Expression Is Decreased in Pulmonary Hypertension and Affects Endothelial Cell Growth. *Circ Res* 92:1162-1169, 2003.
3. **Ammit AJ, Lazaar AL, Irani C, O'Neill GM, Gordon ND, Amrani Y, Penn RB and Panettieri RA Jr.** Tumor necrosis factor-alpha-induced secretion of RANTES and interleukin-6 from human airway smooth muscle cells: modulation by glucocorticoids and beta-agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(4):465-74, 2002.
4. **Andrade, P.M.** Effects of the fish-oil supplementation on the immune and inflammatory responses in elite swimmers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77(3-4): p. 139-45, 2007.
5. **Arita M<sup>1</sup>, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis NA, Serhan CN.** Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med* Mar 7;201(5):713-22, 2005.
6. **Budhiraja R., Tudor R. M., Hassoun P. M.** Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109: 159-165, 2004.



7. **Chu A. J., Walton M. A., Prasad J. K., Seto A.** Blockade by polyunsaturated n-3 fatty acids of endotoxin-induced monocytic tissue factor activation is mediated by the depressed receptor expression in THP-1 cells. *J Surg Res.* 87(2):217–24, 1999.
8. **Chu C.** Lipids: COX-2'S new role in inflammation. *Nature Chemical Biology* 6:401-402, 2010.
9. **Dave Y A., McAuley D.F. and O’Kane C.M.** Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair. *Eur Respir J* 38: 959–970, 2011.
10. **Forrest A.S., Joyce T.C., Huebner M.L., Ayon R.J., Wiwchar M., Joyce J., Freitas N., Davis A.J., Ye L., Duan D.D., Singer C.A., Valencik M.L., Greenwood I.A., Leblanc N.** Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension. *American J Physiol - Cell Physiol* 303(12): C1229-C1243, 2012.
11. **Fredman G. and Serhan C.N.** Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem J* 437(Pt 2): 185–197, 2011.
12. **Guibert C, Savineau J. P, Crevel H, Marthan R, Rousseau E.** Effect of short-term organoid culture on the pharmaco-mechanical properties of rat extra- and intrapulmonary arteries. *Br J Pharmacology* 146: 692-701, 2005.
13. **Guilliams T. G.** Fatty acids: essential... Therapeutic. *The standard* 2:1-8, 2002.
14. **Hiram R., Rizcallah E., Sirois C., Sirois M., Morin C., Fortin S., Rousseau E.** Resolvin D1 reverses reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by ET-1, TNF- $\alpha$  and

IL-6 in the human pulmonary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1:307(11):H1547-58, 2014.

15. **Hollborn M, Stathopoulos C, Steffen A, Wiedemann P, Kohen L, Bringmann A.** Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(9):4360-7, 2007.
16. **Hosokawa S., Haraguchi G., Sasaki A., Arai H., Muto S., Itai A., Doi S., Mizutani S., Isobe M.** Pathophysiological roles of nuclear factor kappaB (NF-kB) in pulmonary arterial hypertension: effects of synthetic selective NF-kB inhibitor IMD-0354. *Cardiovascular Research* 99:35–43, 2013.
17. **Jiang C., Ting A. T., Seed B.** PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391:82-86, 1998.
18. **Jiang MJ, Morgan KG.** Intracellular calcium levels in phorbol esterinduced contractions of vascular muscle. *Am J Physiol* 253(6 pt 2):H1365–H1371, 1987.
19. **Kazani S., Planaguma A., Ono E., Bonini M., Zahid M., Marigowda G., Wechsler M.E., Levy B.D., Israel E.** Exhaled breath condensate eicosanoid levels associate with asthma and its severity. *J Allergy Clin Immunol* 132(3):547-53 2013.
20. **Kobayashi T., Kim H., Liu X., Sugiura H., Kohyama T., Fang Q., Wen F., Abe S., Wang X., Atkinson J.J., Shipley J.M., Senior R.M., and Rennard S.I.** Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- and stimulates fibroblast contraction of collagen gels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306: L1006–L1015, 2014.

- 21. Law R.E., Goetze S., Xi X.P., Jackson S., Kawano Y., Demer L.** Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101 (11):1311–1318, 2000.
- 22. Leggett K., Maylor J., Udem C., Lai N., Lu W., Schweitzer K., King L.S., Myers A.C., Sylvester J.T., Sidhaye V., Shimoda L.A.** Hypoxia-induced migration in pulmonary arterial smooth muscle cells requires calcium-dependent upregulation of aquaporin 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 15: 303(4):L343-53, 2012.
- 23. Lo C. J., Chiu K. C., Fu M., Lo R., Helton S.** Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J Surg Res* 82(2):216–21, 1999.
- 24. Medzhitov R.** Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-435, 2008.
- 25. Morin C, Fortin S, Rousseau E.** Docosahexaenoic acid monoacylglyceride decrease endothelin-1 induced  $Ca^{2+}$  sensitivity and proliferation in human pulmonary arteries. *Am J Hypertens* 25(7):756-63, 2012.
- 26. Morin C., Guibert C., Sirois M., Vincent E., Gomes M. M., Rousseau E.** Effects of  $\omega$ -hydroxylase product on distal human pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H1435-H1443, 2008.
- 27. Morin C., Hiram R., Rousseau E., Blier P. U., Fortin S.** Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307(4):H574-86, 2014.

28. **Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes M. M, Rousseau E.** EET displays anti-inflammatory effects in TNF-alpha stimulated human bronchi: putative role of CPI-17. *American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology* 38(2):192-201, 2009.
29. **Morin C, Sirois M, Echave V, Rizcallah E, Rousseau E.** Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *American Journal of Physiology* 296: L130-L139, 2009.
30. **Mozaffarian D, Wu JH.** Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol* 58 (20): 2047-2046, 2011.
31. **Oh DY, Talukdar S, Bae1 EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan WQ, Li P, Lu WJ, Watkins SM and Olefsky JM.** GPR120 is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects. *Cell* 142(5): 687–698, 2010.
32. **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(6):L1209-21, 2002.
33. **Podar K., Tai Y.T., Davies F.E., Lentzsch S., Sattler M., Hideshima T., Lin B.K., Gupta D., Shima Y., Chauhan D., Mitsiades C., Raje N., Richardson P., Anderson K.C.** Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 98 (2): 428-435, 2001.

- 34. Potus F., Graydon C., Provencher S., and Bonnet S.** Vascular remodeling process in pulmonary arterial hypertension, with focus on miR-204 and miR-126. *Pulm Circ* 4(2): 175–184, 2014.
- 35. Recchiuti A., Krishnamoorthy S., Fredman G., Chiang N., Serhan C.N.** MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvins and miRNA circuits. *FASEB J* 25(2): 544-60, 2011.
- 36. Ricciotti E. and FitzGerald G.A.** Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5): 986–1000, 2011.
- 37. Rodat-Despoix L, Aires V, Ducret T, Marthan R, Savineau J. P, Rousseau E, Guibert C.** Signalling pathways involved in the contractile response to 5-HT in human pulmonary artery. *European Respiratory Journal* 34(6):1338-1347, 2009.
- 38. Rossi S, Di Filippo C, Ferraraccio F, Simonelli F and D'Amico M.** Resolvin D1 Reduces the Immunoinflammatory Response of the Rat eye following Uveitis. *Mediators of inflammation* 9: 318627, 2012.
- 39. Shimoda L.A., Laurie S.S.** Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)* 91(3): 297-309, 2013.
- 40. Simonneau G., Gatzoulis M. A., Adatia I.** Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62(25 Suppl):D34-41, 2013.
- 41. Simopoulos A. P.** The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmac* 56(8): 365-379, 2002.
- 42. Steiner M.K., Syrkin O.L., Kolliputi N., Mark E.J., Hales C.A., Waxman A.B.** Interleukin-6 Overexpression Induces Pulmonary Hypertension. *Circulation Research* 104: 236-244, 2009.

43. **Soon E., Holmes A. M., Treacy C. M., Doughty N. J., Southgate L., Machado R. D., Trembath R. C., Jennings S., Barker L., Nicklin P.** Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 122: 920–927, 2010.
44. **Swanson D, Block R, Mousa S. A.** Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in nutrition Journal* 3:1-7, 2012.
45. **Tajsic T., Morrell N. W.** Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension. *Compr Physiol* 1(1):295-317, 2011.
46. **Uddin M. and Levy B.** Resolvins: Natural agonists for resolution of pulmonary inflammation. *Progress in Lipid* 50: 75-88, 2011.
47. **Vinolo M. A. R., Rodrigues H. G, Nachbar R. T and Curi R.** Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients* 3: 858-876, 2011.
48. **Xu Z. Z., Zhang L., Liu T., Park J. Y., Berta T., Yang R., Serhan C. N., Ji R.** Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central peripheral actions. *Nat Med* 16(5):592-597, 2010.
49. **Zhao Y., Joshi-Barve S., Barve S., Chen L. H.** Eicosapentaenoic acid prevents LPS induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappa B activation. *J Am Coll Nutr* 23(1):71–8, 2004.

## **ARTICLE 3**

### **MAG-DHA, precursor of D-series Resolvins, induces powerful resolution of various components of pulmonary hypertension induced by Monocrotaline in rats.**

**Auteurs de l'article:** Roddy Hiram, Caroline Morin, Samuel Fortin et Eric Rousseau.

**Statut de l'article:** En révision, dans American Journal of Physiology : **Heart and Circulatory Physiology**.

#### **Avant-propos:**

Les travaux rapportés dans cet article consistaient à évaluer le potentiel curatif du MAG-DHA suite à une hypertension pulmonaire sévère induite chez le rat. Les modifications tissulaires telles que l'hypertrophie de la paroi artérielle pulmonaire et l'hypertrophie du ventricule droit ont été étudiées. Les altérations de l'activité contractile ont été testées. Enfin, la composante inflammatoire a été interrogée. Des conclusions ont ainsi pu être établies sur l'impact du MAG-DHA pour contrer les effets liés à l'hypertension pulmonaire induite par la Monocrotaline chez le rat.

Le traitement des rats, la mise en oeuvre des expériences, l'analyse et l'interprétation des résultats puis la rédaction du manuscrit ont été réalisés par Mr Roddy Hiram sous la supervision de Dr Éric Rousseau.

Le devis d'étude et la révision du manuscrit ont été réalisés par Mr Roddy Hiram, Dr. Éric Rousseau et Dr. Caroline Morin. Le MAG-DHA a été synthétisé et fourni par SCF-Pharma, sous la direction du Dr Samuel Fortin.

**Résumé :**

L'hypertension pulmonaire est une maladie dans laquelle les vaisseaux sanguins du poumon exercent une vasoconstriction anormale qui limite l'irrigation et l'oxygénation du sang circulant. Malgré les traitements existants, l'hypertension pulmonaire reste associée à une importante morbidité.

Notre hypothèse est que l'inflammation pourrait être traitée et inhibée par une approche appropriée, dans un modèle d'hypertension pulmonaire induite à la monocrotaline (MCT) chez le rat. Le but de l'étude était d'évaluer les effets du MAG-DHA pour résoudre l'inflammation dans le modèle d'hypertension pulmonaire induite à la MCT en mesurant les niveaux d'expression de marqueurs d'inflammation et de contractilité dans les artères pulmonaires. Des rats ont reçu 60 mg/kg de MCT le premier jour puis ont été traités quotidiennement du 14<sup>e</sup> au 21<sup>e</sup> jour avec 231 mg/kg de MAG-DHA. Ce groupe de rats a ensuite été comparé aux rats MCT non traités au MAG-DHA.

Les résultats démontrent que le MAG-DHA normalise le poids du ventricule droit (VD) qui était significativement augmenté dans le groupe de rats traités à la MCT comparé aux contrôles. L'épaisseur moyenne de la paroi des artères passait de 12  $\mu\text{m}$  chez les rats contrôles à 48  $\mu\text{m}$  chez les rats MCT. Le traitement au MAG-DHA diminue significativement les effets du MCT en ramenant l'épaisseur moyenne de la paroi à 20  $\mu\text{m}$ . Les rats MCT présentent aussi une augmentation de la réactivité artérielle en réponse à 30 nM d'U-46619 (un analogue du thromboxane A<sub>2</sub>) et à 1  $\mu\text{M}$  de PDBu (un activateur de la PKC). Le traitement au MAG-DHA diminue significativement cet effet de la MCT. Les analyses par Western Blot confirment que le traitement à la MCT augmente les niveaux de phosphorylation de la CPI-17 et du MYPT-1 alors que le traitement au MAG-DHA les normalise. De plus, sous le traitement à la MCT, l'expression de biomarqueurs inflammatoires était augmentée, parmi lesquels le TNF $\alpha$ , la COX-2, le STAT3 ainsi que les niveaux de phosphorylation de C-Fos, C-Jun et NF $\kappa$ B. Le traitement au MAG-DHA résolvait le profil inflammatoire.

En conclusion, 7 jours de traitement avec le MAG-DHA peuvent permettre de résoudre le statut inflammatoire dans un modèle d'hypertension pulmonaire chez le rat.



**MAG-DHA, precursor of D-series resolvins, induces powerful resolution of various components of pulmonary hypertension induced by Monocrotaline in rats.**

**Roddy Hiram<sup>1</sup>, Caroline Morin<sup>1,2</sup>, Samuel Fortin<sup>2</sup> and Eric Rousseau<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Department of obstetrics-gynecology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, <sup>2</sup>SCF Pharma, Ste-Luce, QC, Canada.

**Corresponding author: Eric Rousseau**

Department of obstetrics-gynecology,  
Faculty of Medicine and Health Sciences,  
Université de Sherbrooke  
3001, 12<sup>th</sup> avenue north,  
J1H 5N4, Sherbrooke, QC, Canada  
Tel: (819) 346 1110 extension 7 5306  
Email: [Eric.Rousseau@USherbrooke.ca](mailto:Eric.Rousseau@USherbrooke.ca)

**Running Title:** MAG-DHA resolves PH-induced injury in a rat model.

**Keywords:** D-series resolvins, Docosahexaenoic acid monoacylglyceride; Inflammation; Pulmonary hypertension.

**New & Noteworthy:** Several reports indicated that patients with pulmonary hypertension (PH) displayed an inflammatory status, with an enhanced expression of several cytokines (TNF $\alpha$ , and IL-6). DHA monoacylglyceride decreased TNF $\alpha$ , COX-2 and STAT3 expression in a rat model of MCT-induced PH. MAG-DHA represents a new and promising approach in the management of PH.

**ABSTRACT** Pulmonary hypertension (PH) is a disease of the lung vessels involving abnormal vasoconstriction which limits lung blood circulation and oxygenation. Despite current pharmacological treatments, PH still remains associated with high morbidity. Our hypothesis is that systemic lung inflammation may be resolved via relevant treatment in a rat model of Monocrotaline (MCT)-induced PH. The goal of the study was to assess the resolving effects of monoacylglyceride docosahexaenoic acid (MAG-DHA) on MCT-induced PH by measuring inflammation biomarkers and contractility levels in pulmonary arteries. Experimental rats were administered 60 mg/kg of MCT on day 1 and subsequently treated from day 14 onward with 231 mg/kg MAG-DHA daily for 7 days and compared with non-treated MCT animals and untreated controls. Results show that MAG-DHA normalized right ventricle (RV) weight which was significantly increased in the MCT-treated group compared to controls. Mean artery wall thickness increased from 12  $\mu\text{m}$  in control rats to 48  $\mu\text{m}$  in MCT rats while MAG-DHA treatment significantly curbed this increase with a resulting wall thickness of 20  $\mu\text{m}$ . MCT rats also displayed increased arterial reactivity in response to 30 nM U-46619 (thromboxane A<sub>2</sub> analog) and 1  $\mu\text{M}$  PDBu (potent PKC activator) whereas MAG-DHA treatment significantly decreased this pharmacological hyper-responsiveness. Western blot analysis confirmed that MCT treatment increased the phosphorylation levels of P-CPI-17 and P-MYPT-1, which were largely reversed after MAG-DHA treatment. Lastly, under MCT condition, a large array of inflammatory biomarkers were enhanced, including TNF- $\alpha$ , COX-2, STAT-3 as well as the phosphorylated nuclear factors P-C-Fos, P-C-Jun and P-NF- $\kappa\text{B}$ , with MAG-DHA treatment strongly reversing this inflammatory profile. In conclusion, a 7-day treatment with MAG-DHA is able to resolve the inflammatory status in a rat PH model.

## INTRODUCTION

Pulmonary hypertension (PH) is a rare and progressive disease that affects numerous individuals without distinction of age, gender or socio-economic status (13). In most instances, patients are unaware that they are sick since the early stages of this disease are characterized by symptoms that can be confused with benign diseases such as influenza or light fever (27). When the diagnosis of PH is ultimately confirmed, the disease is generally at its most severe stage and described as irreversible (2).

In order to better understand the disease and perform appropriated therapeutic approach, a classification of PH has been proposed from the 4<sup>th</sup> PH World Symposium of Dana Point in California 2008 (32). 5 groups of PH are identified. Group 1 is pulmonary hypertension with idiopathic cause, heritable, induced by toxics and drugs, associated with infection such as HIV, persistent PH of the newborn. Group 2 is PH due to left heart diseases. Group 3 is PH due to lung diseases and hypoxemia. Group 4 is chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Group 5 is PH with multifactorial origins.

From a pathophysiological standpoint, PH is characterized by a substantial dysfunction of the endothelium which is severely disorganized and hypertrophied. Abnormal expression and secretion of ET-1 by the endothelium leads to over-proliferation and reactivity of pulmonary artery smooth muscle (PASM) cells (33). The adventitia of the artery wall is the site of significant inflammation, due to the secretion of cytokines and chemokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , CCL5/RANTES, CXCL10 and accumulation of pro-inflammatory cells such as dendritic cells, T and B lymphocytes, mast cells and macrophages (28). This phenomenon contributes to an increase in paracrine signaling pathways and leads to vasoconstriction of the pulmonary arteries.

Moreover, in the media of the pulmonary artery wall, PASM cells have been described to express specific biomarkers of PH such as TMEM16A (Transmembrane member 16 A), a voltage sensitive calcium-activated chloride channel (5). PASM cells also present increased  $Ca^{2+}$  sensitivity and hyperreactivity in response to pharmacological agents. Among these, endothelin-1, U-46619 (an agonist of TP receptors) and PDBu, a PKC activator, are involved in the phosphorylation of CPI-17 (C-kinase-activated protein phosphatase-1 inhibitor of 17 kDa), which in turn contributes in maintaining the myosin light chain phosphatase in its phosphorylated (inactivated) form consistent with the phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 -P-MYPT-1- (31). This impedes the dephosphorylation of myosin light chain and the maintenance of tone in PASM cells and media layer (20).

Instead of the typical 10 mmHg at rest in normal subjects, patients with PH display mean pulmonary arterial blood pressure reaching 25 mmHg (14). However the role of inflammation within the pulmonary artery wall has neither been comprehensively addressed nor adequately treated. Hence the resolution of these inflammatory processes may be of prime clinical interest.

Over the last decade, various treatments have been proposed to improve patients' lives. Most target endothelial cell pathways that potentially lead to vasodilatation, such as the use of prostacyclin analogs therapy (9), NO production (27), PDE-5 inhibition (9) or activation of atrial natriuretic peptide pathways, in order to tackle the negative effects of ET-1 (9). Regrettably, none of these treatments are able to cure patients with PH and the disease ultimately continues its evolution into right ventricular hypertrophy, heart failure and death (27).

The goal of the present study was to assess the functional consequences of pulmonary artery wall inflammation *in vivo* as well as the putative effects of pro-resolving agents on various inflammatory processes.

Accordingly, several omega-3 derivatives have been identified in various physiological systems as pro-resolving compounds (1, 24, 31), able to speed up resolution of inflammation as attested by several reports (21, 22). Our group has already investigated the impact of different monoacylglyceride compounds and shown that monoacylglyceride docosahexaenoic acid (MAG-DHA) (21), monoacylglyceride docosapentaenoic acid (MAG-DPA) (22), and D-series resolvins such as Resolvin D1 were able to abolish the pro-inflammatory effects of TNF- $\alpha$  and IL-6 (12) as well as the induced hyperreactivity and calcium sensitivity in human pulmonary arteries (12).

Our current hypothesis is that *per os* administrations of MAG-DHA can potentially normalize the pro-inflammatory responses and thus restore pulmonary artery reactivity due to a decrease in inflammation as revealed by changes in specific biomarkers. The present study shows that a 7-day treatment of daily *per os* administration of 231 mg/kg of MAG-DHA fourteen days after a single intraperitoneal injection of 60 mg/kg Monocrotaline (MCT) was able to reverse and normalize key histological, cellular, molecular and inflammatory markers of MCT-induced pulmonary hypertension disease in rodents.

## **MATERIAL and METHODS**

### ***Synthesis of n-3 PUFA monoacylglycerides.***

MAG-DHA was synthesized using ethyl ester as starting material, as previously described (6). The resulting molecule was comprised of DHA attached in the sn-1 position of glycerol. MAG-DHA was synthesized and purified by SCF-Pharma (Rimouski, Quebec, Canada) and was kindly provided by Dr Samuel Fortin.

### ***Drugs and chemical reagents***

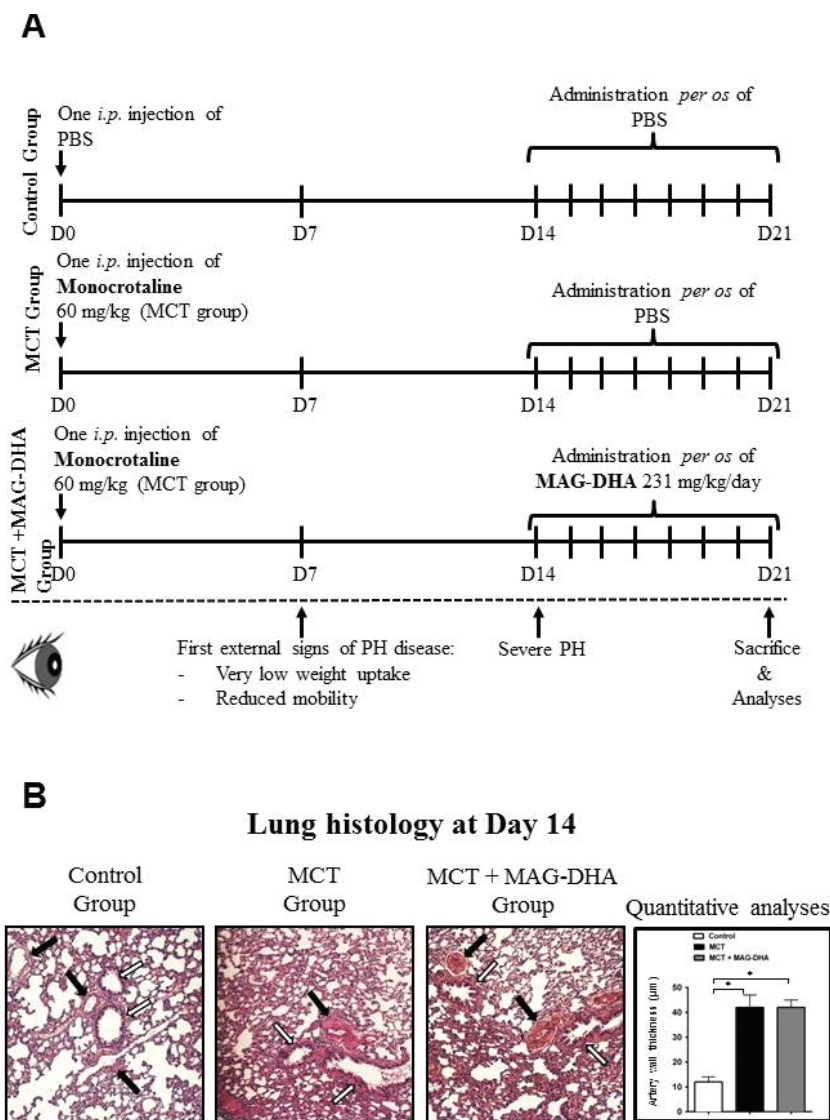
U-46619 was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan). PDBu, Anti-CPI-17, anti-phospho-CPI-17, anti-phospho-c-Jun (Ser63), anti-phospho-c-Fos (Ser32), anti-Cox-2, anti-NF- $\kappa$ B and anti-phospho-NF- $\kappa$ B were purchased from Cedarlane (Burlington, Ontario, Canada). Anti-TNF- $\alpha$  and anti-TMEM16A were purchased from Abcam (Toronto, Ontario, Canada). Antibodies against MYPT-1 and P-MYPT-1 (phosphorylated form of MYPT-1 on Thr 696) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (California, United States). Crotaline (Monocrotaline), Type IV Collagenase and Type IV Elastase were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, United States). DMEM/F-12, penicillin-streptomycin and FBS were obtained from Gibco Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada).

### ***Animal model of pulmonary hypertension (PH).***

The current study involving rats was approved by our institution's Ethics Committee under protocol No. 018-12. Male Wistar rats weighting 250-275 g were acclimated for 7 days prior to the start of the experiments. Rats were randomly assigned into three groups: control (untreated) group, Monocrotaline (MCT)-treated group which received one 60 mg/kg

intraperitoneal injection of Monocrotaline, and the MCT + MAG-DHA group in which MCT-injected rats were treated for 7 days (from D14 to D21) with a daily *per os* administration of 231 mg/kg of MAG-DHA) (Figure 1A). The control groups received equivalent doses of vehicle. The oral dose of 231 mg/kg was chosen in order to obtain the maximum human equivalent allowed by Health Canada which is 3.0 g/day according to Health Canada Draft Guidelines (29). The MCT-induced PH model follows the protocol as described previously by Lalich J. J. and Merkow L., 1961 (19), Huxtable R. J. et al., 1990 (15) and Morin et al., 2014 (21).

At day 22, all rats were euthanized with pentobarbital sodium. Blood was collected by cardiac puncture and hearts and lungs were excised. Right ventricle (RV) weight was measured and compared to the weight of the left ventricle (LV) plus ventricular septum (S). Fulton's index was determined as the weight ratio of  $RV / (LV + S)$ . This index allows to assess induced RV hypertrophy as a result of MCT injection and pulmonary artery wall hypertrophy. Lung arteries were dissected and isometric tension measurements were performed as described below. Pulmonary arteries were also used to isolate smooth muscle cells. Histological analysis of pulmonary artery wall thickness has been performed to determine an average size. Then, media thickness from MCT and MCT + MAG-DHA treated-animals were compared to the control group to assess putative increase. Furthermore, homogenate preparations were performed on lung tissues exactly as previously described (22).



**FIGURE 1: Study design and histological analysis.**

(A) Experimental design and treatments. Three groups of rats were studied: Control, MCT-treated and MCT + MAG-DHA-treated. At day 0 (D0), rats from the Control group were injected *i.p.* with PBS; rats from the two other groups were injected with 60 mg/kg of MCT. At D14, 2 rats from each group were sacrificed and lung tissues were resected, sectioned and stained with hematoxylin-eosin for histological analysis. From D14 to D21, rats from the Control and MCT groups received oral administration of PBS while the MCT + MAG-DHA group received 231 mg/kg MAG-DHA daily. At D21, all animals were sacrificed and tissues processed for comparative pulmonary artery isometric tension measurements, lung histological analysis, lung homogenate preparations and SMC isolation. (B) Histological analysis of lung tissue sections stained with hematoxylin-eosin from Control, MCT and MCT + MAG-DHA-treated groups as well as quantitative analyses of pulmonary artery thickness at day 14, following the injection of MCT at day 0. Black arrow point to pulmonary artery and white arrow to bronchi. Quantification is representative of 10 pulmonary arteries per lung.



### *Isolation of pulmonary arterial smooth muscle (PASM) cells*

Second order pulmonary artery (PA) rings were carefully dissected from rat lungs and incubated for 1 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in **Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, GIBCO)** supplemented with 1% Penicillin-Streptomycin, 0.2% type IV Collagenase and 0.05% type IV Elastase. In order to assess the quality of the smooth muscle cell preparation, immunofluorescence staining with a monoclonal anti-mouse  $\alpha$ -smooth muscle actin antibody and a goat anti-mouse IgG coupled to Alexa-Fluor 488 as secondary antibody was performed and revealed that 95 % of cells were positive for this specific biomarker.

### *Isometric tension measurements*

Fresh distal rat PA rings were dissected from rat lungs. Tension measurements were performed exactly as previously described (25). A basal tension of 0.6 g was applied to each ring. Pharmacomechanical responses induced by specific agonists, including U-46619 and PDBu and 80 mM KCl were assessed on active tensions, using transducer systems coupled to Polyview software (Grass-Astro-Med Inc, West Warwick, RI) enabling to perform data acquisition and analysis. The amplitudes of maximum tensions were expressed for a given agonist concentration (30 nM U-46619 or 1  $\mu$ M PDBu) normalized to the control response to 80 mM KCl for each tested PA ring.

***SDS-PAGE and Western blot analyses***

Microsomal, cytosolic and nuclear fractions were prepared as previously described (24) using tissue homogenates prepared from pulmonary arteries of control and treated animals. Western blots were performed using specific antibodies against membrane and cytosolic proteins (TMEM16A, GPR32, HIF1- $\alpha$  and  $\beta$ -actin proteins) and phosphorylated isoforms of regulatory proteins of the contractile machinery (phospho-CPI-17 and phospho-MYPT-1) as well as pro-inflammatory markers (TNF- $\alpha$  and phospho-p65-NFkB). Blot immunostainings were revealed on Kodak film and subsequently digitized and analyzed using ImageJ software. (24)

***Data presentation and statistical analyses***

Results are expressed as means  $\pm$  SEM, with N indicating the number of rats and n indicating the number of experiments performed or tissues that have been used. Statistical analyses were performed using a Student *t* test or one-way ANOVA with Sigma Plot 12.0 and SPSS 14.0 software (SPSS-Science, Chicago, IL). The ANOVA was followed by Fisher's least significant difference (LSD) test. Differences were considered statistically significant (\*) when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Experimental design and preliminary results.

The DHA metabolite Resolvin D1 has recently been shown to reduce inflammation markers and hyperreactivity in human pulmonary artery upon *in vitro* treatment (12). To strengthen these reports, the current experimental series were performed on tissues from an *in vivo* rat model of pulmonary hypertension. Control group rats were injected with PBS *i.p.* at day 0 (D0) while two other sets of rats (MCT group and MCT + MAG-DHA group) were injected *i.p.* with 60 mg/kg of MCT at day 0 and observed during 14 days.

From day 14 to day 21, the animals were administered either *per os* PBS (Control and MCT groups) or 231 mg/kg of MAG-DHA daily (MCT+MAG-DHA group) (Figure 1A).

To assess the state and severity of pulmonary hypertension prior to MAG-DHA treatments, parallel sets of rats from each group were sacrificed at day 14.

Figure 1 B represents typical histological sections of rat lungs from Control, MCT and MCT + MAG-DHA groups at day 14. Quantitative analysis of pulmonary artery wall thickness revealed that at 14 days, MCT treatment induced a significant increase in wall thickness in comparison to rat pulmonary artery from the Control group.

The morphometry and histology of pulmonary arteries from the MCT + MAG-DHA group (MAG-DHA not yet administered) were identical to those from the MCT group at day 14.

**MAG-DHA reverses induction of right ventricular hypertrophy induced by Monocrotaline.**

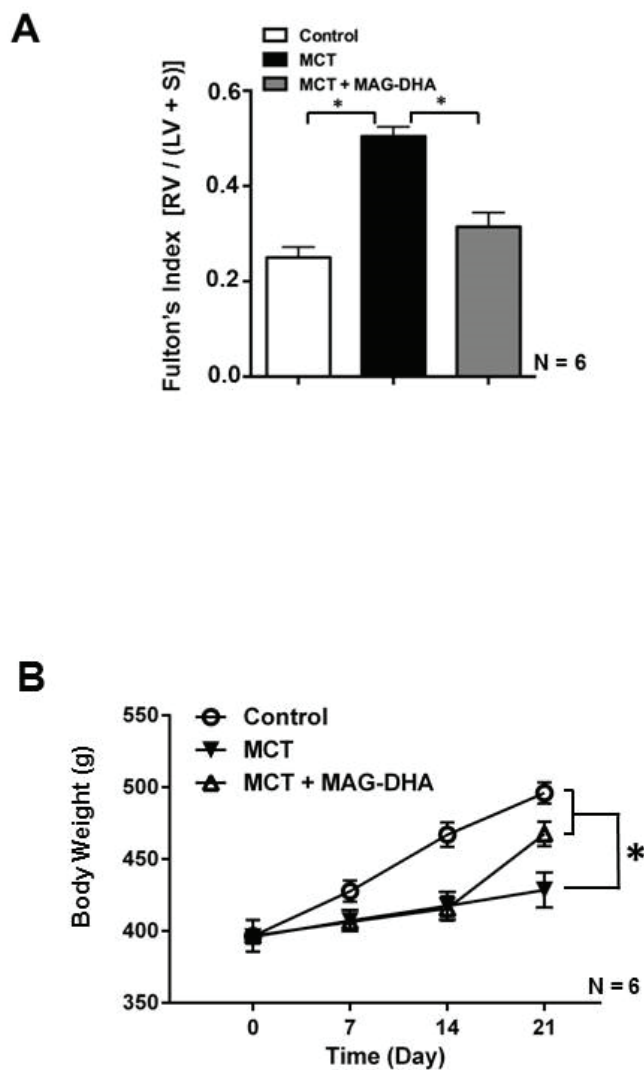
From day 14 to day 21, the three groups of rats were treated as described above and in [Figure 1 A](#). The animals from the first two groups received PBS, while the animals from the third group received daily doses of MAG-DHA. All rats were sacrificed at day 21.

Figure 2 A represents bar graphs of the Fulton's Index, calculated according to the equation linking right ventricular weight (RV) over left ventricular (LV) plus septum weight (S) and given by

$$\text{Fulton's Index} = \text{RV (g)} / (\text{LV} + \text{SEPTUM}) \text{ (g)}$$

In comparison to control condition, MCT injection induced a significant increase in Fulton's Index, suggesting significant hypertrophy of the right ventricle due to MCT-triggered pulmonary hypertension in the microvessels. Daily ingestion of MAG-DHA for 7 days (D14 to D21) significantly reversed this hypertrophy with Fulton's index returning toward mean control values.

[Figure 2 B](#) displays the weight curve from day 0 to day 21. The results indicate that control rats consistently gained weight from 400 g (day 0) to 495 g (day 21) on average. However, during the first fourteen days under MCT, rats had a lower weight gain (of approximately 25 g). In contrast, rats treated with MAG-DHA for 7 days gained 50 g, which was twice as much as the recorded growth of MCT-treated rats over the same period.



**FIGURE 2: Effect of MCT and MAG-DHA on Fulton's index and body weight changes as a function of time.**

(A) The Fulton's index (ratio of right ventricular weight over left ventricular + septum weight) was calculated to assess right ventricular (RV) hypertrophy following MCT treatment and RV normalization following MAG-DHA treatment.

(B) Body weight (g) expressed as a function of time (day) was measured in Control, MCT- and MCT + MAG-DHA- treated rats. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m (N = 6 rats per group). (\*  $p < 0.05$ ).

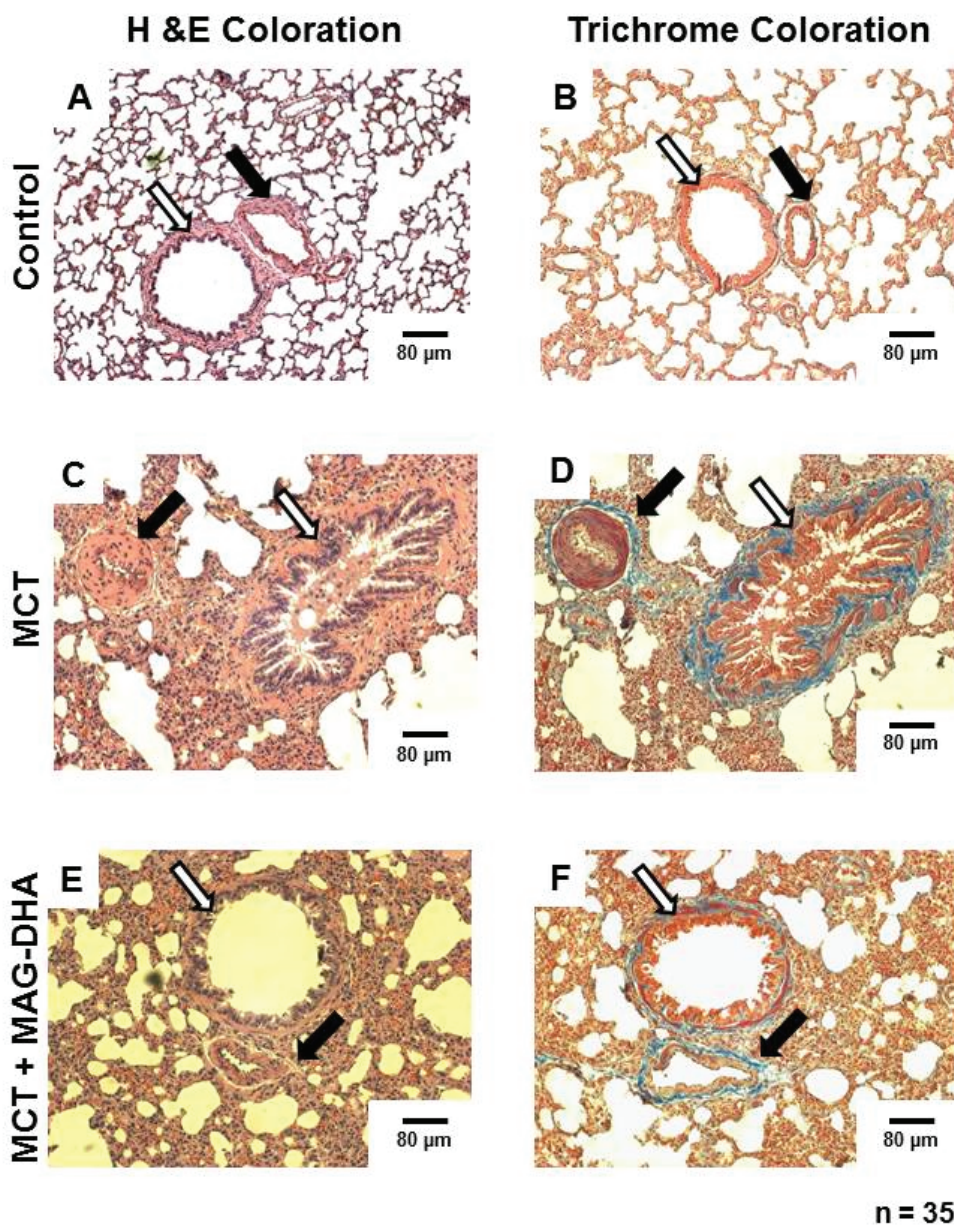
**MAG-DHA reverses the histological effects induced by MCT.**

Twenty-one days after MCT injection, all rats were sacrificed and lungs were excised and samples fixed in 4% paraformaldehyde during 48 h.

Thin sections were subsequently prepared and stained with Hematoxylin-Eosin to identify nuclei and eosinophilic structures while Masson's Trichrome staining was used to differentiate muscle fibers from collagen. [Figure 3](#) represents typical histological sections from the three groups of rats: control rats (untreated) ([Fig. 3A and B](#)), MCT-treated rats ([Fig. 3C and D](#)), and MCT + MAG-DHA-treated rat ([Fig. 3E and F](#)). Compared to control, lungs from MCT-treated rats displayed several histological differences as well as heterogeneity in parenchymal organization.

Alveoli were larger although less numerous than in control condition. Pulmonary artery walls appeared to be hypertrophied in MCT condition suggesting an abnormal proliferation of smooth muscle cells in the media. The endothelial layer was also disorganized and hypertrophied. The lumen appeared to be closed when compared to the diameter observed in control pulmonary artery. Of note, 7-day treatment with MAG-DHA partially reversed the above histological changes initially induced by MCT injection.

Consequently, following MAG-DHA treatment, the overall structure of lung tissues closely resembled that documented under control condition, suggesting a potential reversibility of the severe morphological and functional changes associated with MCT-induced PH.



**FIGURE 3: Histological analysis of rat lungs at day 21 under various experimental conditions.**

Photomicrographs of hematoxylin and eosin (H&E)-stained (**panels A, C and E**) and Masson's Trichrome-stained (**panels B, D and F**) thin sections from rat lungs showing the morphological changes of medial thickness of the pulmonary arterial wall in tissues from Control, MCT- and MCT + MAG-DHA- treated rats. Black arrow = Pulmonary artery. White arrow = Bronchi. Scale Bar = 80  $\mu$ m. (\*  $n = 25, p < 0.05$ )

**MAG-DHA treatment reverses media hypertrophy and pulmonary artery hyper-responsiveness induced by MCT treatment.**

Figure 4A shows that MCT treatment induced a significant increase in media thickness with a mean thickness of  $48 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$  compared to  $12 \mu\text{m} \pm 3 \mu\text{m}$  observed in control rats. A 7-day treatment with MAG-DHA was sufficient to resolve and basically reverse the hypertrophy induced by MCT treatment, with a resulting mean media artery thickness of  $20 \pm 3 \mu\text{m}$  following MAG-DHA administration.

In conjunction with the histological analyses, this increase in pulmonary artery wall thickness is thus indicative of a proliferation of smooth muscle cells and an increase in the ability to develop an over-contractility and pressure.

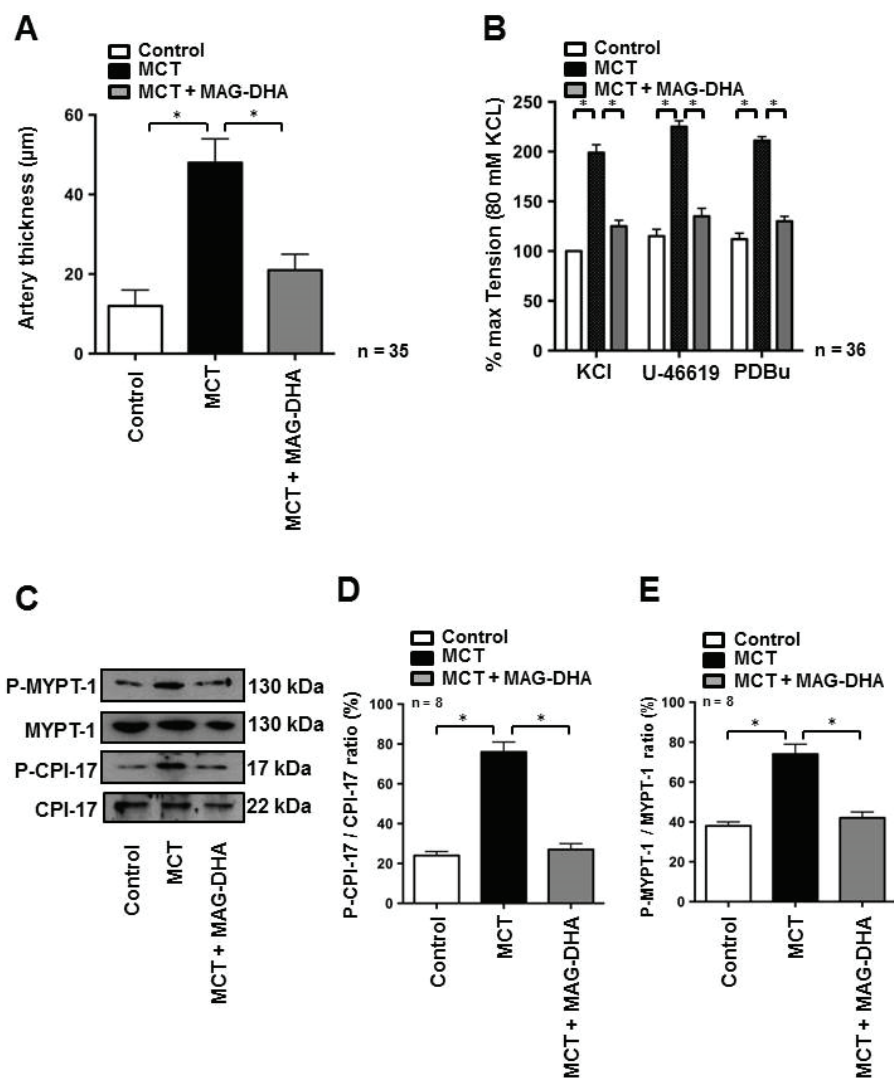
Given the above, we next assessed the contractile and pharmacological properties of pulmonary arteries obtained from the various rat groups. After a 45-min equilibration period, pulmonary arteries were sequentially stimulated with 80 mM KCl, 30 nM U-46619 and 1  $\mu\text{M}$  PDBu for 10 min respectively, followed by 45 min washouts periods after each stimulus. Figure 4B depicts the relative amplitudes of the responses to all three stimuli. On average, pulmonary arteries from MCT-treated rats were significantly more reactive than those of the control group with tension developed by the MCT group reaching twice the values of the control group.

Conversely, MAG-DHA normalized the contractile responses triggered by KCl, U-46619 and PDBu, as well as reversed the over-reactivity developed by pulmonary arteries from the MCT-treated group (Figure 4B).



The phosphorylation levels of regulatory proteins of the contractile machinery were also measured. [Figures 4C, D and E](#) reveal that two phosphoproteins (namely P-CPI-17 and P-MYPT-1) were enhanced by MCT treatment and that the phosphorylation ratio of P-CPI-17/CPI-17 and P-MYPT-1/MYPT-1 was significantly increased in pulmonary arteries from MCT-treated rats compared to control condition ([Figure 4D and E](#)).

MAG-DHA treatment following MCT injection consistently induced a significant reduction of these ratios, leading to mean values nearing those observed under control condition ([Figure 4D and E](#)).



**FIGURE 4: Effect of MAG-DHA on mean pulmonary artery wall thickness and contractility in MCT-treated rats.**

(A) Vascular wall thickness of rat pulmonary arteries under Control, MCT- or MCT + MAG-DHA- treated conditions was measured and expressed in  $\mu\text{m}$  (\*  $n = 35$ ,  $P < 0.05$ ).

(B) Representative recordings of the mechanical tension induced by 80 mM KCl, 30 nM U46619 and 1  $\mu\text{M}$  PDBu on fresh pulmonary arteries microdissected from rat lungs of Control, MCT- and MCT + MAG-DHA-treated animals (\*  $n = 18$ ,  $P < 0.05$ ). Of note all mechanical tensions were normalized to the KCl responses, which in control condition resulted in an average tension of  $0.32 \pm 0.03$  g.

(C) Western blot analysis of lung homogenate fractions from Control, MCT- and MCT + MAG-DHA-treated rats using specific antibodies against Phospho-MYPT-1, MYPT-1, Phospho-CPI-17 and CPI-17.

(D) Quantitative analysis of CPI-17 and (E) MYPT-1 phosphorylation levels expressed as a ratio of the total molecules. (\*  $n = 8$ ,  $P < 0.05$ )

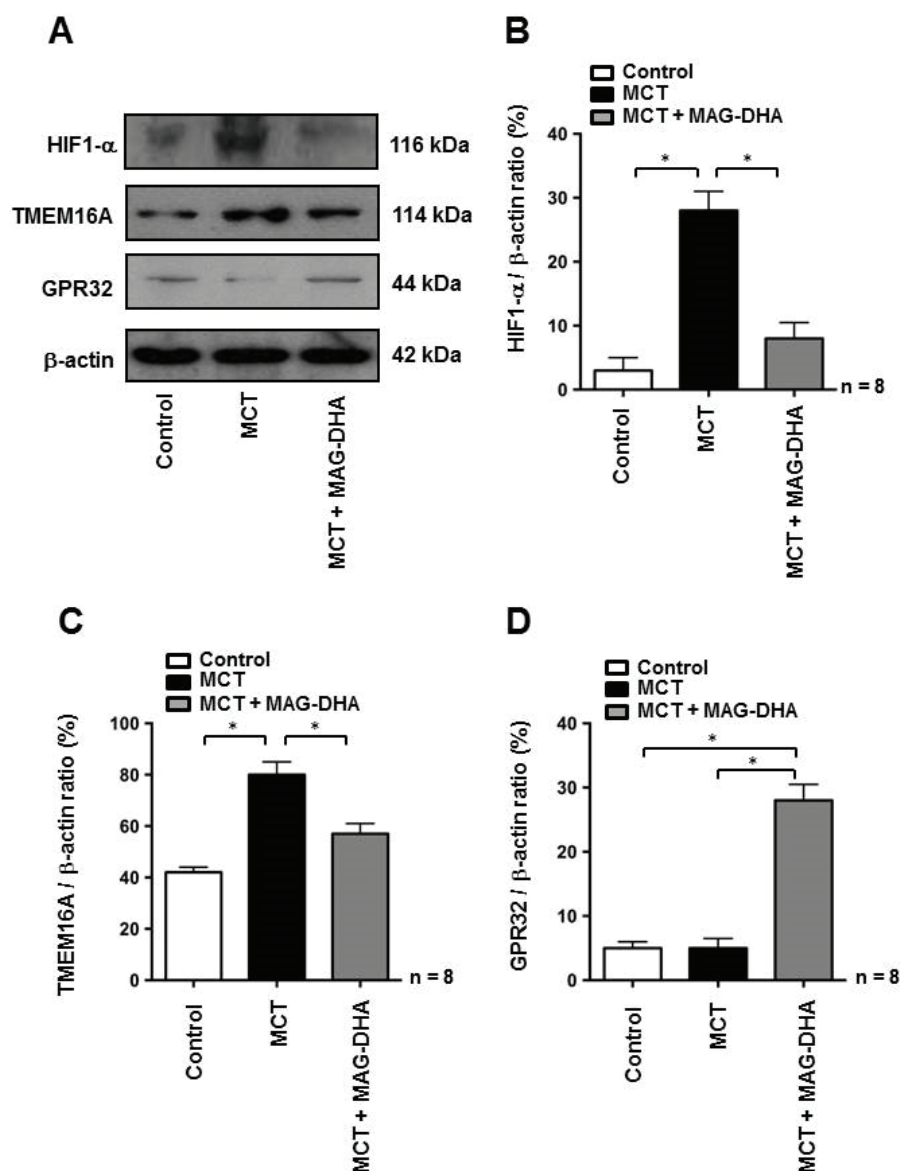
### **Pharmacological treatment regulates the expression of biological markers of pulmonary hypertension.**

In pulmonary hypertension, HIF1- $\alpha$  is rapidly internalized into the nucleus under hypoxic conditions in order to activate and up-regulate target genes that promote cell response to hypoxia while TMEM16A has been described as a biomarker of the disease because of its enhanced expression in the membrane of PASM cells (5).

In a previous study, we also demonstrated that MAG-DHA needs to be metabolized to exert its beneficial action, and that one of its metabolites, resolving D1 (RvD1), leads an enhanced expression of GPR32 (12), previously identified as the RvD1 receptor (38). In order to further assess the manner in which MAG-DHA may counteract the effects of MCT treatment on the expression of these key biological markers, PASM cell lysates were fractionated using differential ultracentrifugations from which microsomal fractions were used to detect expression of membrane proteins (TMEM16A and GPR32) while cytosolic fractions were used to detect the expression of HIF1- $\alpha$ . [Figure 5A and B](#) demonstrate that compared to control rats, HIF1- $\alpha$  was highly detected in the nucleus of PASM cells of MCT-treated rats, whereas MAG-DHA treatment significantly reduced the expression of HIF1- $\alpha$  to a level similar to the control condition.

TMEM16A protein detection ([Figure 5A and C](#)) was also enhanced under MCT condition when compared to controls, while addition of MAG-DHA significantly reversed this overexpression toward control values. In contrast, GPR32 protein ([Figure 5A and D](#)) was expressed at low levels in both control and MCT conditions. However, MAG-DHA treatment in MCT rats induced a large increase in GPR32 detection in the microsomal

fraction of PASM cells. These results confirm that MCT treatment induced a net increase in pulmonary hypertension biomarkers while 7 days of MAG-DHA treatment resulted in a significant decreased detection of HIF1- $\alpha$ , TMEM16A and GPR32 (RvD1 receptor). Thus MAG-DHA appears to resolve the MCT-induced effects on histological and biochemical markers via the action of its D-series metabolites as attested by the enhanced expression of GPR32 (14).

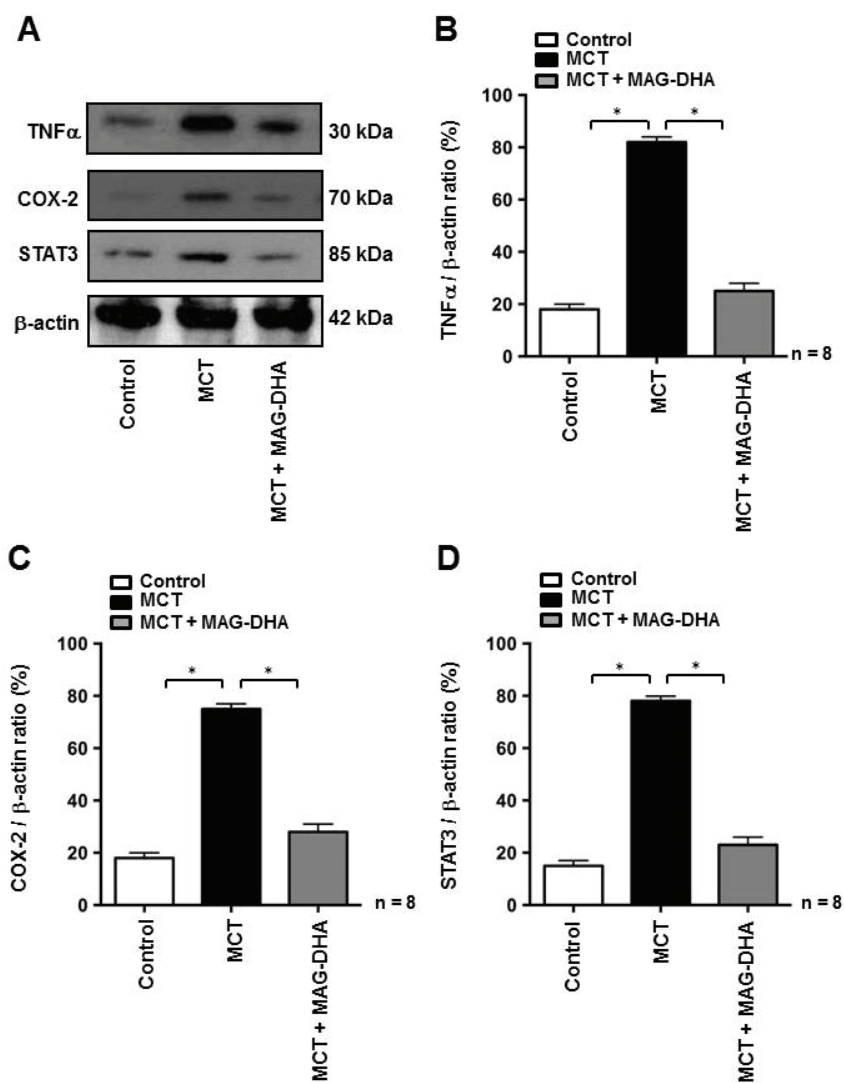


**FIGURE 5: Effect of MAG-DHA on HIF1- $\alpha$ , TMEM16 and GPR32 protein detection.**

(**A and B**) Western blot analyses were performed using antibodies against HIF1- $\alpha$  on cytosolic fractions of cell lysates isolated from pulmonary arteries of rats treated under Control, MCT and MCT + MAG-DHA conditions. Relative detection of HIF1- $\alpha$  was expressed as a function of cytosolic  $\beta$ -actin (**B**). (**A and C**) Western blot analyses were performed using antibodies against TMEM16A from microsomal fractions of cell lysates isolated under the same conditions as described above. Results are expressed as the relative TMEM16A /  $\beta$ -actin ratio. (**A and D**) Western blot analyses using antibodies against the GPR32 receptor were performed from microsomal fractions of cell lysates from pulmonary arteries of rats treated under the same conditions as described above (\* n = 8,  $P < 0.05$ ).

**Inflammatory markers are also up-regulated in pulmonary hypertension.**

Given that pulmonary arteries from patients with thromboembolic PH have been reported to display a number of enhanced pro-inflammatory markers (39), including the signaling molecules TNF- $\alpha$ , COX-2 and STAT3 (8, 10), these latter biomarkers were also investigated in the current experimental model. TNF- $\alpha$  has been shown to reduce prostacyclin production and to increase other proinflammatory cytokines secretion in pulmonary artery tissues (16). As a key modulator of the aggravation of pulmonary hypertension, the expression of TNF $\alpha$  has been investigated in the present study. Our results show that, compared to the control condition, MCT treatment induced an increase in TNF- $\alpha$  (Figure 6A and B), COX-2 (Figure 6A and C) and STAT3 (Figure 6A and D) expression levels, whereas MAG-DHA treatment lowered the expression level of these pro-inflammatory biomarkers. Moreover, when TNF- $\alpha$ , COX-2 or STAT3 (which is activated by IL-6) are concomitantly increased, these biomarkers stimulate various signaling pathways among which include the nuclear factors NK- $\kappa$ B and AP1. These two nuclear transcription factors have previously been shown to play an important role in stimulating the expression of inflammatory cytokines involved in pulmonary artery remodeling, thus increasing the severity of PA disease (28).



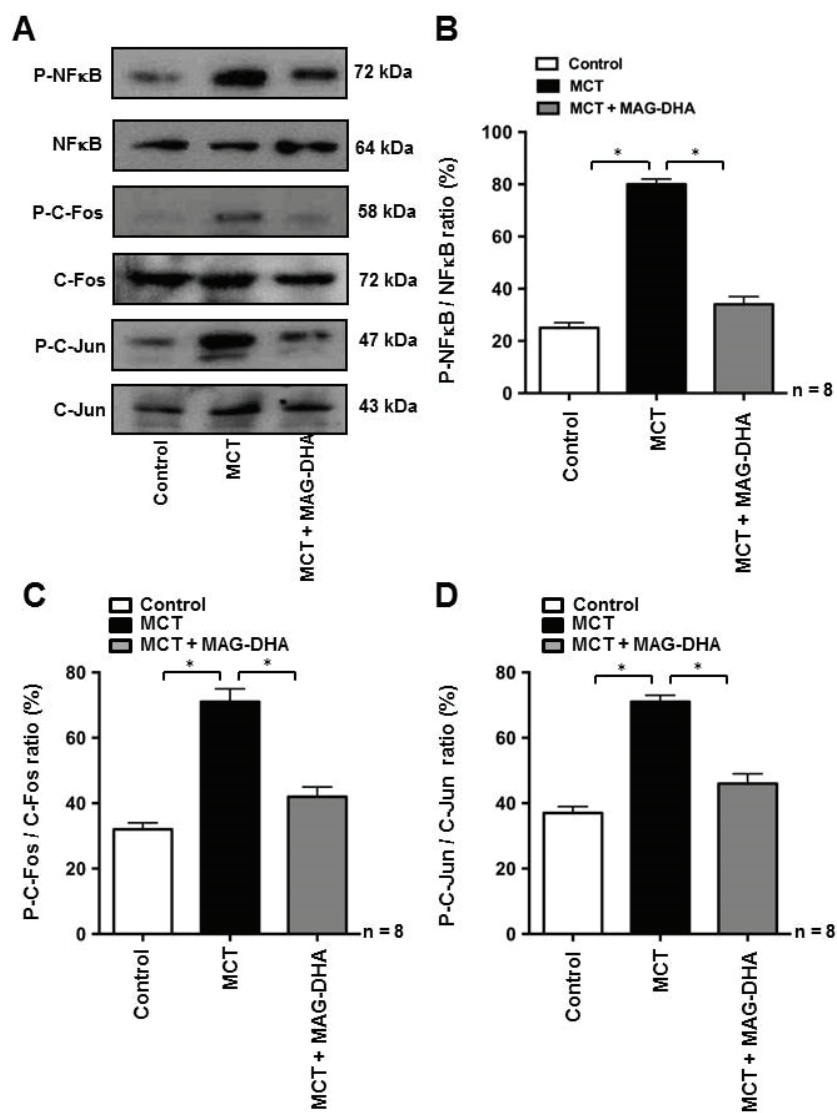
**FIGURE 6: Resolving effects of MAG-DHA on the detection of inflammatory biomarkers.**

(A) Western blot analyses were performed using antibodies against TNF- $\alpha$ , COX-2, STAT3 and  $\beta$ -actin from rat pulmonary artery homogenates.

(B), (C) and (D) represent the respective quantitative analyses of the expression level of these pro-inflammatory markers in control, MCT or MCT + MAG-DHA-treated conditions, expressed as a ratio with  $\beta$ -actin. (\* n = 8,  $P < 0.05$ )

Results obtained in nuclear fractions show that compared to control, MCT treatment induced an increase in the phosphorylation level of NF- $\kappa$ B, while 7-day treatment with MAG-DHA significantly reduced this level, leading to values approximating those observed in controls (Figure 7A and 7B). Data also show that compared to the control condition, MCT treatment increased the phosphorylation levels of both c-Fos and c-Jun, the levels of which were subsequently normalized following MAG-DHA treatment (Figure 7A, C and D). Together these data suggest that MAG-DHA treatments are able to normalize most of the biochemical and functional changes induced by MCT.





**FIGURE 7: Effects of MAG-DHA on the detection of three pro-inflammatory nuclear factors.**

(A) Western blot analyses were performed on nuclear fractions from homogenates, using specific antibodies against NFκB, C-Fos, C-Jun and their respective phosphorylated forms in control, MCT or MCT + MAG-DHA-treated groups. Relative quantitative analyses were performed and expressed as (B) P-NFκB/NFκB, (C) P-C-Fos/C-Fos and (D) P-C-Jun/C-Jun ratios (\* n = 8,  $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

In the present report, we investigated the *in vivo* ability of MAG-DHA to resolve inflammatory biomarkers and pulmonary artery over-reactivity as well as its ability to curb the abnormal inflammatory status, increased artery vasoconstriction and PASM cell over-reactivity in an *in vivo* rat model of MCT-induced pulmonary hypertension. Fourteen days after the MCT injection, rats developed several characteristics of pulmonary artery hypertension as indicated by the Fulton's index and histological assessment as well as the observed weight loss. After a 7-day MAG-DHA treatment, the Fulton's index returned to normal values and the mean weight loss was largely corrected.

MAG-DHA is neutral lipid which is very well absorbed by tissues (7) and becomes a DHA donor upon the action of MAG-lipase and the precursor of several omega-3 derivatives such as resolvins and protectins upon the action of 15-LOX and 5-LOX (14). Resolvins have been reported to reduce pro-inflammatory markers (11, 12), namely TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and to prevent systemic hypertension in rats (23). Furthermore, RvD1, a trihydroxylated DHA derivative, has recently been reported to reverse the pharmacological reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by ET-1 and IL-6 in human pulmonary artery (12).

Our current data further demonstrate that in an induced model of pulmonary hypertension, MAG-DHA was able to reverse the pathological remodeling of the pulmonary artery wall, as well as the concomitant pharmacological over-reactivity. Moreover, specific inflammatory biomarkers such as TNF $\alpha$ , COX-2 and STAT3 were significantly reduced to prevent the typical underlying events related to the pathophysiology of the disease.

### ***1. Induction of PH by Monocrotaline.***

Monocrotaline (MCT) is a pyrrolizidine alkaloid from *Crotalaria spectabilis* which is activated in the liver into monocrotaline pyrrole and transferred to the lung where it induces chronic pneumotoxic effects (15, 37) characterized by increased synthesis of pro-inflammatory cytokines leading to macroscopic and microscopic changes such as parenchymal infiltration fibrosis, PASM cell proliferation and pulmonary artery wall hypertrophy (36, 37). Severe pulmonary hypertension is subsequently observed and is consistent with an increased vasoconstriction, related to an enhanced blood pressure (confirmed by an increased expression of markers of hypoxia such as HIF-1 $\alpha$ ) and induced right ventricular hypertrophy which can trigger heart failure and sudden death (18, 36).

In the adventitia constituting the outer layer of the pulmonary artery, enhanced pro-inflammatory markers appear as a common denominator to multiple events which are in turn triggered and contribute to the severity of PH. It has been reported that the accumulation of cytokines and chemokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 is a key phenomenon in the genesis of the disease (28). These agents control and regulate a wide network of intracellular signaling pathways such as NF $\kappa$ B, STAT3, c-Fos and c-Jun dependent pathways (36), that are directly involved in the activation and expression of genes such as COX-2 (16), known to initiate cell proliferation, extracellular matrix disorganization, abnormal vascular growth and remodeling (8).

Much of the current medications and therapeutic strategies used to treat patients primarily target endothelial dysfunctions related to PH, in order to facilitate PASM cell relaxation and pulmonary artery dilatation (14).

However, there is no eradication of the disease; moreover, specific lung inflammation has paradoxically not been targeted, whether it be to change the course or to cure PH. Consequently, there is a clinical gap in terms of proposing new therapeutic strategies and in designing specific clinical studies.

## ***2. Resolving effects of MAG-DHA.***

N-3 PUFAs have been demonstrated to trigger anti-inflammatory effects in various diseases such as rheumatoid arthritis (17), neurodegenerative diseases (4), asthma (25) and more recently, pulmonary hypertension (22). In the present study, we uncovered the ability of MAG-DHA to alleviate inflammation, pulmonary artery remodeling and pharmacomechanical over-reactivity using an *in vivo* rat model of MCT-induced pulmonary hypertension. The monoacylglyceride form of DHA increases the bioavailability of this long chain omega-3 fatty acid, thus enabling to overcome the limited half-life of the negatively charged compound. Furthermore, the beneficial effects of DHA have been reported in several studies aimed at the prevention of cardiovascular diseases (1, 26 and 34). Hence, our present study depicts an original approach to investigate the curative role of DHA or one of its metabolites in PH.

### ***2.a. MAG-DHA resolves inflammation in MCT rats.***

Our data reveal that curative treatment with MAG-DHA was able to reverse the MCT-induced increase in TNF- $\alpha$  expression in rat lungs.

Furthermore, as previously proposed in a recent report which investigated the role of another N-3 PUFA, namely MAG-DPA (22), and regarding the cascade of the various genes involved in artery wall remodeling and PASM cell dysfunction, NF $\kappa$ B appears to be of key importance as a mediator from which MAG-DHA or its metabolites, such as D-series resolvins, may trigger beneficial effects through specific receptors, notably the RvD1 receptor GPR32. Of note, the expression of this specific receptor was largely enhanced following MAG-DHA treatment (as shown on Fig 5D). This observation confirms a previous report suggesting that GPR32 is induced by the presence of omega-3 derivatives in various tissues (12).

Further studies are nonetheless needed to confirm the central role of the NF- $\kappa$ B signaling pathway and to assess the expression of specific gene products and/or to describe the evolution of PH in MCT and hypoxic rats with a knocked-out NF- $\kappa$ B gene. The regulation of gene activation involved in the remodeling of the pulmonary artery represents another issue that needs to be addressed to curb the worsening of PH.

### 2.b. Curative effects of MAG-DHA on pulmonary artery morphology and reactivity.

In the present study, MCT treatment induced significant modifications in lung histology when compared to thin sections from control rats. In addition to increased artery thickness, pulmonary arteries became over-reactive in response to pharmacological stimuli. While the mechanisms by which MAG-DHA interacts with the contractile machinery remain unclear, recent studies have nevertheless proposed relevant modes of action that could explain the cellular signals that are activated or inhibited by DHA and thus potentially participate in its

beneficial effects (17, 34 and 35). Of these include the aforementioned trihydroxylated DHA metabolites such as RvD1-RvD4 (38). The RvD1 receptor or GPR32 has indeed been described to be overexpressed when arteries are treated with RvD1 (12). Moreover, GPR32 has been reported to be a key receptor by which RvD1 can control expression of miRNAs to activate or inhibit expression of anti-inflammatory or proinflammatory agents, respectively (30).

Our data revealed that GPR32 detection was lowered in MCT rat lung artery, whereas MAG-DHA treatment enhanced the expression of GPR32, thus suggesting that RvD1 may have been produced under this condition in order to interact with intracellular signals to resolve the inflammatory-induced dysfunctions and ultimately normalize artery reactivity. MAG-DHA could be further investigated as a potential preventive or curative treatment in the resolution of the remodeling events in vascular diseases.

### ***3. Limitations of the study.***

The design of the present study differs from the usual investigations performed in our laboratory regarding the effect of N-3 PUFAs on an *in vivo* rat model of MCT-induced PH, because of the curative nature of the current study. The data reported herein offer valuable mechanistic insight into the putative modes of action of MAG-DHA, or its derivatives, on pulmonary artery inflammation, wall remodeling and pharmacological reactivity.

However, the precise signaling pathways remain to be ascertained. Consequently, complementary studies will be required to delineate key proteins and secondary messengers involved in the regulation and resolution of inflammation in this model. While the influence of N-3 PUFAs on miRNA regulation has recently been assessed, the exact

signaling pathways remain to be identified (30). Another limitation of our study was the absence of tension measurements in pulmonary artery in the absence and presence of MAG-DHA; this issue will be the topic of an ancillary project.

#### ***4. Short term Perspective.***

It would be relevant to perform the detection of resolvins in blood and lung tissues in order to ascertain whether MAG-DHA could play its beneficial effects via its bioactive metabolites such as D-series resolvins, as suggested in a previous *in vitro* study on human pulmonary artery (12).

However it is important to note that Resolvins D1, D2 and D3 usually display short lifetimes. Thus, it may prove difficult to measure their respective plasma concentrations in the *in vivo* rat model used.

#### ***5. Conclusion***

The present study attests that MAG-DHA is able to reverse *in vivo* pulmonary hypertension induced by MCT-treatment in a rat model. Expression levels of specific proteins involved in inter- and intracellular signaling (TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B, STAT3), remodeling (COX-2, c-Fos, c-Jun) and mechanical reactivity (P-CPI-17, P-MYPT-1) were moreover normalized following MAG-DHA curative treatment. Altogether, the present data, as well as the demonstrated bioavailability and low toxicity of its derivatives (6, 12), suggest that MAG-DHA could represent a potential new therapeutic precursor in resolving inflammatory status in pulmonary hypertension.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Mr. Pierre Pothier for critical review of the manuscript. This work was supported by a grant from the Heart and Stroke Foundation of Canada/Quebec to Eric Rousseau and Caroline Morin. Roddy Hiram is the recipient of a studentship from the Health Respiratory Training Program of Quebec supported by the CIHR.

**CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT:**

The authors have declared no conflicts of interests. Samuel Fortin is the owner of SCF Pharma, which has an exclusive worldwide license of the patented compositions and uses of MAG-DHA.



**REFERENCES**

- 1- Andrade, P.M. Effects of the fish-oil supplementation on the immune and inflammatory responses in elite swimmers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007;. 77(3-4): p. 139-45.
- 2- Brown LM, Chen H, Halpern S. Delay in recognition of pulmonary arterial hypertension: factors identified from the REVEAL Registry. *Chest* 2011; 140:19.
- 3- Calder PC. N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(6): S1505-15195.
- 4- Eckert G.P, Lipka U., Muller W.E. Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: focus on mitochondria. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013; 88(1): 105-114.
- 5- Forrest A.S., Joyce T.C., Huebner M.L., Ayon R.J., Wiwchar M., Joyce J., Freitas N., Davis A.J., Ye L., Duan D.D., Singer C.A., Valencik M.L., Greenwood I.A., Leblanc N. Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension. *American J Physiol - Cell Physiol*. 2012; 303(12): C1229-C1243.
- 6- Fortin S. Compositions comprising polyunsaturated fatty acids monoglycerides or derivatives thereof, and uses thereof. *US patents*. 2012 819690 and 8222295.
- 7- Fortin S, Polyunsaturated fatty acid monoglycerides, derivatives, and uses thereof, CA2672513, 2008, CA2677670, 2010, US8119690, 2011.
- 8- Fredenburgh L.E., Ma J., Perrella M. A. COX-2 inhibition and hypoxia-induced pulmonary hypertension: effects on pulmonary vascular remodeling and contractility. *Trends Cardiovasc Med*. 2009; 19(2):31-37.

- 9- Galiè N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC, Klepetko W, McGoon MD, McLaughlin VV, Preston IR, Rubin LJ, Sandoval J, Seeger W, Keogh A. Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62(25 Suppl):D60-72.
- 10- Groth A., Vrugt B., Brock M., Speich R., Ulrich S., Huber L.C. Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension. *Respiratory Research*. 2014; 15:47.
- 11- Hiram R, Rizcallah E, Marouan S, Sirois C, Sirois M, Morin C, Fortin S, Rousseau E. Resolvin E1 normalizes contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and smooth muscle cell migration rate in TNF- $\alpha$ - and IL-6-pretreated Human Pulmonary Arteries. *Am. J. Physiol: Lung Cell and Mol Physiol*. 2015; DOI: 10.1152/ajpling.00177.2015.
- 12- Hiram R, Rizcallah E, Sirois C, Sirois M, Morin C, Fortin S, Rousseau E. Resolvin D1 reverses reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by ET-1, TNF- $\alpha$  and IL-6 in human pulmonary artery. *Am. J. Physiol. Heart and Circulatory Physiology*. 2014; DOI: 25281570/ ajpheart.00452.2014.
- 13- Hoeper MM. The new definition of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009; 34:790-791.
- 14- Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62(25 Suppl):D42-50.
- 15- Huxtable RJ. Activation and pulmonary toxicity pyrrolizidine alkaloids. 1990; 47:371-389.
- 16- Itoh A, Nishihira J, Makita H, Miyamoto K, Yamaguchi E, Nishimura M. Effects of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and macrophage migration inhibitory factor on prostacyclin

- synthesis in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Respirology*. 2003; 8(4): 467-472.
- 17-**Kähler CM, Colleselli D. Pulmonary arterial hypertension associated to connective tissue diseases. *Rheumatology*. 2006; 45:11111-11113.
- 18-**Kay JM, Heath D. *Crotalaria spectabilis: The Pulmonary Hypertension Plant*. 1969, Thomas, Springfield, IL.
- 19-**Lalich J.J, Merkow L. Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest* 1961; 10: 744-50.
- 20-**Lincoln T.M. Myosin Phosphatase Regulatory Pathways: Different Functions or Redundant Functions. *Circulation Research*. 2007; 100:10-12.
- 21-**Morin C, Fortin S, Rousseau E. Docosahexaenoic Acid Monoacylglyceride Decreases Endothelin-1 Induced  $Ca^{2+}$  Sensitivity and Proliferation in Human Pulmonary Arteries. *Am J Hypertens*. 2012; 7: 757-763.
- 22-**Morin C, Hiram R, Rousseau E, Blier P, Fortin S. Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Heart and Circulatory Physiology*. 2014; 307(4): H574-86.
- 23-**Morin C, Rousseau E, Blier PU, Fortin S. Effect of docosahexaenoic acid monoacylglyceride on systemic hypertension and cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 309(1):H93-H102.
- 24-**Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes M. M, Rousseau E. EET displays anti-inflammatory effects in TNF-alpha stimulated human bronchi: putative role of CPI-17. *American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology*. 2009; 38(2):192-201.

- 25-** Morin C, Sirois M, Echave V, Rizcallah E, Rousseau E. Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *American Journal of Physiology*. 2009; 296: L130-L139.
- 26-** Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*. 2011 ; 58 (20): 2047-2046.
- 27-** Nauser TD, Stites SW. Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *Am Fam Physician*. 2001; 63(9):1789-1799.
- 28-** Price CL, Wort JS, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest*. 2012; 141(1):210-221.
- 29-** Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008; 22: 659-661.
- 30-** Recchiuti A., Krishnamoorthy S., Fredman G., Chiang N., Serhan C.N. MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvin D1-miRNA circuits. *FASEB J*. 2011; 25(2): 544-60.
- 31-** Rodat-Despoix L, Aires V, Ducret T, Marthan R, Savineau J. P, Rousseau E, Guibert C. Signalling pathways involved in the contractile response to 5-HT in human pulmonary artery. *European Respiratory Journal*. 2009; 34(6): 1338-1347.
- 32-** 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, Krowka M. J, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009, 54:S43-54.

- 33-** Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med.* 1991; 114:464-469.
- 34-** Swanson D, Block R, Mousa S. A. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in nutrition Journal.* 2012, 3:1-7.
- 35-** Uddin M. and Levy B. Resolvins: Natural agonists for resolution of pulmonary inflammation. *Progress in Lipid.* 2011; 50: 75-88.
- 36-** Wang Q, Zuo XR, Wang YY, Xie WP , Wang H, Zhang M. Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension is attenuated by TNF- $\alpha$  antagonists via the suppression of TNF- $\alpha$  expression and NF- $\kappa$ B pathway in rats. *Vascul Pharmacol.* 2013; 58 (1-2):71-77.
- 37-** Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Lame MW, Estep JE, Morin D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 1992; 22:307-25.
- 38-** Xu Z. Z., Zhang L., Liu T., Park J. Y., Berta T., Yang R., Serhan C. N., Ji R. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central peripheral actions. *Nat Med.* 2010; 16(5):592-597.
- 39-** Zabini D., Heinemann A., Foris V., Nagaraj C., Nierlich P., Balint Z., Kwapiszewska G., Lang I.M., Klepetko W., Olschewski H., Olschewski A. Comprehensive analysis of inflammatory markers in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Resp J.* 2014; 44(4) 951-962.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

L'ensemble des données obtenues et présentées dans ces trois articles a permis de mieux comprendre le mode d'action des Résolvines D1, E1 et leurs précurseurs respectifs le MAG-DHA et le MAG-EPA dans le contexte de l'hypertension artérielle pulmonaire.

Les modèles expérimentaux impliquant d'une part les artères pulmonaires humaines et d'autre part les rats traités à la monocrotaline, offrent des outils efficaces d'investigation qui ont également permis une bonne reproductibilité expérimentale.

Les stimulus pharmacologiques utilisés *in vitro* tels que le U-46619, le PDBu et le 5-HT sont augmentés dans l'HTAP, ce qui renforce la crédibilité des expériences, des résultats et de l'interprétation qui pourrait en être faite à l'échelle clinique.

En mimant des conditions présentes dans la physiopathologie de l'HTAP, un statut pro-inflammatoire et l'excès de production d'agents vasoconstricteurs ont respectivement permis d'observer que le TNF $\alpha$  et/ou l'IL-6 ainsi que l'ET-1, peuvent induire une augmentation du remodelage de la paroi artérielle ainsi qu'une hyperréactivité pharmacologique à différents agonistes et une hypersensibilité calcique des cellules musculaires lisses de la paroi des artères pulmonaires humaines.

De plus, nos travaux ont démontré que le MAG-DHA et le MAG-EPA doivent être métabolisés pour exercer leur effet de résolution contre les marqueurs de l'inflammation étudiés. Parmi leurs métabolites connus, la RvD1 et la RvE1 jugulent les effets de l'inflammation et normalisent la tonicité artérielle pulmonaire, la sensibilité au calcium et la migration des cellules musculaires.

Les Résolvines influencent l'expression de gènes codant pour le MMP9, la COX-2 et le VEGF, qui sont directement impliqués dans le remodelage de la paroi vasculaire pulmonaire. De plus, les Résolvines tendent à réguler les niveaux de phosphorylation de protéines modulatrices de la contraction cellulaire telles que le CPI-17 et le MYPT-1.

La détection du TMEM16A, un canal chlore dépendant du calcium, qui est un marqueur de l'HTAP est diminuée par la RvD1 et la RvE1, ce qui induirait une diminution de la contraction des cellules musculaires lisses. Son expression peut être modulée et/ou son activité peut être diminuée afin de prévenir la maladie.

Le GPR120, le GPR32 et le ChemR23, les récepteurs respectifs du DHA, de la RvD1 et de la RvE1 ont été décrits dans la littérature (Ohira et al., 2009; Krishnamoorthy S et al., 2012) et leur détection a été analysée dans cette thèse. Le blocage pharmacologique de ces récepteurs par des peptides bloquant, a confirmé leur implication fonctionnelle dans le mode d'action des SPM.

L'ensemble de ces données ouvre des perspectives de recherche et de développement vers de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient potentiellement aider à la prise en charge des patients.

## **1. Le modèle *in vitro* d'artères pulmonaires humaines.**

### **1.1. Effets de la RvD1 sur le traitement vasoconstricteur à l'ET-1.**

L'endothéline-1 est un vasoconstricteur puissant qui est sécrété en conditions normales par les cellules endothéliales (Stewart DJ et al., 1991). Dans les conditions pathologiques, l'ET-1 est sécrétée en excès et au niveau des CML, elle active les voies de signalisations intracellulaires impliquées dans l'augmentation de la contraction (Agapitov AV and Haynes WG, 2002). Il s'en suit une vasoconstriction soutenue des artères pulmonaires.

#### *1.1.1. La RvD1 inhibe l'augmentation du tonus des APH induite par l'ET-1.*

Dans nos travaux, l'ET-1 a été utilisée seule et en traitement combiné avec la RvD1 dans le but d'évaluer le potentiel préventif de cette résolvine à diminuer ou inhiber les effets de l'ET-1.

Les analyses d'Immuno-buvardage montrent que parmi les molécules régulatrices de la contraction des CML, la présence de RvD1 ou de son précurseur le MAG-DHA induisent une diminution de la phosphorylation de la CPI-17 et de MYPT-1 (Hiram et al., 2014).

En effet, lorsque la CPI-17 est moins phosphorylée, il s'en suit une diminution de la phosphorylation de la MLCP. La forme activée de la MLCP est alors prédominante dans la cellule par rapport à la forme inactivée (MLCP-P). La MLCP activée peut alors déphosphoryler la MLC et ainsi faciliter la relaxation des CML ou plus précisément diminuer le niveau de contraction de ces cellules. Il en résulte une diminution de la vasoconstriction des artères pulmonaires. Le tonus des artères pulmonaires est alors proche de celui observé dans les conditions contrôles (Figure 4 page 61).

#### *1.1.2. La RvD1 prévient l'augmentation de la sensibilité au $Ca^{2+}$ induite par l'ET-1.*

Les résultats ont montré que l'ET-1 augmente la sensibilité au  $Ca^{2+}$  des CML (Hiram et al., 2014). En effet, lorsque l'ET-1 se lie à son récepteur, le  $PIP_2$  est clivée en  $IP_3$  et DAG par la PLC. L' $IP_3$  active les récepteurs à l' $IP_3$  ( $IP_3$ -R), qui permettent la libération du  $Ca^{2+}$  depuis le réticulum endoplasmique (RE). L'augmentation en  $Ca^{2+}$  intracellulaire est un évènement clé dans les cellules ayant une activité contractile. Lorsque la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire augmente, il y a d'avantage de formation du complexe  $Ca^{2+}$ -calmoduline. La formation de ce complexe active la MLC-Kinase, qui phosphoryle la MLC et augmente la contraction des CML et la vasoconstriction des artères pulmonaires. De plus, l'augmentation en  $Ca^{2+}$  intracellulaire active des canaux chlores, membranaires dépendants du calcium comme les TMEM16A qui participent à la dépolarisation de la membrane des CML et à l'augmentation de la contraction.

Nos données ont démontré que la RvD1 et son précurseur normalisent significativement la sensibilité au calcium des artères pulmonaires humaines perméabilisées à la  $\beta$ -escine et testées par des incréments en concentrations de  $Ca^{2+}$  libre. Par contre, nos données ne permettent pas d'affirmer qu'il y ait une perturbation de la formation du complexe  $Ca^{2+}$ -calmoduline par le traitement à la RvD1 ou au MAG-DHA. Ce type d'investigation pourrait être mené ultérieurement.

Le type de traitement utilisé dans cette étude suggère un rôle préventif de la RvD1 et de son précurseur le MAG-DHA. Des investigations antérieures non rapportées ici, avaient montré que le MAG-DHA et la RvD1 n'ont pas d'effets en aigüe sur la relaxation des CML.



*1.1.3. En présence d'ET-1, la RvD1 stimule l'expression de son récepteur, le GPR32.*

Les analyses d'immuno-buvarpage ont permis de confirmer que la RvD1 peut influencer l'expression de protéines, ce qui sous-entend une modulation de l'expression de gènes. Il s'agit d'un processus lent qui expliquerait pourquoi il ne pouvait être observé en aigüe. Parmi ces protéines, le GPR32 a été testé et nos résultats ont clairement montré que son expression est modulée par la RvD1.

Le récepteur de la RvD1, le GPR32 est ainsi surexprimé suite au traitement en présence de son ligand, la RvD1 ou de son précurseur. Ce phénomène pourrait apparaître comme un paradoxe pharmacologique. En revanche, les traitements à l'ET-1 n'augmentent pas son expression par rapport à la condition contrôle. Ce résultat permet de suggérer que lorsque le récepteur est exprimé d'avantage, les effets de la RvD1 sont ainsi amplifiés il s'agit d'un récepteur de type GPCR. Ce type de récepteurs active des seconds messagers qui permettent la transmission du signal vers le noyau et dans le milieu intracellulaire (Kobilka BK, 2007). D'avantage d'analyses seraient nécessaires pour comprendre avec plus de précisions le mode d'action du GPR32 exprimé à la surface des CML dans le contexte de l'HTAP.

Les protéines kinases telles que les PKA, PKC, PKG, sont généralement activées ou inhibées suite à la stimulation des GPCR par les vasoconstricteurs comme l'ET-1(Xie YH1 et al., 2010). Il se pourrait par exemple que la PKC soit moins activées quand la RvD1 se lie au GPR32. La diminution de la régulation de la voie PKC-CPI-17-MLCP pourrait alors conduire à la baisse de la vasoconstriction en présence de RvD1 ou de son précurseur.

## **1.2. Rôle des RvD1 et RvE1 sur les conditions proinflammatoires au TNF $\alpha$ et à l'IL-6.**

### *1.2.1. La RvD1 et la RvE1 contrent l'hyperréactivité induite par le TNF $\alpha$ et l'IL-6.*

Le TNF $\alpha$  et l'IL-6 sont des cytokines bien connues dans l'HTAP (Itoh A et al., 2003; Price LC et al., 2012). Plusieurs travaux ont permis de démontrer que ces molécules peuvent induire une nette augmentation de la réactivité des artères pulmonaires humaines. En effet il existe un lien entre l'activation des récepteurs sensibles au TNF $\alpha$  et à l'IL-6 et la machinerie contractile via la PKC $\zeta$  (Yang CS et al., 2007) dont l'expression est augmentée suite aux 24 h de traitement *in vitro* avec ces agents connus pour leurs effets pro-inflammatoires. La PKC $\zeta$  peut phosphoryler la CPI-17. Comme démontré précédemment, la voie PKC-CPI-17 est activée et résulte en une augmentation de la phosphorylation de la MLCP en MLCP-P, qui induit la contraction des CML et le maintien de la vasoconstriction des artères pulmonaires.

Les travaux réalisés et rapportés ici ont montré que les traitements préventifs avec la RvD1 et la RvE1, ainsi que ceux réalisés en présence de leurs précurseurs respectifs, peuvent inhiber l'effet du TNF $\alpha$  et de l'IL-6. Comme pour l'ET-1, les résultats n'ont pas permis de conclure que les SPM inhibent l'interaction entre le TNF $\alpha$  et l'IL-6 et leurs récepteurs respectifs, ou que les SPM diminuent l'activation de ces récepteurs. En revanche, les analyses par immunobuvardage ont révélé que l'expression de ces cytokines est significativement diminuée en présence des SPM par rapport aux conditions inflammatoires seules (Hiram et al., 2014; Hiram et al., 2015). Ces résultats confirment qu'en traitement, les Résolvines peuvent moduler la transcription de gènes pour opérer leurs effets de résolution.

Des travaux sur l'asthme (Levi BD, 2012; Recchiuti A, 2013) ont montré que la RvD1 par exemple, module l'expression de miRNAs qui permettent d'inhiber la sécrétion de cytokines inflammatoires et d'inhiber la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau.

L'expression des protéines telles que le NF $\kappa$ B, c-Fos, c-Jun et STAT3 qui sont impliquées dans les voies de signalisations pro-inflammatoires est diminuée suite aux traitements préventifs aux Résolvines d'intérêt tel que rapportées dans nos travaux ([Figure 5 page 107](#)). L'inflammation au niveau des artères pulmonaires peut donc être jugulée par les effets préventifs des Résolvines D1 et E1.

Ces résultats vont dans le sens des connaissances référencées dans la littérature sur le rôle des Résolvines sur l'inflammation dans l'arbre bronchique (Levy BD, 2012; Morin C et al., 2013) et dans le cerveau (Hong S et al., 2003; Marcheselli VL et al., 2003).

### *1.2.2. Les Résolvines D1 et E1 normalisent la migration cellulaire.*

Les cytokines inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-6 provoquent une surexpression de molécules telles que le VEGF, le MMP9, la COX-2 (Pullamsetti SS et al., 2002) qui sont impliquées dans le remodelage vasculaire. Nos résultats démontrent qu'en présence des Résolvines D1 et E1, l'expression de ces molécules est ramenée à des ratios proches des valeurs contrôles, suggérant que les modifications tissulaires et morphologiques qui font suite à l'inflammation peuvent être atténuées, voir stoppées par les SPM.

L'analyse quantitative des expériences de migration cellulaire sont des arguments qui étayent cette conclusion (Hiram et al., 2015). En effet, bien que comparativement à la condition contrôle le TNF $\alpha$  et l'IL-6 intensifient la migration des CML; la RvE1 et le MAG-EPA la normalisent. La migration des CML est un phénomène aggravant dans l'HTAP.

Les CML quittent la média et colonisent l'intima. Cette invasion muscularise la tunique interne des artères pulmonaires et accentue l'obstruction irréversible de la lumière des vaisseaux. La vasoconstriction est alors augmentée. En limitant la migration *in vitro*, la RvE1 apparaît comme un traitement potentiel qui pourrait non seulement dilater les artères pulmonaires, mais qui ralentirait l'obstruction de la lumière.

C'est justement cette notion de désobstruction qui représente l'un des plus grands problèmes de la recherche sur l'HTAP, car bien qu'on sache relaxer les artères de manière ponctuelle il est actuellement difficile de renverser les processus de réduction de la lumière artérielle au niveau du poumon (Taichman DB et al., 2014).

Le modèle d'artères pulmonaires humaines traitées *in vitro* présente des limites, car bien que les CML soient maintenues plutôt intactes, les cellules endothéliales peuvent être fragilisées lors du traitement s'il est prolongé au delà de trois jours à l'incubateur. Ce modèle n'a donc pas permis de tester les Résolvines en traitement curatifs, c'est-à-dire plusieurs jours après une culture en conditions contractantes par l'ET-1 ou inflammatoires avec le TNF $\alpha$  et l'IL-6.

Afin de répondre à ce problème, le modèle d'HTAP induite par la monocrotaline chez le rat a été utilisé. Contrairement aux devis d'études classiques pratiqués par le laboratoire consistant à administrer la monocrotaline et la substance d'intérêt le même jour (Morin C et al., 2014), l'originalité des travaux rapportés ici réside dans le fait que le MAG-DHA était administré trois semaines après l'injection de monocrotaline afin d'évaluer ses effets curatifs potentiels *in vivo*.

## **2. Impact du MAG-DHA dans le modèle *in vivo* d'HTAP chez le rat-MCT.**

### **2.1. Mode d'action de la monocrotaline.**

#### *2.1.1. Effets connus de la monocrotaline.*

Le modèle de rats hypertendus à la monocrotaline est bien connu et utilisé pour induire l'HTAP (Dumitrascu R et al., 2011). Les mécanismes toxicologiques par lesquels la monocrotaline initie les anomalies pulmonaires ne sont pas encore totalement élucidés. Néanmoins les phénomènes liés à son ingestion ont permis de faire évoluer les recherches sur l'HTAP sachant qu'elle induit une inflammation sévère du tissu pulmonaire (Henriques-Coelho T et al, 2008).

La monocrotaline (MCT) est un alcaloïde pyrrolizidique macrocyclique tiré de la graine de la *Crotalaria Spectabilis*, une plante tropicale asiatique. Dans le foie, la MCT est métabolisée par la CYP450 (CYP3A4), en sa forme active, la MCTP (déhydro-monocrotaline-pyrrole). Cette molécule circule jusqu'au poumon, où elle induit des lésions, de la fibrose et de l'hypertension pulmonaire. Au niveau du cœur, il s'en suit une hypertrophie du ventricule droit (Lalich JJ and Merkow L, 1961; Nogueira-Ferreira R et al., 2015).

Toute molécule capable d'inhiber la CYP450 (CYP3A4) peut bloquer la formation de MCTP dans le foie et donc limiter ses effets au niveau du poumon. Ce type de blocage n'était pas souhaité dans le devis expérimental choisi et pourrait même remettre en question l'administration conjointe de MCT et de dérivés d'oméga-3 s'il s'avère que ces dérivés peuvent bloquer le CYP450 (CYP3A4). En effet les résultats obtenus seraient alors non pas dus à une résolution de l'HTAP mais à une inhibition de la formation du métabolite actif de la MCT avant même qu'il n'arrive au poumon pour induire la maladie.

### *2.1.2. Effets de la monocrotaline, observés dans nos conditions expérimentales.*

Nos expériences démontrent qu'après quatorze jours suivant l'injection à la MCT les rats présentaient une hypertrophie significative de la paroi des artères pulmonaires comparativement à la condition contrôle. Vingt-et-un jours suivant l'injection à la MCT, les tests fonctionnels et les analyses par immuno-buvardage révèlent que la MCT induit de nombreuses modifications caractéristiques de l'HTAP telles que l'hypertrophie du ventricule droit, l'hypertrophie de la paroi des artères pulmonaires, l'hyperréactivité des artères pulmonaires et l'augmentation de la contractilité des CML marquée par une augmentation des niveaux de phosphorylation des protéines régulatrices de la machinerie contractile telles que la CPI-17 et la MYPT-1. Du point de vue du profil inflammatoire, les résultats montrent une augmentation de l'expression de marqueurs intracellulaires de voies de signalisations activées en réponse à différentes cytokines circulantes tels que STAT3, NFκB, C-Fos et C-Jun.

Sept jours de traitement quotidien avec 231 mg/kg de MAG-DHA (du 14<sup>e</sup> au 21<sup>e</sup> jour) (*qui équivaudrait à 3g/j chez l'Homme*) a permis de rétablir une réactivité similaire au groupe contrôle, de réduire significativement l'épaisseur de la paroi des artères pulmonaire, ainsi que celle du ventricule droit. De plus, l'expression des marqueurs intracellulaires de l'inflammation était ramenée de façon concomitante, à des valeurs voisines de celles observées dans les conditions contrôles.

## **2.2. Mode d'action du MAG-DHA, précurseur de la RvD1.**

### *2.2.1. Intérêt de l'utilisation du MAG-DHA dans nos modèles expérimentaux.*

Contrairement au DHA qui porte une charge négative, le MAG-DHA est un lipide neutre qui est compatible avec une meilleure absorption intestinale, favorisant l'augmentation du ratio DHA/AA (Morin C et al 2014). Dans l'organisme, le MAG-DHA est clivé par la MAG-Lipase, en deux molécules non-toxiques : le DHA et le glycérol. Ce DHA peut produire de nombreux métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation (Serhan CN et al., 2002; Hong S et al., 2003) dont les Résolvines de série D, que sont les RvD1, D2, D3 et D4 (*détaillé en introduction section 6.2*).

Il a été démontré que le fait de bloquer le métabolisme du MAG-DHA inhibe leurs effets bénéfiques qui lui sont associés (Hiram et al., 2014). Cela suggère que la formation des dérivés du DHA et de l'EPA est nécessaire pour déclencher les processus de résolution auxquels ils semblent étroitement associés.

Dans le modèle de rats-MCT, les sept jours de traitement au MAG-DHA ont probablement permis d'accroître les concentrations intracellulaires en DHA et en Résolvines de série D.

Des expériences complémentaires pourront être effectuées ultérieurement afin de déterminer les concentrations sanguines ou tissulaires en RvD1-4 dans ce modèle, après les 21 jours d'expérimentation.

#### 2.2.2. La MAG-DHA tend à rétablir la morphologie normale des artères pulmonaires.

Les résultats obtenues par les analyses histologiques de coupes de poumons de rats MCT à la suite du traitement, permettent cependant d'affirmer que le MAG-DHA administré tardivement, lorsque l'HTAP est à un stade déjà sévère, peut induire une désobstruction des artères pulmonaires et un désépaississement de la paroi. Au regard des mécanismes qui déclenchent l'épaississement de la paroi, il est possible que le traitement au MAG-DHA inhibe la migration des CML, réduise la musculation de l'intima et limite la sécrétion de cytokines proinflammatoires pour induire une diminution de l'épaisseur de la paroi et augmenter la lumière des artères pulmonaires.

Les mesures de tensions isométriques et les analyses par immuno-buvardage des protéines régulatrices de la contraction des CML ont démontré que le traitement *in vivo* au MAG-DHA confirme les observations consistantes faites *in vitro* sur les artères pulmonaires. Le MAG-DHA, probablement via les Résolvines qui en dérivent, induit une normalisation de la réactivité des artères issues de rats MCT, en réponse à des stimuli pharmacologiques. Il y a diminution de la phosphorylation de la CPI-17 et du MYPT-1 qui comme décrit précédemment, induit la relaxation des CML et la vasodilatation des artères pulmonaires.

Le sang peut alors mieux circuler pour irriguer le poumon. Les résistances vasculaires étant alors en baisse, le cœur fait ainsi moins d'efforts pour pomper et maintenir un flux sanguin constant. En effet, l'HTAP sévère est marquée par de l'hypertrophie cardiaque droite et le modèle de rats MCT est caractérisé par une hypertrophie du ventricule droit qui est décrite

comme étant un marqueur de l'HTAP dans ce modèle (Noordegraaf AV et Galiè N, 2011). Or, faisant suite aux améliorations hémodynamiques provoquées par le traitement au MAG-DHA au niveau du poumon, une réduction significative du poids du ventricule droit a été observée en comparaison à ceux des rats MCT. Afin de quantifier l'hypertrophie cardiaque droite, l'index de Fulton a été utilisé (*décrit dans l'article 3*). Cette équation permet d'établir le ratio entre le poids du ventricule droit sur la somme du poids du septum et du poids du ventricule gauche (Virak M et al., 2010). Le calcul de l'index de Fulton est reconnu et est couramment employé pour confirmer que l'HTAP est installée et est à un stade avancé dans les modèles animaux de cette pathologie (Wang Z et al., 2013).

### 2.2.3. Le MAG-DHA diminue l'expression des marqueurs de l'inflammation.

Il a été proposé que l'inflammation serait en partie responsable de la genèse de l'HTAP. Le modèle de rats MCT induit un important statut inflammatoire (Wang Q et al., 2013) qui est associé aux anomalies sévères qui caractérisent la maladie. Le traitement au MAG-DHA possiblement via ses métabolites actifs dont les Résolvines, renverse l'augmentation de l'expression de NFkB, c-Fos, c-Jun et STAT3 pour résoudre l'inflammation et contrer les anomalies fonctionnelles et tissulaires qui en découlent. Les expériences *in vitro* ont permis de démontrer que le blocage du récepteur du DHA, le GPR120 et le blocage du récepteur de la RvD1, le GPR32 tendait à inhiber les effets bénéfiques de résolution induits par ces SPM. L'intégrité de l'interaction entre le DHA ou ses dérivés avec leurs récepteurs spécifiques est donc importante pour déclencher les mécanismes de résolution de l'inflammation.

Un autre récepteur de la RvD1 a été décrit (Krishnamoorthy S et al., 2012). Il s'agit du récepteur ALX/FPR2 qui est le récepteur de la Lipoxine A4 (LXA4), un agent bioactif dérivé de l'AA et qui joue un rôle anti-inflammatoire (Takano T et al., 1997). Il a été démontré que la RvD1 peut diminuer le recrutement des PMN via l'activation du récepteur ALX/FPR2 (Krishnamoorthy S et al., 2012). Cependant, des concentrations importantes en RvD1 sont nécessaires pour que les ALX/FPR2 soient efficacement activés, tandis que de faibles concentrations en RvD1 suffisent pour observer des effets bénéfiques avec l'activation du GPR32 dans les leukocytes circulants (Krishnamoorthy S et al., 2012).

Ces données pourraient expliquer le fait que le blocage du récepteur GPR120 du DHA et GPR32 de la RvD1 n'annule pas complètement leurs effets bénéfiques (Hiram et al. 2014), suggérant que la RvD1 pourrait passer par un autre récepteur pour participer à la réparation des dysfonctions induites par l'inflammation.

### **3. Conclusions générales.**

Les modèles *in vivo* et *in vitro* utilisés ont permis des approches pertinentes et reproductibles pour mimer les phénomènes physiopathologiques d'intérêts pour évaluer pour la première fois dans des tissus non lymphoïdes, l'impact des Résolvines dans la prévention et la résolution d'une pathologie rare telle que l'HTAP.

De nouvelles évidences ont été apportées sur le mode d'action de la RvD1 et de la RvE1 et leurs précurseurs dans la normalisation de l'hyperréactivité et l'hypersensibilités calcique des artères pulmonaires suite à des traitements vasoconstricteurs ou proinflammatoires et en réponse à des stimulus pharmacologiques mimant les conditions pathologiques observables chez les patients.

Du point de vue cellulaire, les dysfonctions telles que la migration anormale des CML et l'augmentation pathologique de l'épaisseur de la paroi des artères pulmonaires due à la prolifération des cellules ont pu être diminuées par les traitements *in vitro* et *in vivo* impliquant les Résolvines D1, E1 et/ou leurs précurseurs.

Au niveau moléculaire, les conditions expérimentales mimant le profil inflammatoire de l'HTAP induisaient une augmentation de l'expression des médiateurs intracellulaires de l'inflammation. De plus, il a été démontré que ces conditions influencent la vasoconstriction et la tonicité des artères pulmonaires. Les expérimentations *in vivo* et *in vitro* ont permis d'observer que les Résolvines D1, E1 et leurs précurseurs participent aux mécanismes de résolution de l'inflammation et de façon concomitante, s'opposent aux phénomènes de vasoconstriction et d'obstruction des artères pulmonaires.



L'ensemble de ces données originales et pionnières démontre une variété et une complémentarité d'effets bénéfiques déclenchés par les Résolvines sur différentes voies et effecteurs intracellulaires qui ont des répercussions, tant au niveau de l'inflammation qu'au niveau de la modulation de la contraction cellulaire et de l'hémodynamique dans les poumons. Il semble que les Résolvines D1 et E1 et leurs précurseurs respectifs le MAG-DHA et le MAG-EPA pourraient agir sur une molécule ou une voie de signalisation clé qui se trouverait en amont de tous les phénomènes d'inflammation, de vasoconstriction et de remodelage. Sa modulation pourrait ainsi être un carrefour à contrôler pour le maintien de l'homéostasie des artères pulmonaires. La littérature fait état de molécules telles que mTOR (Goncharova EA, 2013), Akt (Ogawa A et al., 2013) ou AMPK (Stone JD et al., 2013, Li S et al., 2016) qui pourraient être de bons candidats à investiguer du fait du large panel de voies de signalisations et de fonctions cellulaires que leur activation régule et contrôle. Plus de travaux seront donc nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

#### **4. Limitations.**

Les travaux précédemment décrits et discutés présentent cependant quelques limites qui ont été développées dans les articles 1, 2 et 3. Globalement, il est cependant important de noter que le modèle d'artères pulmonaires humaines est une originalité de travail qui offre la possibilité d'étudier les caractéristiques inflammatoires et vasoconstrictrices de l'HTAP, mais ce modèle ne permet pas d'observer les remodelages de la paroi vasculaire, ce qui constitue une limite importante. Afin de combler ce problème, le modèle de rats MCT a été proposé, permettant d'observer le développement de l'HTAP et de décrire les modifications de la paroi artérielle liées à cette pathologie. Néanmoins, nos résultats n'ont pas développé la question des lésions plexiformes, ainsi d'avantage d'études pourront être menées avec la même méthodologie, afin de mieux comprendre les mécanismes de résolution et de réparation que pourrait exercer le MAG-DHA et ses dérivés. Enfin, les deux modèles utilisés dans cette étude auraient pu permettre d'apporter de nouvelles évidences sur l'impact des RvD1 et RvE1 ainsi que leurs précurseurs, sur la viscosité du sang au niveau de la circulation pulmonaire. En effet, des études ont démontré au niveau systémique, que les oméga-3 diminuaient la viscosité du sang et amélioraient sa fluidité (Cartwright IJ et al., 1985; Simopoulos AP et al., 2002).

## 5. Perspectives.

Les données recueillies et les limitations retenues ont soulevé quelques interrogations et suggestions qui pourraient faire l'objet de nouvelles investigations à court et à long terme.

### 5.1. Perspectives à court terme.

Les Résolvines D1 et E1 pourraient être quantifiées dans le modèle *in vivo* de rats MCT, suite au traitement au MAG-DHA ou au MAG-EPA afin de confirmer que ces précurseurs sont métabolisés et ainsi caractériser les taux de Résolvines circulantes ou tissulaires en fonction des doses de précurseurs administrées.

Au niveau de l'adventice des artères pulmonaires, les Résolvines ont probablement un rôle sur la signalisation intercellulaire impliquant les fibroblastes, les lymphocytes et les mastocytes qui peuplent cette tunique de la paroi. D'avantage de travaux seront nécessaire pour répondre à cette question.

Des traitements existent et permettent de relaxer ponctuellement les artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP. Il serait intéressant d'apporter des évidences sur la comparaison entre ces médicaments et les Résolvines sur leurs effets *in vitro* et *in vivo* dans le contexte de l'HTAP. J'ai eu l'opportunité de commencer des travaux préliminaires au laboratoire de Dr Éric Rousseau, sur des artères pulmonaires humaines *in vitro*.

Les premiers résultats montrent qu'en aiguë, comparativement au Sildénafil (SILD) en concentrations micromolaires, la RvD1 ne relaxe pas les artères pulmonaires humaines fraîches ou traitées en conditions proinflammatoires.

En revanche, en traitement pendant 24 h, le RvD1 (à des concentrations nanomolaires) induit une normalisation plus efficace que le SILD (en concentrations micromolaires) de l'hyperréactivité et une résolution du profil inflammatoire des artères pulmonaires humaines.

Ces expériences méritent d'être reproduites et des analyses complémentaires pourront être menées pour interpréter et discuter ces résultats qui pourraient faire l'objet d'une « short communication ».

### ***5.2. Perspectives à long terme.***

Il serait intéressant de pouvoir commencer des essais cliniques afin de statuer sur l'impact de la RvD1 et de la RvE1 sur des patients atteints d'HTAP. Actuellement ce type d'essais est en court pour tester le rôle du MAG-DHA dans la fibrose kystique (Morin C et al., 2015). Les Résolvines et leurs précurseurs sont des composés non-toxiques, sans effets secondaires connus et sans danger nutritionnel.

Ces essais permettraient d'avoir des réponses claires sur l'efficacité de ces molécules sur les patients et combler le défaut de connaissances sur leurs bénéfices cliniques alors que les expériences *in vitro* et *in vivo* semblent concluantes.

Enfin, la RvD1 et la RvE1 pourraient potentiellement entrer dans la composition de nouveaux médicaments et de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de lutter efficacement contre l'inflammation pour prévenir l'ensemble des dysfonctions liées à l'apparition, l'aggravation et la sévérité de l'HTAP dans le but d'améliorer les conditions de vie des patients et idéalement les soigner de manière durable et définitive.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

### (POUR L'INTRODUCTION ET LA DISCUSSION GÉNÉRALE)

- Aburima A, Wraith KS, Raslan Z, Law R, Magwenzi S, Naseem KM (2013) cAMP signaling regulates platelet myosin light chain (MLC) phosphorylation and shape change through targeting the RhoA-Rho kinase-MLC phosphatase signaling pathway. *Blood* 122(20):3533-3545.
- Adatia I, Kothari SS, Feinstein JA (2010) Pulmonary hypertension associated with congenital heart disease: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest* 137(6 Suppl):52S-61S.
- Agapitov AV, Haynes WG (2002) Role of endothelin in cardiovascular disease. *JRAAS* 3:1-15.
- Agnoletti L, Curello S, Bachetti T (1999) Serum from patients with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic: role of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation* 100(19):1983-1991.
- Alami S, Cottin V, Mouthon L, Desjeux D, Quessette E, Poiraudou S, Sitbon O (2016) Patients, relatives, and practitioners views of pulmonary arterial hypertension: A qualitative study. *Presse Med.* 2016; 45: e11-e27.
- Archer SL, Weir EK, Wilkins MR (2010) Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation*; 121:2045-66.

- Arends SJ, Damoiseaux JG, Duijvestijn AM, Debrus-Palmans L, Boomars KA, Brunner-La Rocca HP, Cohen Tervaert JW, Van Paassen P (2013) Functional implications of IgG anti-endothelial cell antibodies in pulmonary arterial hypertension. *Autoimmunity* 46(7):463-70.
- Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN (2005) Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci* 102(21): 7671–7676.
- Bennett BL (2006) c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanisms in respiratory disease. *Eur Respir J* 28:651-661.
- Beppu H (2011) Transgenic and knockout mouse models for pulmonary hypertension: role of BMPR2 Part I: Genetically manipulated mouse models of pulmonary vascular disease and lung injury. *Drug Discovery Today Disease Models* 7(s 3–4):61–65.
- Boccardo G, Choby C, Frapier JM (1999) Regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis by atypical Na<sup>+</sup> currents in cultured human coronary myocytes. *Circ Res* 85:606-613.
- Bonham CA, Oldham JM, Gomberg-Maitland M, Vij R (2015) Prostacyclin and Oral Vasodilator Therapy in Sarcoidosis-Associated Pulmonary Hypertension: A Retrospective Case Series. *Chest* 148:1055.
- Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN, Michelakis ED (2007) The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci* 104(27):11418-11423.

- Bradbury DA, Newton R, Zhu YM (2002) Effect of bradykinin, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , and hypoxia on COX-2 expression in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 283(4):17-L725.
- Brenner O (1935) Pathology of the vessels of the pulmonary circulation. *Intern Med* 56(2):211-237.
- Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Michel BA, Speich R, Huber LC (2009) Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res* 104:1184-1191.
- Brown LM, Chen H, Halpern S, Taichman D, Elliott CG (2011) Delay in recognition of pulmonary arterial hypertension: factors identified from the REVEAL Registry. *Chest* 140(1):19-26.
- Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM (2004) Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Circulation* 109:159-165.
- Calder PC (2002) Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc* 61(3):345-358
- Calder PC (2006) Long-chain polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Scand J Food Nutr* 50(S2):54-61.
- Cartwright IJ, Pockley AG, Galloway JH, Greaves M, Preston FE (1985) The effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on erythrocyte membrane phospholipids, erythrocyte deformability and blood viscosity in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 55(3):267-81.

- Casteels R, Kuriyama H (1966) Membrane potential and ion content in the smooth muscle of the guinea-pig's taenia coli at different external potassium concentrations. *J Physiol* 184(1):120-130.
- Cave AC, Manché A, Derias NW, Hearse DJ (1993) Thromboxane A2 mediates pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass in the rabbit. *J Thorac Cardiovasc Surg* 106(6):959-967.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Schmidt A, Stern DM (1998) Endothelial Cells in Physiology and in the Pathology of Vascular Disorders. *J Am Soc Hematol* 91:3527-3561.
- Condliffe R and Howard LS (2015) Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. *F1000Prime Rep* 7: 06.
- Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP (2006) High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* pp.590-598.
- Cooper CJ, Landzberg MJ, Anderson TJ (1996) Role of nitric oxide in the local regulation of pulmonary vascular resistance in humans. *Circulation* 93:266–271.
- Davidson MH (2013) Omega-3 fatty acids: new insights into the pharmacology and biology of docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Curr Opin Lipidol* 24(6):467-474.
- Delcroix M, Morrell NW, Abramowicz M, Sitbon O, Boonstra A, Galie N, Grunig E, Herve P, Trembath RC, Peacock AJ, Hoeper MM (2003) Pulmonary arterial hypertension: genetics, reversibility testing and follow-up. *Eur Respir Mon* 27:33-56.

- Dempsey Y, Nilsen M, White K, Mair KM, Loughlin L, Ambartsumian N, Rabinovitch M, Maclean MR (2011) Development of pulmonary arterial hypertension in mice over-expressing S100A4/Mts1 is specific to females. *Respir Res* 20;12:159.
- Dorfmueller P1, Zarka V, Durand-Gasselini I, Monti G, Balabanian K, Garcia G, Capron F, Coulomb-Lherminé A, Marfaing-Koka A, Simonneau G, Emilie D, Humbert M (2002) Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 15;165(4):534-539.
- Dresdale DT, Michtom RF, Schultz (1954) Recent studies in primary pulmonary hypertension including pharmacodynamics observations on pulmonary vascular resistance. *Bull NY Acad Med* 30:195-207.
- Dumitrascu R, Kulcke C, Konigshoff M, Kouri F, Yang X, Morrell N, Ghofrani HA, Weissmann N, Reiter R, Seeger W, Grimminger F, Eickeberg O, Schermuly RT, Pullamsetti SS (2011) Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J* 37:1104-1118
- El Chami H, Hassoun PM (2012) Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 55(2):218-228.
- El-Haroun H, Bradbury D, Clayton A, Knox AJ (2004) Interleukin-1beta, transforming growth factor-beta1, and bradykinin attenuate cyclic AMP production by human pulmonary artery smooth muscle cells in response to prostacyclin analogues and prostaglandin E2 by cyclooxygenase-2 induction and downregulation of adenylyl cyclase isoforms 1, 2, and 4. *Circ Res* 94:353-361.
- Euler USV, Liljestrand G (1946) Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 12:301-320.



- Fick A (1870) Über die Messung des Blutquantums in den Herzventrikeln. *Sitz der Physik-Med ges Würzburg* 16.
- Firth AL, Mandel J, Yuan JXJ (2010) Idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Dis Model Mech* 3(5-6):268-273. Firth AL, Won JY, Park WS (2013) Regulation of Ca<sup>2+</sup> Signaling in Pulmonary Hypertension. *Korean J Physiol Pharmacol* 17(1):1-8.
- Forrest AS, Joyce TC, Huebner ML, Ayon RJ, Wiwchar M, Joyce J, Freitas N, et al., (2012) Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 303(12):C1229-43.
- Franck O (1905) Der Puls in den Arterien. *Ztsch Biol* 46:441-553.
- Franco V (2012) Right ventricular remodeling in pulmonary hypertension. *Heart Fail Clin* 8(3):403-412.
- Frasch HF, Marshall C, Marshall BE (1999) Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 276:L304–L310.
- Fredman G, and Serhan CN (2011) Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem J* 437(Pt 2): 185–197.
- Frossman W (1929) Die Sondierung des rechten Herzens. *Klin Wochenschr* 8:2085-2087.
- Galiè N, Brundage BH, Ghofrani HA (2009) Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119:2894.

- Galiè N, Rubin Lj, Hoeper M (2008) Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 371:2093.
- Galiè N, Simonneau G (2013) The fifth world symposium on pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62(25):D34-41
- Ganong W (2005) *Physiologie médicale. De Boeck Supérieur* p.7-9, p.548-553.
- George MP, Champion HC, Simon M, Guyach S, Tarantelli R, Kling HM, Brower A, Janssen C, Murphy J, Carney JP, Morris A, Gladwin MT, Norris KA (2013) Physiologic changes in a nonhuman primate model of HIV-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* Mar;48(3):374-81.
- Geraci MW, Gao B, Shepherd DC (1999) Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 103:1509–1515.
- Golembeski SM, West J, Tada Y, Fagan KA (2005) Interleukin-6 causes mild pulmonary hypertension and augments hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Chest* 128:572S-573S.
- Goncharova EA (2013) mTOR and vascular remodeling in lung diseases: current challenges and therapeutic prospects. *FASEB J* 27(5):1796-1807.
- Goncharova EA, Ammit AJ, Irani C, Carroll RG, Eszterhas AJ, Panettieri RA, Krymskaya VP (2002) PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(2):L354-363.

- Gore B, Izikki M, Mercier O, Dewachter L, Fadel E, Humbert M, Dartevelle P, Simonneau G, Naeije R, Lebrin F, Eddahibi S (2014) Key role of the endothelial TGF- $\beta$ /ALK1/endothelin signaling pathway in humans and rodents pulmonary hypertension. *PloS One* 9(6):e100310.
- Guibert C, Savineau J. P, Crevel H, Marthan R, Rousseau E (2005) Effect of short-term organoid culture on the pharmaco-mechanical properties of rat extra- and intrapulmonary arteries. *Br J Pharmacology*. 146: 692-701
- Haddad F, Kudelko K, Mercier O, Vrtovec B, Zamanian RT, De Jesus Perez V (2011) Pulmonary hypertension associated with left heart disease: characteristics, emerging concepts, and treatment strategies. *Prog Cardiovasc Dis* 54(2):154-167.
- Hampl V, Herget J (2000) Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* 80(4):1337-1372.
- Harbige LS (2003) Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essential and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 38(4):323-341.
- Harris P (1957) Influence of acetylcholine on the pulmonary arterial pressure. *Br Heart J* 19(2):272-278.
- Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, Abdalla SA, Rowell J, Machado RD, Elliott CG, Robbins IM, Olschewski H, McLaughlin V, Gruenig E, Kermeen F, Halme M, Räisänen-Sokolowski A, Laitinen T, Morrell NW, Trembath RC (2003) Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 40(12):865-871.
- Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M,

- Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX, Humbert M (2009) Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl):S10-19.
- Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, Petasis NA, Levy BD, Serhan CN and Van Dyke TE (2005) RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J* 20(2):401-403.
- Hathaway DR, Konicki MV, Coolican SA (1985) Phosphorylation of myosin light chain kinase from vascular smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Cardiol* 17(9):841-850.
- Henriques-Coelho T, Brandão-Nogueira A, Moreira-Gonçalves D, Correia-Pinto J, Leite-Moreira AF (2008) Effects of TNF- $\alpha$  blockade in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Rev Port Cardiol* 27(3):341-348.
- Hiram R, Rizcallah E, Sirois C, Sirois M, Morin C, Fortin S, Rousseau E (2014) Resolvin D1 reverses reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by ET-1, TNF $\alpha$  and IL-6 in human pulmonary artery. *Am J Physiol Heart & Circ Physiol* 307(11):H1547-1558.
- Ho JJ, Man HS, Marsden PA (2012) Nitric oxide signalling in hypoxia. *J Mol Med* 90(3):217-231.
- Hoeper MM (2009) The new definition of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 34:790-791.
- Hofmann F (2004) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Bio Chem* 280(1):1-4.
- Holub BJ (2002) Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *CMAJ* 166: 608-615.

- Hong S, Gronert K, Devchand P, Serhan CN (2003) Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood and glial cells: autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* 278:14677–14687.
- Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmueller P, Adnot S, Eddahibi S (2008) Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol* 49(4-6):113-118.
- Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D (1995) Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 151(5):1628-1631.
- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G (2004) Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 351:1425.
- Itoh A, Nishihira J, Makita H, Miyamoto K, Yamaguchi E, Nishimura M (2003) Effects of IL-1beta, TNF-alpha, and macrophage migration inhibitory factor on prostacyclin synthesis in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Respirology* 8:467-472.
- Jing ZC, Yu ZX, Shen JY (2011) Vardenafil in pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 183:1723.
- Katugampola SD, Davenport AP (2001) Thromboxane receptor density is increased in human cardiovascular disease with evidence for inhibition at therapeutic concentrations by the AT(1) receptor antagonist losartan. *Br J Pharmacol* 134:1385–1392.
- Katz AM (2002) Ernest Henry Starling, his predecessors, and the "Law of the Heart". *Circulation* 106(23):2986-2992.

- Khan EU (2011) Commentary on symptom experience of pulmonary arterial hypertension (PAH) patients. *Clin Nurs Res* 20(2):135-143.
- Kobilka BK (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Bioch Biophys A* 1768(4):794-807.
- Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Fredman G, Serhan CN (2012) Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs. *Am J Pathol* 180(5):2018-2027.
- Krogh A, Lindhard J (1912) Measurement of the blood flow through the lungs of man. *Skand Arch Physiol* 27:100-125.
- Lalich JJ, Merkow L (1961) Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest* 10:744-750.
- Lapointe MC and Isenovic E (1999) Interleukin-1beta regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signalling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* 33:276-282.
- Levy BD (2012) Resolvin D1 and resolvin E1 promote the resolution of allergic airway inflammation via shared and distinct molecular counter-regulatory pathways. *Front Immunol* 3: 390.
- Li QF, Dai AG (2004) Hypoxia-inducible factor-1 alpha regulates the role of vascular endothelial growth factor on pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Chin Med J* 117(7):1023-1028.
- Li S, Han D, Zhang Y, Xie X, Ke R, Zhu Y, Liu L, Song Y, Yang L, Li M. Activation of AMPK Prevents Monocrotaline-Induced Extracellular Matrix Remodeling of Pulmonary Artery. *Med Sci Monit Basic Res* 9;22:27-33.

- Lincoln TM (2007) Myosin Phosphatase Regulatory Pathways. *Circulatory Research* 100:10-12.
- Liu C, Chen J, Gao Y, Deng B, Liu K (2013) Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 28;2:CD004434.
- Lorente-Cebrián S, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ (2013) Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem* 69(3):633-51
- Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG (2005) A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115:2774–2783.
- Ma J, Pan Z (2003) Retrograde activation of store-operated calcium channel. *Cell Calcium* 33(5-6):375-384.
- Mandegar M, Remillard CV, Yuan JX (2002) Ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 45(2):81-114.
- Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Hua Tian X, Gronert K et al., (2003) Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 278:43807–43817.
- Mazzei JA and Mazzaei ME (2011) A tribute: Abel Ayerza and pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev* 20:122, 220-221.
- Mehta NJ, Khan IA, Mehta RN, Sepkowitz DA (2000) HIV-related pulmonary hypertension: analytic review of 131 cases. *Chest* 118(4):1133-1141.

- Michelakis ED, Wilkins MR, Rabinovitch M (2008) Emerging concepts and translational priorities in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 118: 1486–1495
- Mizwicki MT, Liu G, Fiala M, Magpantay L, Sayre J, Siani A, Mahanian M, Weitzman R, Hayden EY, Rosenthal MJ, Nemere I, Ringman J, Teplow DB (2013)  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and resolvin D1 retune the balance between amyloid- $\beta$  phagocytosis and inflammation in Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 34(1):155-179.
- Montani D, Seferian A, Savale L, Simonneau G, Humbert M (2013) Drug-induced pulmonary arterial hypertension: a recent outbreak. *Eur Resp Rev* doi: 10.1183/09059180.00003313
- Morell NW (2006) Pulmonary Hypertension Due to BMPR2 Mutation: A New Paradigm for Tissue Remodeling ? *Proc Am Thorac Soc* 3:680-686.
- Morin C, Cantin AM, Rousseau É, Sirois M, Sirois C, Rizcallah E, Fortin S (2015) Proresolving Action of Docosahexaenoic Acid Monoglyceride in Lung Inflammatory Models Related to Cystic Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 53(4):574-583.
- Morin C, Fortin S, Cantin AM, Rousseau E (2011) Docosahexaenoic acid derivative prevents inflammation and hyperreactivity in lung: implication of PKC-Potentiated inhibitory protein for heterotrimeric myosin light chain phosphatase of 17 kD in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45(2):366-375
- Morin C, Fortin S, Cantin AM, Rousseau É (2013) MAG-EPA resolves lung inflammation in an allergic model of asthma. *Clin Exp Allergy* 43(9):1071-1082.



- Morin C, Fortin S, Rousseau E (2011) 19,20-EpDPE, a bioactive CYP450 metabolite of DHA monoacylglyceride, decreases  $Ca^{2+}$  sensitivity in human pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(4):H1311-1318.
- Morin C, Hiram R, Rousseau E, Blier PU, Fortin S (2014) Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307(4):H574-586.
- Motley HL, Cournand A, Werko L, Himmelstein A, Dresdale D (1947) The influence of short periods of induced acute anoxia upon pulmonary arterial pressures in man. *Am J Physiol* 150:315-320.
- Murphy JD, Rabinovitch M, Goldstein JD, Reid LM (1981) The structural basis of persistent pulmonary hypertension of the newborn infant. *J Pediatr* 98:962-967.
- Murray F, MacLean MR, Pyne NJ (2002) Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 137(8):1187-1194.
- Naeije R (2001) Pulmonary hemodynamics and right ventricular function. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 48(10):450-452.
- Naeije R, Barbera JA (2001) Pulmonary hypertension associated with COPD. *Crit Care* 5(6):286-289.
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF (1990) Calcium channels, potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol Cell Physiol* 259:C3-C18.

- Nicolls MR, Mizuno S, Taraseviciene-Stewart L (2012) New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis. *Pulm Circ* 2:434–442
- Nogueira-Ferreira R1, Vitorino R2, Ferreira R3, Henriques-Coelho T (2015) Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm Pharmacol Ther* ;35:8-16.
- Noordegraaf AV and Galiè N (2011) The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* 122:243-253.
- Ogata T, Iijima T (1993) Structure and pathogenesis of plexiform lesion in pulmonary hypertension. *Chin Med J* 106(1):45-48.
- Ogawa A, Firth AL, Ariyasu S, Yamadori I, Matsubara H, Song S, Fraidenburg DR, Yuan JX (2013) Thrombin-mediated activation of Akt signaling contributes to pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Physiol Rep* 1(7):e00190.
- Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Van Dyke TE, Serhan CN (2009) Resolvin E1 Receptor Activation Signals Phosphorylation and Phagocytosis. *J Bio Chem* 285:3451-3461.
- Orlowo MA (2004) Chloride channels and alpha1-adrenoceptor-mediated pulmonary artery smooth muscle contraction: effect of pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol* 506(2):157-163.
- Pauvert O, Lugnier C, Keravis T, Marthan R, Rousseau E, Savineau JP (2003) Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *Br J Pharmacol*. 139(3):513-522.

- Pengo V, Prandoni P (2005) From acute pulmonary embolism to chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Ital Heart J* 6(10):830-833.
- Perros F, Dorfmüller P, Souza E (2007) Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 29(3):462-468.
- Piiper J, Dejours P, Haab P, Rahn H (1971) Concepts and basic quantities in gas exchange physiology. *Respir Physiol* 13(3):292-304.
- Powell RJ, Cronenwett JL, Fillinger MF, Wagner RJ, Sampson LN (1996) Endothelial cell modulation of smooth muscle cell morphology and organizational growth pattern. *Ann Vasc Surg* 10:4-10.
- Prasad S, Wilkinson J, Gatzoulis MA (2000) Sildenafil in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 343:1342.
- Price L, Bouillon K, Humbert M (2012) Drug- and Toxin-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Prog Respir Res* 41:76-84.
- Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmüller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M (2012) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 141(1):210-221.
- Pullamsetti SS, Savai R, Janssen W, Dahai BK, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Schermuly RT (2011) Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clin Microbiol Infect* 17(1):7-14.
- Recchiuti A (2013) Resolvin D1 and its GPCRs in resolution circuits of inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 107:64-76.

- Reichel G (1967) Respiratory mechanism and gas exchange. Beitr Klin Erforsch Tuberk Lungenkr 135(3):207-217.
- Romberg E (1891) Ueber Sklerose der Lungen arterie. Dtsch Archiv Klin Med 48:197–206.
- Roos A (1962) Poiseuille's law and its limitations in vascular systems. Med Thorac 19:224-238.
- Russo GL (2009) Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. Biochem Pharmacol 77(6):937-946.
- Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA (2003) Cyclic GMP Phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. Circulation Research 93:280-291.
- Sakao S, Tatsumi K (2011) Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: multiple cancer-like pathways and possible treatment modalities. Int J Cardiol 147(1):4-12.
- Saleemi S (2010) Portopulmonary hypertension. Ann Thorac Med 5(1):5-9.
- Scarlett M, McGaw C, Aquart- Stewart A (2009) Pulmonary hypertension: a review of the aetiology, pathophysiology and management. West Indian Med J 58(2):153-159.
- Schmitz G, Ecker J (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. Prog Lipid Res 47(2):147-155.
- Seferian A, Simonneau G (2014) Pulmonary hypertension: definition, diagnostic and new classification. Presse Med Sep;43(9):935-944.

- Serhan CN (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 25:101-137.
- Serhan CN and Petasis NA (2011) Resolvins and Protectins in Inflammation-Resolution. *Chem Rev* 12; 111(10):5922–5943.
- Serhan CN, Chiang N and Van Dyke TE (2008) Resolving inflammatory: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8(5):349-361.
- Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, Ji RR, Zhu M, Petasis NA (2012) Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J* 26(4):1755-1765.
- Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 196(8):1025-1037.
- Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N (2011) Novel anti-inflammatory--pro-resolving mediators and their receptors. *Curr Top Med Chem* 11(6):629-647.
- Shimoda LA, Sylvester JT, Booth GM (2001) Inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> currents by endothelin-1 in human pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L1115-L1122.
- Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R (2013) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62(25 Suppl):D34-41.

- Simonneau G, Robbins IM, Begheti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R (2009) Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl):S43-54.
- Simopoulos AP (2002) Omega-3 fatty acids in inflammatory and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21(6):495-505.
- Simopoulos AP (2008) The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Exp Biol Med* 233(6):674-688.
- Smith JB (1981) Prostaglandins and platelet aggregation. *Acta Med Scand Suppl* 651:91-99
- Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Morrell NW (2010) Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 122:920-927.
- Stanley JC, Elsom RL, Calder PC, Griffin BA, Harris WS, Jebb SA, Lovegrove JA, Moore CS, Riemersma RA, Sanders TA. (2007) UK Food Standards Agency Workshop Report: the effects of the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. *British Journal of Nutrition* 98:1305-1310.
- Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB (2009) Interleukin-6 Overexpression Induces Pulmonary Hypertension. *Circ Res* 104:236-244.
- Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF (2009) Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(6):L1013-32

- Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P (1991) Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease ? *Ann Intern Med* 114:464–469.
- Stone JD, Narine A, Shaver PR, Fox JC, Vuncannon JR, Tulis DA (2013) AMP-activated protein kinase inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration and vascular remodeling following injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304(3):H369-381.
- Sweeney M, Yuan JX-J (2000) Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated potassium channels. *Respir Res* 1:40-48.
- Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, Yaici A, Jais X, Sitbon O, Montani D, Souza R, Simonneau G, Soubrier F, Humbert M (2008) Clinical outcomes of Pulmonary Hypertension in Carriers of BMPR2 Mutation. *Am J Respir Crit Care Med* pp.1377-1383.
- Taichman DB, Ornelas J, Chung L (2014) Pharmacologic therapy for pulmonary arterial hypertension in adults: CHEST guideline and expert panel report. *Chest* 146:449.
- Takano T, Fiore S, Maddox JF, Brady HR, Petasis NA, Serhan CN (1997) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *J Exp Med* 185(9):1693-1704.
- Tanimoto T, Jin ZG, Bradford CB (2002) Transactivation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Flk-1/KDR Is Involved in Sphingosine 1-Phosphate-stimulated Phosphorylation of Akt and Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS). *J Bio Chem* 277:42997-43001.
- Thomeloe KS, Nelson MT (2005) Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol* 83(3):215-242.

- Vallabhajosula S, Radhi S, Cevik C, Alalawi R, Nugent K (2011) Hyperthyroidism and pulmonary hypertension: an important association. *Am J Med Sci* 342(6):507-512.
- Vanderpool RR, Shterenal S, Bachman TN, Gladwin MT, Simon MA (2014) Metabolic Syndrome and Pulmonary Hypertension Due to left Disease. *Circulation* 130:A20562
- Virak Mam, Alain F. Tanbe, Sally H. Vitali, Elena Arons, Helen A. Christou, and Raouf A (2010) Impaired Vasoconstriction and Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Pulmonary Arteries of Hypoxia- and Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 332(2): 455–462.
- Vitali SH, Hansmann G, Rose C, Fernandez-Gonzalez A, Scheid A, Mitsialis SA, Kourembanas S (2014) The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. *Pulm Circ* 4(4):619-29.
- Walsh MP (1994) Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem* 135(1):21-41.
- Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeTourneau Y, Wang Y, Chopp M (2006) Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 Secreted by Erythropoietin-Activated Endothelial Cells Promote Neural Progenitor Cell Migration. *J Neurosci* 26(22):5996-6003.
- Wang Q, Zuo XR, Wang YY, Xie WP, Wang H, Zhang M (2013) Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension is attenuated by TNF- $\alpha$  antagonists via the suppression of TNF- $\alpha$  expression and NF- $\kappa$ B pathway in rats. *Vascul Pharmacol* 58(1-2):71-77.



- Wang W, Yan H, Zhu W, Cui Y, Chen J, Wang X, Li S, Zhu J (2009) Impairment of monocyte-derived dendritic cells in idiopathic pulmonary hypertension. *J Clin Immunol* 29(6):705-713.
- Wang YZ, Zhang P, Rice AB, Bonner JC (2000) Regulation of IL-1 $\beta$ -induced platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  expression in rat pulmonary myofibroblasts by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275:22550-22557.
- Wang Z, Schreier DA, Hacker TA and Chesler NC (2013) Progressive right ventricular functional and structural changes in a mouse model of pulmonary arterial hypertension. *Physiol Rep* 1(7):e00184.
- Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Lame MW, Estep JE, Morin D (1992) Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22:307-25.
- Wirth A (2010) Rho kinase and hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1802(12):1276-1284.
- Wynne BM, Chiao CW, Webb RC (2009) Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens* 3(2):84-95.
- Xiao F, Che Dy, Zhand WR (1993) A study of endothelium-dependent proliferation of pulmonary smooth muscle cells in vitro. *J Tongji Med Univ* 13(1):10-13.
- Xie YH1, Wang SW, Zhang Y, Edvinsson L, Xu CB (2010) Up-regulation of G-protein-coupled receptors for endothelin and thromboxane by lipid-soluble smoke particles in renal artery of rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 107(4):803-812.

- Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, Akira S, Paik TH, Jo EK (2007) PKC $\zeta$  plays an essential role for Mycobacterium tuberculosis-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol* 9(2):382-396.
- Yuan JX-J, Aldinger AM, Juhaszova M (1998) Dysfunctional voltage-gated K<sup>+</sup> channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 98:1400-1406.

## REMERCIEMENTS

Cette thèse doctorale témoigne de quatre années de travail sur un sujet passionnant qu'est l'hypertension artérielle pulmonaire.

Je remercie d'une manière spéciale mon directeur de thèse, le Dr Éric Rousseau, qui m'a recruté à l'Université Victor Ségalen de Bordeaux en France et qui m'a accueilli dans son laboratoire à Sherbrooke au Canada pour travailler sur ce beau projet de recherche. Sa rigueur, son énergie et son charisme font sa réputation et ont contribué à l'accomplissement de mes objectifs. Merci encore.

Merci à Dre Caroline Morin qui a posé les bases solides qui m'ont permis d'enrichir la réflexion pour mener à bien ce projet, merci aussi pour ses conseils et son expertise qui ont guidé ma démarche. De même, je remercie le Dr Samuel Fortin pour sa disponibilité et ses suggestions constructives.

Je remercie les chirurgiens du service de chirurgie thoracique du CHUS; Dre Chantal Sirois et Dr Marco Sirois dont la contribution a été centrale dans la réalisation de ce projet. J'adresse mes remerciements au département de pathologie, précisément à Dr Edmond Rizacallah, Dre Sofia Marouan et à leurs techniciens. Merci aux infirmières de la clinique préopératoire. Le travail coopératif de toutes ces équipes nous a permis d'obtenir les resections de poumons humains dans d'excellentes conditions sanitaires.

Pour le fait qu'ils ont marqué mon parcours scolaire et que certains avaient prédit que je ferais un jour un doctorat, je remercie mes enseignants de l'école primaire, M. Henri (CE1), Mme Guillou (CM1), M. Toribio (CM2); mes professeurs de collège, Mme Marteau (Français), M. Dorzile (Musique), M. Poitou (Mathématiques) (Collège) et mes professeurs de lycée, M. Philippe Arien (Mathématiques), M. Agastin (Mathématiques), M. Toli (Philosophie), et M. Pierre-Jean (Physiques-Chimie) qui m'ont toujours poussé à donner le meilleur de moi-même.

Mon parcours ne serait pas le même sans le support et la participation de toute ma famille, ainsi je tiens d'abord à remercier celle qui me soutient, me motive et m'encourage chaque jour dans mes projets, ma fiancée Mlle Nina Arcole.

Un grand merci à mes parents, Mme Marie-Christine Hiram et M. Clovis Hiram ainsi qu'à ma sœur, Mlle Widza Hiram et à mon frère, M. Stomy Hiram.

Merci à mes grands-parents paternels, Mme Yvonne et M. Étienne Hiram, qui m'ont tant appris depuis l'enfance et pour lesquels j'éprouve tant de respect et d'affection. Je remercie ma grand-mère maternelle, Mme Raymonde Calif, qui est un pilier dans ma famille et que j'admire énormément. Merci à mes tantes et oncles qui m'ont toujours si bien encadré. Merci à mes cousins et cousines, trop nombreux pour tous les citer et qui sont si importants pour moi.

Je remercie Mme Suzy et M. Rosan Cidéron, qui m'ont soutenu durant toutes mes études universitaires. Je n'oublierais jamais ce que vous avez fait pour moi.

La foi est une valeur primordiale dans mon éducation et ma culture alors je remercie celui par qui tout est possible et sans qui rien n'existe.