



**HAL**  
open science

# Rôle des canaux Orai et TRPC dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire

Bastien Masson

► **To cite this version:**

Bastien Masson. Rôle des canaux Orai et TRPC dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ046 . tel-04405742

**HAL Id: tel-04405742**

**<https://theses.hal.science/tel-04405742v1>**

Submitted on 19 Jan 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Rôle des canaux Orai et TRPC dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire

*Role of Orai and TRPC channels in the development of pulmonary  
hypertension*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat : physiologie, physiopathologie  
Graduate School : Health and drug sciences. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Hypertension artérielle pulmonaire :  
physiopathologie et innovation thérapeutique (Université Paris-Saclay,  
Inserm)**, sous la direction de **Fabrice ANTIGNY**, Chargé de recherche Inserm

Thèse soutenue à la **Faculté de Médecine du Kremlin-Bicêtre**, le **03  
Octobre 2023**, par

**Bastien MASSON**

## Composition du Jury

<b>M. Marc HUMBERT</b> Professeur, PU-PH, INSERM UMR_S 999, Université Paris-Saclay	Président
<b>M<sup>me</sup> Halima OUADID-AHIDOUCH</b> Professeur, EA 4667, Université de Picardie Jules Verne	Rapporteur et examinatrice
<b>M. Anh Tuan DINH-XUAN</b> Professeur, PU-PH, INSERM UMR_S 1016, Université Paris Descartes	Rapporteur et examineur
<b>M<sup>me</sup> Carole PLANES</b> Professeur, PU-PH, INSERM UMR_S 1272, Université Sorbonne Paris Nord	Examinatrice
<b>M<sup>me</sup> Clarisse VANDEBROUCK</b> Professeur, UR 24184, Université de Poitiers	Examinatrice
<b>M. Maxime GUEGUINOU</b> Chargé de recherche, INSERM UMR_S 1069, Université de Tours	Examineur



# TABLE DES MATIERES

---

<b>Table des matières</b> .....	
<b>Remerciements</b> .....	
<b>Liste des Figures</b> .....	
<b>Liste des Tableaux</b> .....	
<b>Liste des travaux de thèse</b> .....	
<b>Liste des travaux hors thèse</b> .....	
<b>Liste des abréviations</b> .....	
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
1 Anatomie et physiologie de l'appareil cardiovasculaire humain.....	2
1.1 L'appareil cardiovasculaire : rôle et organisation .....	2
1.2 L'anatomie du cœur.....	3
1.3 La circulation pulmonaire .....	3
1.4 Physiologie artérielle pulmonaire .....	5
1.4.1 L'intima .....	5
1.4.2 La média.....	6
1.4.3 L'adventice .....	7
2 Hypertension pulmonaire et hypertension artérielle pulmonaire.....	8
2.1 Définition et généralités .....	8
2.2 Classification de l'hypertension pulmonaire.....	8
2.3 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) .....	10
2.3.1 Définition de l'HTAP .....	10
2.3.2 Classification.....	10
2.3.2.1 HTAP idiopathique.....	10
2.3.2.2 HTAP héritable.....	10
2.3.2.3 HTAP associé à des médicaments et des toxines.....	12
2.3.2.4 HTAP associée à une pathologie .....	12
2.3.2.5 HTAP avec caractéristiques d'atteinte veineuse/capillaire (MVOP/HCP)	
13	
2.3.2.6 HTAP persistante du nouveau-né .....	14
2.3.3 Épidémiologie.....	14

2.3.4	Diagnostic.....	15
2.4	Physiopathologie de l'HTAP.....	16
2.4.1	Aspects tissulaires et lésions anatomopathologiques.....	16
2.4.1.1	Lésions intimes.....	16
2.4.1.2	Hypertrophie de la média .....	17
2.4.1.3	Lésions plexiformes.....	18
2.4.2	Les modèles animaux d'études précliniques de l'HTAP.....	18
2.4.2.1	Modèle monocrotaline.....	18
2.4.2.2	Modèle d'hypoxie chronique .....	19
2.4.2.3	Modèle Sugen-hypoxie.....	20
2.4.2.4	Modèles alternatifs .....	21
2.4.3	La dysfonction des cellules vasculaires pulmonaires.....	22
2.4.3.1	Dysfonction des cellules endothéliales d'artères pulmonaires (CE-AP) 22	
2.4.3.2	Dysfonction des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires (CML- AP) 23	
2.4.3.3	Dysfonction des fibroblastes d'artères pulmonaires.....	24
2.4.3.4	Dysfonctions d'autres types cellulaires .....	25
2.4.4	Le déséquilibre des facteurs vasoactifs.....	26
2.4.4.1	Monoxyde d'azote .....	26
2.4.4.2	Prostacycline et thromboxane A2 .....	28
2.4.4.3	Endothéline-1.....	30
2.4.4.4	Le système rénine-angiotensine-aldostérone .....	31
2.4.5	Les facteurs de croissance.....	33
2.4.5.1	La superfamille du <i>transforming growth factor-β</i> .....	33
2.4.5.2	<i>Platelet-derived growth factor</i> .....	35
2.4.5.3	<i>Fibroblast growth factor-2</i> .....	37
2.4.6	Sérotonine.....	37
2.4.7	Dérégulations mitochondriales : métabolisme et stress oxydatif.....	38
2.4.8	Modifications épigénétiques.....	41
2.4.9	Remodelage de la matrice extracellulaire.....	43
2.4.10	La dérégulation du système immunitaire.....	45
2.4.11	La dérégulation des canaux ioniques .....	47

2.4.11.1	Les canaux potassiques.....	49
2.4.11.2	Les canaux chloriques.....	53
2.4.11.3	Canaux calciques.....	54
2.4.11.1	Autres canaux membranaires .....	54
2.5	Traitements de l'HTAP.....	55
2.5.1	Les bloqueurs des canaux calciques.....	56
2.5.2	Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline-1 .....	56
2.5.3	Les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 et les stimulateurs de la guanylate cyclase.....	57
2.5.4	Les analogues de la prostacycline et les agonistes des récepteurs de la prostacycline.....	57
2.5.5	Nouveaux traitements (études cliniques de phase 3).....	58
2.5.6	La transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire .....	60
3	Le rôle de la signalisation calcique dans l'hypertension artérielle pulmonaire.....	61
3.1	Importance du maintien de l'homéostasie calcique.....	61
3.2	Les influx calciques dans l'artère pulmonaire.....	62
3.2.1	Les influx calciques dépendants du voltage.....	62
3.2.1.1	Canaux calciques dépendants du voltage de type L.....	62
3.2.1.2	Canaux calciques dépendants du voltage de type T.....	63
3.2.2	Store-operated Ca <sup>2+</sup> Entry (SOCE) .....	64
3.2.2.1	Découverte et généralités .....	64
3.2.2.2	STIM : senseur de calcium du réticulum endoplasmique.....	65
3.2.2.3	Le canal calcique Orai .....	68
3.2.2.4	Les canaux transient receptor potential canonical (TRPC).....	70
3.2.2.5	Mécanisme du SOCE .....	73
3.2.2.6	Partenaires régulateurs du SOCE.....	74
3.2.3	Store-Independent Ca <sup>2+</sup> Entry (SICE) .....	77
3.2.3.1	Implication des canaux Orai dans le SICE.....	77
3.2.3.2	Implication des canaux TRPC dans le SICE .....	78
3.2.3.3	Implication d'autres canaux dans le SICE .....	79
3.3	Les canaux Orai et TRPC dans l'artère pulmonaire et l'HTAP.....	81
3.3.1	Cellules endothéliales .....	81
3.3.2	Cellules musculaires lisses.....	82

3.4	Les canaux Orai et TRPC et remodelage du ventricule droit.....	86
3.5	Potentiel thérapeutique des SOCs .....	87
	<b>CONTEXTE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>90</b>
	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>92</b>
1	Modèles animaux et études <i>in vivo</i> .....	93
1.1	Modèles précliniques d'hypertension pulmonaire et traitements .....	93
1.2	Échocardiographie.....	95
1.3	Mesures hémodynamiques.....	96
1.4	Prélèvements et préparation des organes .....	96
2	Étude de la contractilité de vaisseaux isolés .....	97
3	Histologie.....	99
3.1	Préparation et inclusion des tissus en paraffine.....	99
3.2	Étude de l'occlusion des vaisseaux pulmonaires .....	99
3.3	Étude de la fibrose cardiaque.....	99
3.1	Étude de l'hypertrophie des cardiomyocytes.....	100
4	Prélèvement et Culture des cellules primaires.....	100
4.1	Isolement et culture des CML-AP .....	100
4.2	Isolement et culture des CE-AP.....	101
5	Etudes cellulaires.....	101
5.1	Transfection des CML-AP et CE-AP.....	101
5.2	Test de prolifération par incorporation de bromodésoxyuridine.....	103
5.3	Test de migration par cicatrisation.....	103
5.4	Test de résistance à l'apoptose induite par la staurosporine.....	104
5.5	Mesure du calcium intracellulaire.....	105
5.6	Mesure du potentiel de membrane des mitochondries .....	106
6	Immunomarquage fluorescent.....	107
7	Biologie moléculaire.....	108
7.1	Étude de l'expression génique.....	108
7.1.1	Extraction des ARN .....	108
7.1.2	Transcription inverse .....	108
7.1.3	Réaction de polymérase en chaine quantitative.....	109
7.2	Étude de l'expression génique.....	110
7.2.1	Extraction protéique.....	110

7.2.2 Western-blot .....	110
8 Analyses statistiques.....	112
<b>Exposé des travaux.....</b>	<b>113</b>
1 <sup>ER</sup> PROJET : Orai1 inhibitors as potential treatments for pulmonary arterial hypertension ...	114
1 Résumé de l'article .....	114
2 Publication.....	116
2 <sup>ÈME</sup> PROJET : Contribution of TRPC channels in human and experimental pulmonary arterial hypertension.....	169
1 Résumé de l'article .....	169
2 Publication.....	170
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>197</b>
1 Rôle des canaux SOC dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP .....	198
1.1 La composition du SOCE dans les CML-AP .....	198
1.2 Expression et régulation des canaux Orai et TRPC.....	198
1.3 Les autres isoformes d'Orai1 : Orai2 et Orai3 .....	202
1.4 Rôle du SOCE dans le phénotype pathologique des CML-AP de patients atteints d'HTAP .....	202
1.5 Rôle du SOCE dans vasoconstriction des AP de patients atteints d'HTAP .....	203
2 L'inhibition du canal Orai1 : une cible thérapeutique dans l'HTAP ? .....	204
2.1 Le SOCE dans les autres types cellulaires impliqués dans l'HTAP.....	204
2.1.1 Cellules endothéliales .....	204
2.1.2 Fibroblastes.....	205
2.1.3 Cellules immunitaires.....	205
2.1.4 Cardiomyocytes.....	206
2.1.5 Autres types cellulaires.....	206
2.2 L'inhibition du canal Orai1 dans l'HTAP : vers un futur traitement ? .....	207
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>209</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>211</b>

## REMERCIEMENTS

---

En premier lieu, je souhaite exprimer toute ma gratitude à tous les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je remercie le Pr Marc Humbert pour l'honneur qu'il me fait de présider ce jury de thèse. Merci également de m'avoir accueilli et invité à rejoindre la Graduate School Health and Drugs Sciences en tant que représentant des doctorants. Je tiens également à remercier le Pr Halima Ouadid-Ahidouch et le Pr Anh Tuan Dinh-Xuan d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. J'associe à ces remerciements le Pr Carole Planes, le Pr Clarisse Vandebrouck et le Dr Maxime Gueguinou pour leur participation à ce jury en qualité d'examineur. Je tiens également à vous remercier, Pr Clarisse Vandebrouck, pour m'avoir accueilli et accepté lors de mon entretien d'entrée au cursus master en ingénierie, ce qui a marqué le début de mon aventure universitaire et scientifique.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse le Dr Fabrice Antigny pour m'avoir accompagné et aidé lors de ces trois années de thèse. Je te suis reconnaissant de m'avoir fait confiance pour passer le concours de l'école doctorale, de m'avoir associé aux différents projets auxquels j'ai eu l'occasion de participer ou encore pour présenter nos travaux en congrès. Merci pour ton implication, ta réactivité et ta disponibilité pour analyser des résultats, répondre à mes interrogations, réfléchir à des idées et expériences, ou encore aider à la paillasse. Et encore merci de t'occuper de moi et tes étudiants comme tu le fais, que ça soit le week-end pour les traitements ou les quelques nuits avec les cardio de cochons !

Je tiens également à adresser mes remerciements au Dr Véronique Capuano qui m'a aidé dans ces travaux de thèse. Merci de m'avoir aidé au labo, en culture cellulaire ou pour différentes expériences, mais aussi de m'avoir transmis ta rigueur et tes protocoles. Je te remercie également pour ta disponibilité pour les discussions ou les conseils sur les présentations. Et merci de gérer jusqu'à 11 siARN pour ces dernières expériences avec de (trop) nombreux canaux !!

Un grand merci au Dr Hélène Le Ribeuz (oui, je sais, ça te fait plaisir que je t'appelle Dr). Le petiot (devenu grand) te remercie pour le temps que tu as passé à m'aider sur des manip ou les discussions au labo. C'était cool de partager des bières au PO ou en attendant d'enlever les ibidi !

Merci également aux petits jeunes de l'équipe. C'était sympa de t'avoir dans le bureau

Loann, j'espère que tout se passe bien en Suisse. Merci Antoine (même si tu n'es pas trop un petit jeune) pour ta bonne humeur et ta détente. On fête bientôt ta thèse de médecine ! Merci également à toi, Anaïs, tu as pris le relais des discussions après 18h! Content que tu puisses faire ta thèse au labo et bon courage pour la suite de l'aventure. Merci pour cette chenille mémorable et n'oublie pas ton casque à vélo !!

Merci aux étudiants « de l'autre bout du labo », Lucille pour ces petites vacances accompagnées de rousquilles, Dr le F pour ta bonne humeur au laboratoire (et encore bravo pour ta thèse), et Julien pour ton super bon plan sur le plafond des toilettes.

Thanks also to you, Joana, for brightening up the lab with your Portuguese accent these last few months! Thanks for these more or less scientific exchanges, often with beer, I hope the end of your thesis (and the rest) will go well for you! And yes, I know, you could have read me in French, because now you're almost French.

Je tenais également à remercier toute l'équipe de l'U999. Merci au Pr David Montani pour les discussions toujours très pertinentes lors des réunions. Merci à toi Mary pour ta sympathie et ton aide pour les manips. Merci également Yann pour ton sourire et pour m'avoir passé le flambeau de la cytométrie en flux. Merci Yvonne pour ton aide à tout instant, merci de rattraper nos commandes en urgence et surtout merci pour ta bonne humeur quotidienne. Merci également au Dr Angèle Boët pour ta disponibilité pour les échos malgré tes emplois du temps souvent très chargés. Merci à Christelle, Audrey et Bahgat pour les moments passés avec eux. Merci également à tous les membres de l'unité avec qui j'ai eu l'occasion de passer des moments, que ça soit au labo ou en congrès.

Et mon estomac remercie tous les pâtisseries de l'équipe, sans qui il n'aurait pas été aussi comblé !!

Je tenais également à remercier le Dr Nasire Mahmudi et le Dr John Mackrill qui m'ont permis de progresser lors de mes années universitaires.

Un énorme merci à mes parents, merci de m'avoir soutenu pendant toutes ces années, merci de prendre soin de moi malgré la distance. Même si je ne rentre pas toujours suffisamment vous voir sachez que je pense à vous et que je vous aime. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir permis de réaliser mes études dans de bonnes conditions, sans jamais manquer de rien. Merci aussi à ma sœur, Solène, d'avoir toujours été là, même pour corriger quelques fautes sur 200 pages !!

Merci à tous mes amis, de Paris et d'ailleurs, sans qui je n'aurai pas pu décrocher

pendant ces années. Merci à vous Caro, Emma, Rémi, Cédric, Matthieu et Guillaume pour m'avoir accompagné galoper le week-end et pour ces moments partagés (DOUREUUUH). Merci à Louis et Camille d'être là et de partager autant de bons moments depuis la fac. Merci Florence d'avoir été présente pendant ce début de thèse. Merci également à toi, Juju, malgré la distance je sais que l'on sera toujours content de se retrouver. Merci également aux lourdéchois pour avoir partagé ces années de master ainsi que les vacances ensuite. Merci aux Sanofiens Lucie, Gala et Dana pour les moments à Chilly et les autres. Et merci aux plus ou moins anciens d'Imagine, vous faites partie des belles rencontres que j'ai effectuées pendant mes années à Paris. Enfin, merci à toi Mathilde d'avoir embelli cette dernière année de thèse, merci d'être là tous les jours et merci pour tous ces sup(b)er moments qui m'ont beaucoup aidé. On retourne quand tu veux visiter les endroits abandonnés d'Angou ! Et surtout, ne t'inquiète pas (trop) pour la suite.

Enfin, merci à mes grands-parents. Merci pour tous ces moments de détente chez vous. Merci à toi papi d'encore essayer de comprendre le sujet et le but de mes recherches. J'ai une pensée toute particulière pour toi mamie, je sais que tu aurais apprécié voir ma thèse. Merci d'avoir été une mamie géniale pendant toutes ces années et de m'avoir transmis ces derniers mots.

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : La circulation sanguine (d'après MARIEB) _____	2
Figure 2 : L'anatomie cardiaque _____	3
Figure 3 : La circulation pulmonaire et les échanges gazeux (d'après Larousse Médical) _____	4
Figure 4 : Structure d'une artère pulmonaire _____	5
Figure 5 : Forces mécaniques s'exerçant sur l'artère pulmonaire (d'après [5]) _____	6
Figure 6 : Contraction d'une cellule musculaire lisse [7] _____	6
Figure 7 : Composition de l'adventice [12] _____	7
Figure 8 : Lésion intimale d'AP de patients atteints d'HTAP [58] _____	17
Figure 9 : Hypertrophie de la média d'une artère pulmonaire d'un patient atteint d'HTAP [59] _____	17
Figure 10 : Lésion plexiforme à canaux sinusoïdaux multiples d'artère pulmonaire d'un patient atteint d'HTAP [58] _____	18
Figure 11 : Voie du monoxyde d'azote (NO) conduisant à la relaxation cellulaire _____	26
Figure 12 : Production de thromboxane A <sub>2</sub> (TXA <sub>2</sub> ) et Prostacycline (PGI <sub>2</sub> ) _____	29
Figure 13 : Production et rôle de l'endothéline-1 sur les cellules vasculaires pulmonaires _____	31
Figure 14 : Voies de signalisation liées au transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) et au bone morphogenetic proteins (BMP) [187] _____	34
Figure 15 : Concentration et gradients électriques et chimiques des principaux ions dans les cellules de mammifères _____	49
Figure 16 : Voies de traitement actuel de l'HTAP [13] _____	56
Figure 17 : Mécanisme d'action proposé du sotatercept dans l'hypertension artérielle pulmonaire [357] _____	59
Figure 18 : Entrée calcique dans une cellule de mammifère : les canaux calciques dépendants du voltage, Store-Operated Calcium Entry (SOCE) et Store-Indépendant Calcium Entry (SICE) _____	62
Figure 19 : Comparaison entre I <sub>CRAC</sub> et I <sub>SOC</sub> dans des cellules HEK transfectées avec STIM1 + Orai1 _____	64
Figure 20 : Topologie et organisation des domaines clés de STIM1 _____	66
Figure 21 : Topologie du canal calcique Orai1 et domaine d'interaction avec STIM1 _____	69
Figure 22 : Topologie des canaux TRPC et principaux domaines _____	71
Figure 23 : Mécanisme d'activation du store operated calcium entry (SOCE) _____	74
Figure 24 : Les différents protocoles de modèles expérimentaux _____	95
Figure 25 : Montage des artères sur le myographe _____	98
Figure 26 : Mode d'action des siARN _____	102
Figure 27 : Protocole expérimental du test de migration _____	104
Figure 28 : Analyse des cellules musculaires lisses humaines par marquage à l'annexine V et au iodure de propidium _____	105
Figure 29 : Protocole d'induction de l'influx SOC _____	106

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Classification de l'hypertension pulmonaire (d'après [13]).....	9
Tableau 2 : Gènes mutés dans l'HTAP .....	11
Tableau 3 : Médicaments ou toxines associés avec l'HTAP .....	12
Tableau 4 : Inhibiteurs d'Orai1 .....	70
Tableau 5 : Propriétés électrophysiologiques des canaux TRPC .....	72
Tableau 6 : Inhibiteurs des canaux TRPC.....	72
Tableau 7 : Description des siARN utilisés .....	102
Tableau 8 : Caractéristiques des anticorps primaires pour l'immunofluorescence .....	107
Tableau 9 : Caractéristiques des amorces utilisées.....	109
Tableau 10 : Caractéristiques des anticorps primaires pour les immunoblots .....	111

## **LISTE DES TRAVAUX DE THESE**

---

### **1<sup>ère</sup> revue :**

#### **Role of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in the Pulmonary Vascular Remodeling Occurring in Pulmonary Arterial Hypertension**

**Auteurs :** **Bastien Masson**, David Montani, Marc Humbert, Véronique Capuano et Fabrice Antigny

**Publié** le 27/11/2021, Biomolecules

**Doi:** 10.3390/biom11121781

### **2<sup>ème</sup> revue :**

#### **The SOCE Machinery: An Unbalanced Knowledge between Left and Right Ventricular Pathophysiology**

**Auteurs :** Jessica Sabourin, Antoine Beauvais, Rui Luo, David Montani, Jean-Pierre Benitah, **Bastien Masson** et Fabrice Antigny

**Publié** le 18/10/2022, Cells

**Doi:** 10.3390/cells11203282

### **3<sup>ème</sup> revue :**

#### **Rôle des canaux ioniques dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire**

**Auteurs :** **Bastien Masson**, Anaïs Saint-Martin Willer, Kristelle El Jekmek, David Montani, Véronique Capuano et Fabrice Antigny

**En soumission**, EMC pneumologie

### **1<sup>er</sup> article de recherche :**

#### **Orai1 Inhibitors as Potential Treatments for Pulmonary Arterial Hypertension**

**Auteurs :** **Bastien Masson**, Hélène Le Ribeuz, Jessica Sabourin, Loann Laubry, Emily Woodhouse, Richard Foster, Yann Ruchon, Mary Dutheil, Angèle Boët, Maria-Rosa Ghigna, Vincent Thomas De Montpreville, Olaf Mercier, David J. Beech, Jean-Pierre Benitah, Marc A. Bailey, Marc Humbert, David Montani, Véronique Capuano et Fabrice

Antigny

**Publié** le 27/09/2022, Circulation Research

**Doi:** 10.1161/CIRCRESAHA.122.321041

**2<sup>ème</sup> article de recherche :**

**Contribution of TRPC channels in human and experimental pulmonary arterial hypertension**

**Auteurs :** **Bastien Masson**, Anais Saint-Martin Willer, Mary Dutheil, Lucille Penalva, Hélène Le Ribeuz, Kristelle El Jekmek, Yann Ruchon, Sylvia Cohen-Kaminsky, Jessica Sabourin, Marc Humbert, Olaf Mercier, David Montani, Véronique Capuano et Fabrice Antigny

**Publié** le 27/06/2023, American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology

**Doi:** 10.1152/ajplung.00011.2023

## **LISTE DES TRAVAUX HORS THESE**

---

### **1<sup>er</sup> article de recherche :**

#### **Right Ventricle Remodeling Metabolic Signature in Experimental Pulmonary Hypertension Models of Chronic Hypoxia and Monocrotaline Exposure**

**Auteurs :** Thaïs Hautbergue, Fabrice Antigny, Angèle Boët, François Haddad, **Bastien Masson**, Mélanie Lambert, Amélie Delaporte, Jean-Baptiste Menager, Laurent, Jérôme Le Pavec, Elie Fadel, Marc Humbert, Christophe Junot, François Fenaille, Benoit Colsch et Olaf Mercier

**Publié** le 21/06/2021, Cells

**Doi:** 10.3390/cells10061559

### **2<sup>ème</sup> article de recherche :**

#### **SUR1 As a New Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension**

**Auteurs :** Hélène Le Ribeuz, **Bastien Masson**, Véronique Capuano, Mary Dutheil, Hans Gooroochurn, Angèle Boët, Maria-Rosa Ghigna, Vincent De Montpreville, Barbara Girerd, Mélanie Lambert, Olaf Mercier, Wendy K Chung, Marc Humbert, David Montani et Fabrice Antigny

**Publié** le 14/04/2021, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology

**Doi:** 10.1165/rcmb.2021-0180OC

### **3<sup>ème</sup> article de recherche :**

#### **Involvement of SUR2/Kir6.1 channel in the physiopathology of pulmonary arterial hypertension**

**Auteurs :** Hélène Le Ribeuz, **Bastien Masson**, Mary Dutheil, Angèle Boët, Antoine Beauvais, Jessica Sabourin, Vincent Thomas De Montpreville, Véronique Capuano, Olaf Mercier, Marc Humbert, David Montani et Fabrice Antigny

**Publié** le 10/01/2023, Frontiers in Cardiovascular Medicine

**Doi:** 10.3389/fcvm.2022.1066047

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

**$\Delta\Psi_m$**  : potentiel membranaire mitochondrial  
**5-HT** : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)  
**[Ca<sup>2+</sup>]** : concentration calcique  
**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** : concentration calcique intracellulaire  
 **$\alpha$ -SMA** :  $\alpha$ -smooth muscle actin  
**ABCC8** : *ATP binding cassette channel member 8*  
**ABCC9** : *ATP binding cassette channel member 9*  
**ACE** : *angiotensin converting enzyme*  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire  
**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique  
**AngII** : Angiotensine II  
**AP** : artère pulmonaire  
**ARC** : *arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup> channels*  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ARNm** : acides ribonucléiques messagers  
**ASIC** : *acid sensing ion channels*  
**ATP** : adenosine triphosphate  
**BMP** : *bone morphogenic protein*  
**BMPR2** : *bone morphogenic protein receptor type II*  
**BNP** : *brain natriuretic peptide*  
**Ca<sup>2+</sup>** : calcium  
**CAD** : *CRAC-activating domain*  
**CaSR** : *Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor*  
**CC** : *coiled-coil*

**IL6** : interleukine 6  
**Isoc** : courant médié par les SOC  
**JAK** : Janus kinases  
**K<sup>+</sup>** : potassium  
**KCNK3** : *Potassium channel subfamily K member 3*  
**LRC** : *LTC4-regulated calcium channels*  
**MAPK** : *Mitogen-activated protein kinases*  
**MCT** : monocrotaline  
**MCU** : *mitochondrial calcium uniporter*  
**mmHg** : millimètre de mercure  
**MVOP** : maladie veino-occlusive pulmonaire  
**NO** : *nitric oxyde* (monoxyde d'azote)  
**O<sub>2</sub>** : dioxygène  
**miR** : micro-ARN  
**MLC** : *myosin light chain*  
**MMP** : métalloprotéinases matricielles  
**NADP** : *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*  
**NFAT** : *Nuclear factor of activated T-cells*  
**PAPm** : pression de l'artère pulmonaire moyenne  
**PBS** : *phosphate-buffered saline*  
**PCR** : *polymerase chain reaction*  
**PDE** : phosphodiesterase  
**PDGF** : *platelet-Derived Growth Factor*  
**PG** : prostaglandine  
**PKC** : protéine kinase C  
**PLC** : phospholipase C  
**RCPG** : récepteurs couples aux protéines G  
**RE** : réticulum endoplasmique  
**RISC** : *RNA-induced silencing complex*

**CCDV** : canaux calciques dépendants du voltage  
**CCDV-L** : canaux calciques dépendants du voltage de type L  
**CCDV-T** : canaux calciques dépendants du voltage de type T  
**CDI** : *Calcium-dependent inactivation*  
**CE** : cellule endothéliale  
**CE-AP** : cellule endothéliale de l'artère pulmonaire  
**CFTR** : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*  
**Cl<sup>-</sup>** : chlorure  
**CML** : cellule musculaire lisse  
**CML-AP** : cellule musculaire lisse de l'artère pulmonaire  
**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone  
**COX** : cyclo-oxygénase  
**CRAC** : *calcium release-activated calcium channel*  
**CRACR2A** : *calcium release activated channel regulator 2A*  
**DAG** : diacylglycérol  
**eNOS** : *endothelial nitric oxide synthase*  
**ERK** : *extracellular signal-regulated kinases*  
**ET-1** : endothéline de type 1  
**ETON** : *extended transmembrane Orai1 N-terminal*  
**FGF2** : *fibroblast growth factor-2*  
**GCs** : guanylate cyclase soluble  
**GDF** : *growth differentiation factor*  
**GMPc** : guanosine monophosphate cyclique  
**HDAC** : histones désacétylases  
**HIF1- $\alpha$**  : *hypoxia inducible factor 1 $\alpha$*   
**HR** : *heart rate* (Fréquence cardiaque)  
**HTP** : hypertension pulmonaire  
**ROS** : *reactive oxygen species*  
**RS** : réticulum sarcoplasmique  
**RVP** : résistance vasculaire pulmonaire  
**SAM** : *sterile alpha motif*  
**SERCA** : *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase*  
**siARN** : *small interfering ARN*  
**SICE** : *store-independent calcium entry*  
**SNP** : *single Nucleotide polymorphism*  
**SOAR** : *STIM1-Orai1-activating region*  
**SOC** : *store-operated calcium channel*  
**SOCE** : *store-operated calcium entry*  
**SOD** : superoxyde dismutase  
**STIM** : *stromal interacting molecule*  
**Su/Hx** : sugen/hypoxie  
**SUR** : *sulfonylurea receptor*  
**SV** : *stroke volume*  
**SVF** : sérum de veau foetal  
**TGF- $\beta$**  : *transforming growth factor  $\beta$*   
**TM** : segment transmembranaire  
**TPH1** : tryptophane hydroxylase  
**TXA2** : thromboxane A2  
**TRP** : *transient receptor potential*  
**TRPA** : *transient receptor potential ankyrin*  
**TRPC** : *transient receptor potential canonical*  
**TRPM** : *transient receptor potential melastatin*  
**TRPML** : *transient receptor potential mucolipin*  
**TRPN** : *transient receptor potential no mechanoreceptor potential C*  
**TRPP** : *transient receptor potential polycystin*  
**TRPV** : *transient receptor potential vanilloid*  
**VD** : ventricule droit

**HTAP** : hypertension artérielle  
pulmonaire

**HTAPi** : hypertension artérielle  
pulmonaire idiopathique

**ICRAC** : courant médié par les canaux  
CRAC

**VEGF** : *vascular endothelial growth factor*

**VG** : ventricule gauche

**VIH** : virus de l'immunodéficience  
humaine

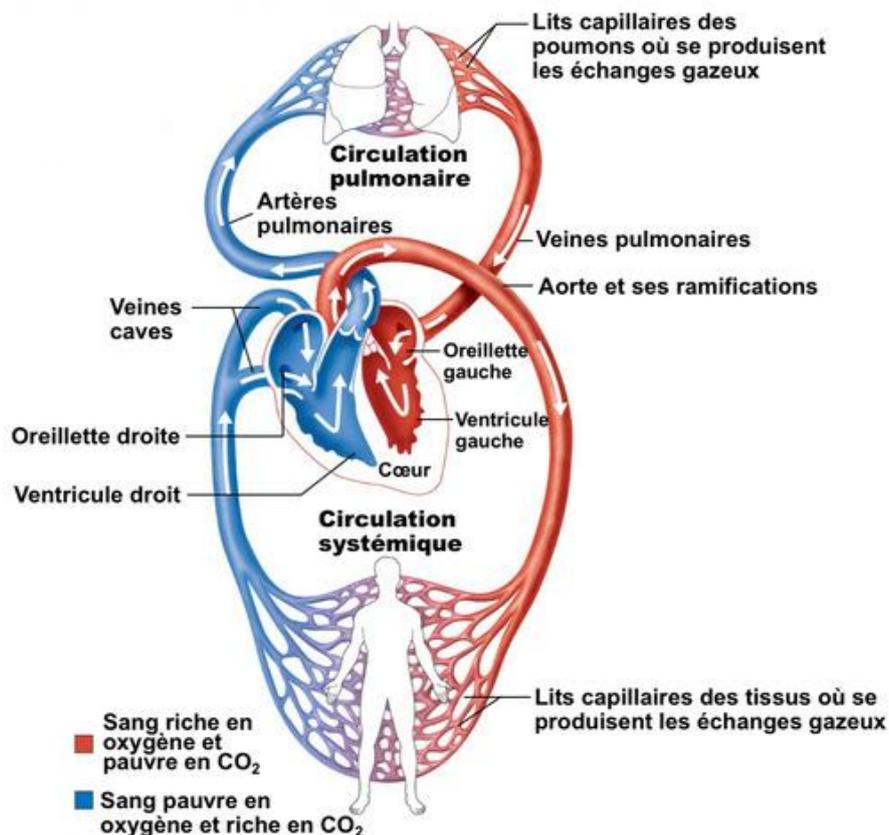
**VWF** : facteur Von Willebrand

# INTRODUCTION

# 1 ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL CARDIOVASCULAIRE HUMAIN

## 1.1 L'appareil cardiovasculaire : rôle et organisation

L'importance vitale de la circulation sanguine a été mise en évidence très tôt, avec des écrits datant de l'Antiquité, et une description du système circulatoire dès 1242 par Ibn al-Nafis [1]. C'est en 1628 que le médecin anglais William Harvey effectue la première description complète de la circulation sanguine, une circulation fermée où le sang est propulsé par le cœur dans les artères, jusqu'aux organes, puis est ramené au cœur par les veines. C'est la première description complète de ce système commun aux mammifères, composé de la circulation systémique, appelée grande circulation, et la circulation pulmonaire, appelée petite circulation (Figure 1).



**Figure 1** : La circulation sanguine (d'après MARIEB)

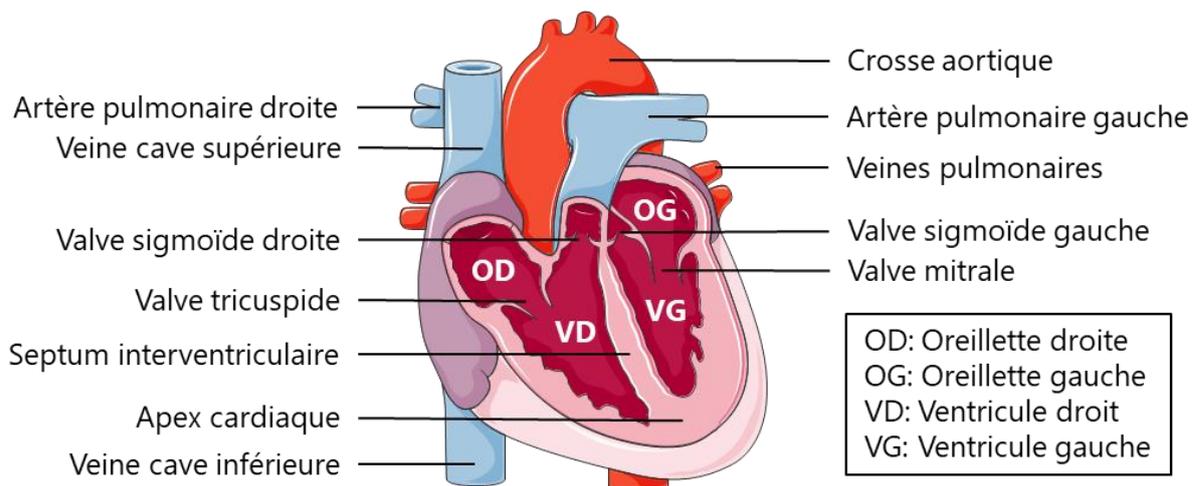
Le rôle de la circulation systémique est de transporter le sang riche en oxygène (O<sub>2</sub>) et pauvre en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) du cœur vers les différents tissus. Le sang issu de la grande circulation provient de l'aorte éfrente du ventricule gauche et parcourt les ramifications afin d'irriguer les organes à travers les parois des capillaires. Ensuite, le sang appauvri en O<sub>2</sub> et enrichi en CO<sub>2</sub> retourne au cœur via l'oreillette droite à travers les veines. C'est un système à haute pression, les pressions atteignant 100 à 140 mmHg

dans l'aorte.

La circulation pulmonaire élimine le CO<sub>2</sub> tout en réoxygénant le sang veineux. Elle prend naissance dans le ventricule droit, où le sang est éjecté par l'artère pulmonaire (AP) vers les capillaires pulmonaires, lieu d'échange avec les alvéoles pulmonaires. Le sang revient ensuite à l'oreillette gauche par les veines pulmonaires. C'est un système à basse pression qui assure l'oxygénation du sang, avec une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) d'environ 14 mmHg au repos, mais à haut débit, car elle reçoit tout le débit cardiaque.

## 1.2 L'anatomie du cœur

Le cœur est un organe musculaire creux agissant comme une pompe afin de réceptionner le sang riche en oxygène provenant des poumons et le distribuer dans tout l'organisme. Ses contractions régulières vont permettre, chez l'humain, un débit cardiaque au repos d'environ 5 l/min. Il est divisé en deux parties par une paroi épaisse, appelée septum (Figure 2). Chaque partie (droite et gauche) est composée de deux cavités, l'oreillette et le ventricule. Ces deux cavités sont séparées par une valve, tricuspide à droite et mitrale à gauche. Il est également retrouvé les valves sigmoïdes à la sortie des ventricules. Ces valves assurent la bonne circulation sanguine en s'ouvrant et se fermant en fonction des pressions dans les différentes cavités.



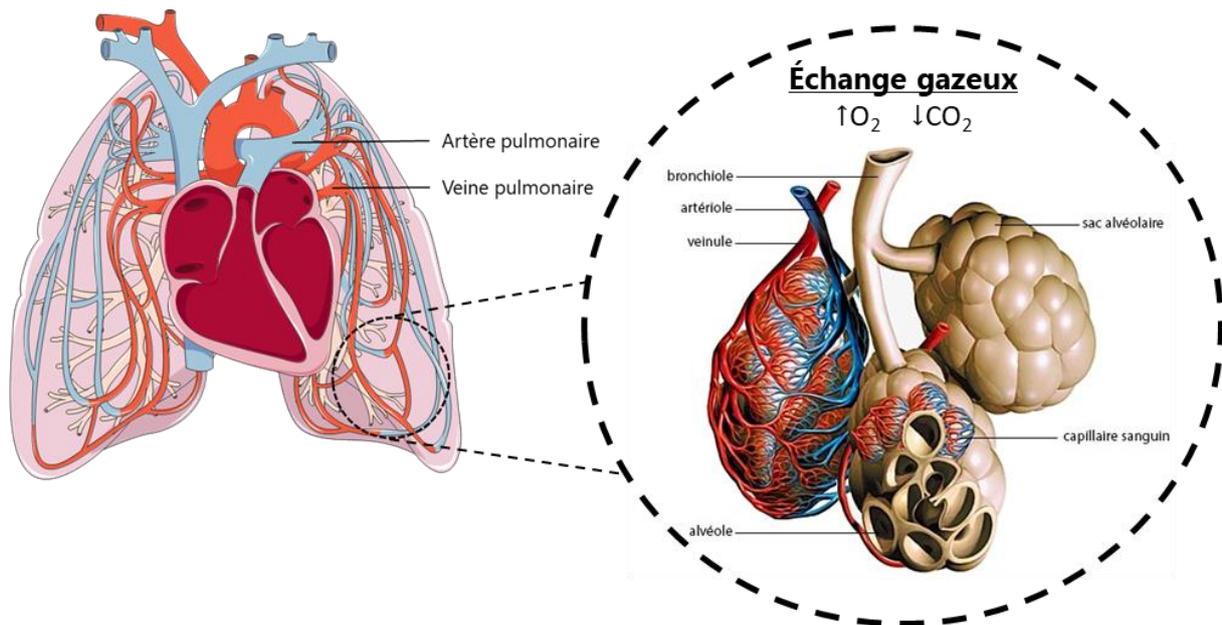
**Figure 2** : L'anatomie cardiaque

## 1.3 La circulation pulmonaire

D'un point de vue anatomique, les humains ont deux poumons : le poumon droit composé de trois lobes et le poumon gauche est composé de deux lobes. Cet organe

intrathoracique est situé dans la cavité pleurale. Il est recouvert d'une membrane protectrice, la plèvre, et est en contact avec le diaphragme, le muscle inspiratoire permettant l'entrée et la sortie d'air des voies respiratoires.

L'arbre bronchique est principalement constitué de bronches subdivisées en bronchioles se terminant en sacs alvéolaires. Chaque ramification va provoquer l'augmentation de la surface d'échange afin d'assurer la principale fonction du poumon : les échanges gazeux (Figure 3).

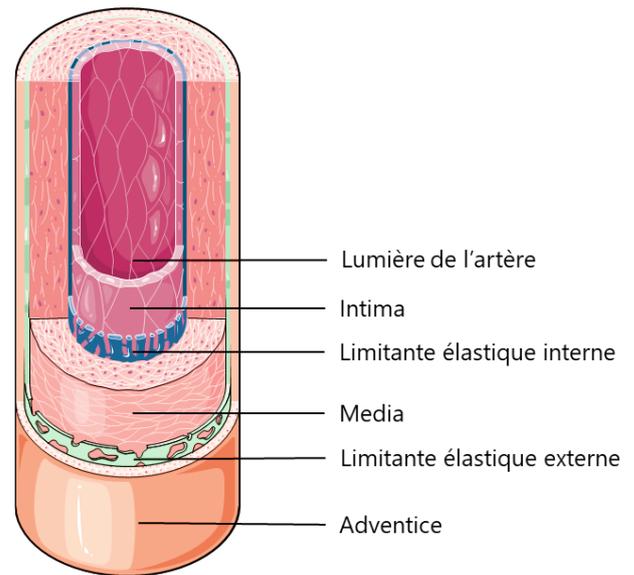


**Figure 3** : La circulation pulmonaire et les échanges gazeux (d'après Larousse Médical)

Ces échanges, appelés hématoxe, se produisent au niveau de la membrane alvéolo-capillaire formée par un réseau de millions de vaisseaux broncho-alvéolaires et capillaires. L' $O_2$  inhalé passera ainsi des alvéoles aux capillaires, tandis que le  $CO_2$  excrété par les cellules entrera dans l'air alvéolaire. Le sang entrant dans les capillaires alvéolaires, arrivant des AP, aura une pression partielle de  $CO_2$  ( $pCO_2$ ) de 45 mmHg et 40 mmHg de  $pO_2$ , alors que le sang sortant aura une  $pCO_2$  de 40mmHg et une  $pO_2$  de 104 mmHg.

## 1.4 Physiologie artérielle pulmonaire

L'anatomie des AP est similaire à celle des artères systémiques. Les AP ont une paroi épaisse, musculeuse et élastique. Ces propriétés sont obtenues grâce aux 3 couches concentriques distinctes qui les composent. Ces couches sont séparées entre elles par une limitante élastique composée d'élastine et de collagène [2]. À partir de la lumière, on distingue l'intima, la média puis l'adventice, et chacune de ces 3 couches joue un rôle particulier dans le maintien de l'homéostasie circulatoire (Figure 4).



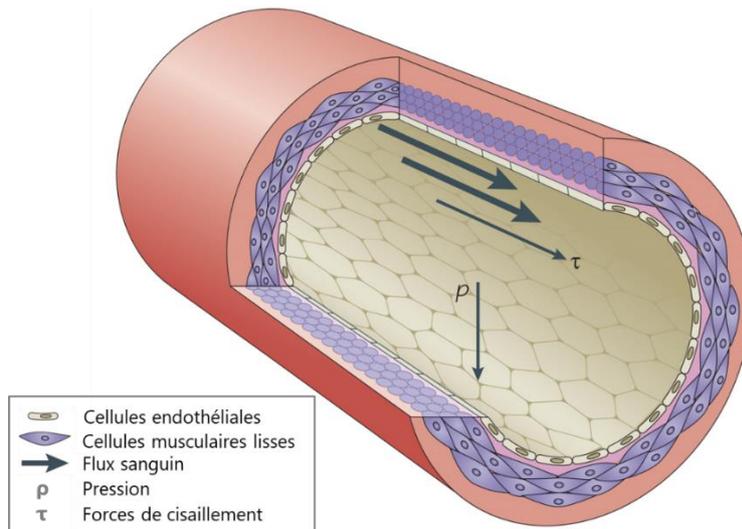
**Figure 4 :** Structure d'une artère pulmonaire

### 1.4.1 L'intima

L'intima est la tunique en contact avec le flux sanguin. Elle est formée d'une monocouche de cellules endothéliales jointives, formant l'endothélium, d'une lame basale et d'une couche sous-endothéliale de tissu conjonctif. Situées à l'interface sang-vaisseau, les cellules endothéliales sont capables de réagir à différents signaux : molécules du flux sanguin, variations de pressions osmotiques et les forces mécaniques (contraintes de cisaillement (*shear stress*), tension) provoquées par le flux sanguin (Figure 5).

En réponse à ces stimuli, l'endothélium joue un rôle central dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques, comme le tonus vasculaire [3]. Cela permet la modification du diamètre du vaisseau afin de l'adapter au débit sanguin. Le processus de mécanotransduction permet aux cellules endothéliales de modifier le diamètre artériel pulmonaire par la sécrétion de facteurs vasoactifs, soit vasoconstricteurs comme le thromboxane A<sub>2</sub>, l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II, soit vasodilatateurs, tels que le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline ou le peroxyde d'hydrogène [4].

De plus, l'endothélium joue un rôle de régulation des phénomènes inflammatoires locaux, via la production de cytokines ou des *reactive oxygen species* (ROS). L'endothélium entretient ainsi un rôle de communication très important avec les autres tuniques et notamment la média.

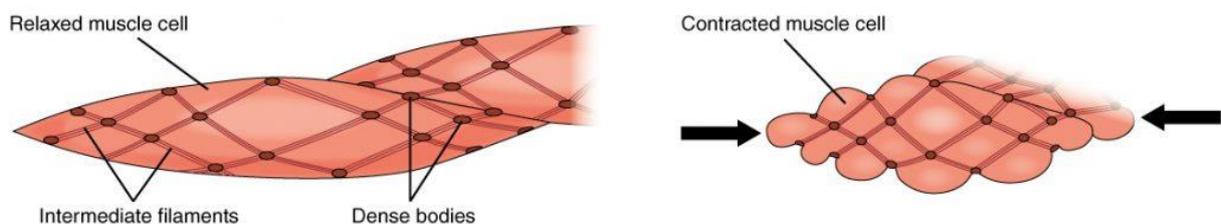


**Figure 5 :** Forces mécaniques s'exerçant sur l'artère pulmonaire (d'après [5])

### 1.4.2 La média

La média est la tunique la plus épaisse de l'artère, et son épaisseur et sa structure déterminent la contractilité des artères. Cette couche intermédiaire est bordée par les deux limitantes élastiques, interne et externe. La média est organisée en feuillets musculo-élastiques formés par les cellules musculaires lisses (CML), cellules mononuclées fusiformes disposées concentriquement [6].

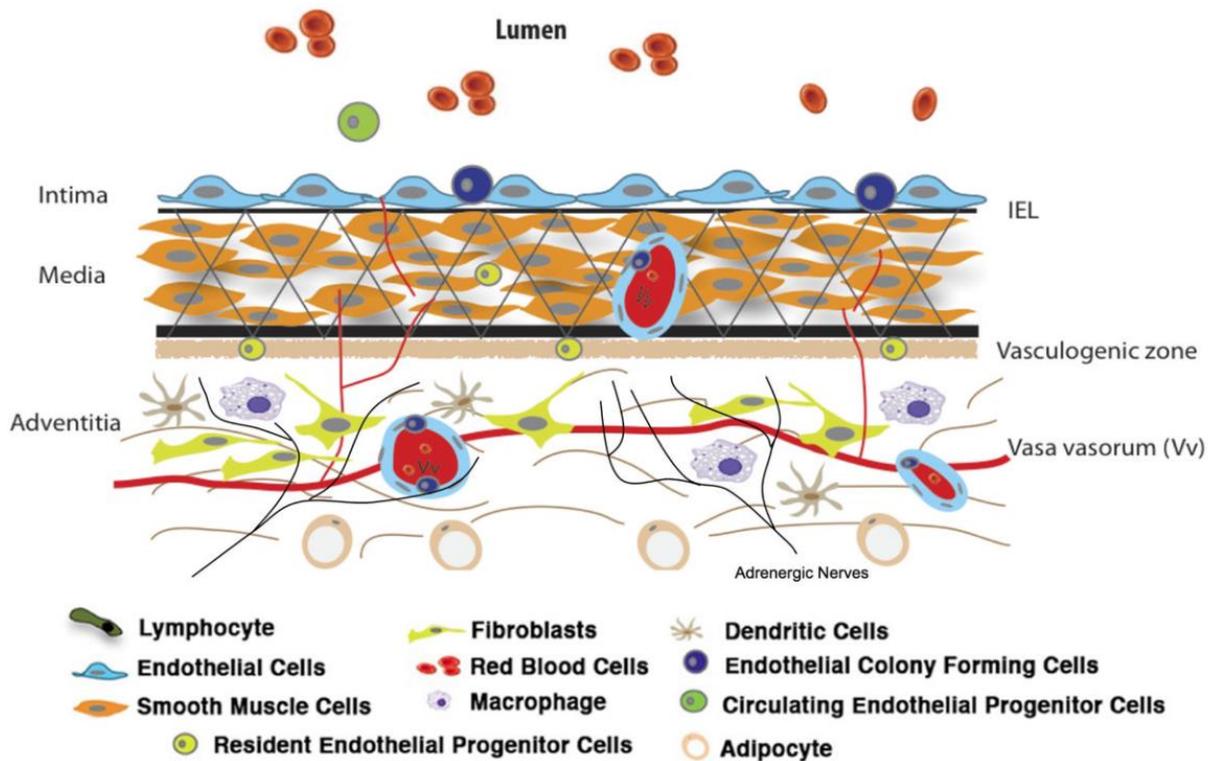
Les CML sont capables de se contracter grâce à un réseau maillé de protéines contractiles insérées de façon circonférentielle dans la cellule. Cette contraction s'effectue via le cytosquelette, plus précisément grâce à l'interaction entre la myosine et l'actine qui est fixée au niveau des corps denses (Figure 6). Cette interaction s'effectue par la phosphorylation de la *myosine light chain* (MLC). Ces phosphorylations sont régulées par l'activité d'une kinase (*myosine light chain kinase*, MLCK) et de la phosphatase (*Myosine light chain phosphatase*, MLCP). Lorsque ces cellules se contractent, le diamètre artériel diminue, entraînant une augmentation de pression artérielle.



**Figure 6 :** Contraction d'une cellule musculaire lisse [7]

### 1.4.3 L'adventice

L'adventice, située à l'extérieur de la paroi vasculaire, est le feuillet le plus complexe de l'architecture vasculaire. Effectivement, elle est principalement composée de fibres de collagènes longitudinaux et de fibroblastes orientés concentriquement, mais contenant également des fibres élastiques, cellules progénitrices et cellules immunitaires (Figure 7) [8–10]. L'adventice est aussi une couche innervée et vascularisée par un réseau de capillaires sanguins (provenant de la division d'autres artères) le *vasa vasorum*, permettant d'apporter des nutriments et de l'O<sub>2</sub> aux vaisseaux [11].



**Figure 7 :** Composition de l'adventice [12]

L'adventice régule également la fonction vasculaire. En effet, en réponse à des stimuli hormonaux, inflammatoires ou mécaniques, les cellules adventitielles sont connues pour sécréter des cytokines, chimiokines, facteurs angiogéniques et de croissance pouvant réguler les cellules vasculaires et le *vasa vasorum* [12].

## 2 HYPERTENSION PULMONAIRE ET HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE

### 2.1 Définition et généralités

L'hypertension pulmonaire (HTP) est un état pathologique défini par une élévation de la PAPm supérieure à 20 mmHg au repos, en opposition avec la PAPm de  $14 \pm 3$  mmHg en condition non pathologique [13]. L'HTP est un trouble physiopathologique complexe, pouvant être associé à différentes maladies cardiovasculaires et pulmonaires, impliquant ainsi plusieurs conditions cliniques. Cette complexité implique un algorithme précis de prise en charge et détections des patients atteints d'HTP.

L'HTP est caractérisée par l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP), imposant une résistance à l'éjection sanguine du ventricule droit (VD), entraînant son hypertrophie. Cette hypertrophie compensatoire, permettant la circulation du sang dans la circulation pulmonaire, va aboutir dans les cas d'atteintes chroniques à une insuffisance cardiaque droite et à terme au décès du patient.

En termes de symptômes, l'HTP se traduit par des difficultés à l'effort (essoufflement, fatigue excessive voire évanouissement), qui peuvent passer inaperçues, rendant le diagnostic difficile.

### 2.2 Classification de l'hypertension pulmonaire

Afin de mieux appréhender, diagnostiquer et prendre en charge les patients atteints d'HTP, une classification clinique a été élaborée lors du 2<sup>nd</sup> congrès mondial des HTP en 1998. Cette classification est régulièrement révisée, la plus récente datant de 2022 [13]. Elle contient cinq groupes, regroupant les HTP en fonction de leurs similitudes cliniques, mécanismes pathophysiologiques, caractéristiques hémodynamiques, et de leur prise en charge thérapeutique (Tableau 1). Le groupe 1 contient l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), le groupe 2 l'HTP associée à une cardiopathie gauche, le groupe 3 l'HTP associée à des maladies pulmonaires et/ou à l'hypoxie, le groupe 4 l'HTP associée à des obstructions de l'artère pulmonaire et le groupe 5 l'HTP avec des mécanismes peu clairs et/ou multifactoriels. Lors de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé au groupe 1 de l'HTAP.

**Tableau 1** : Classification de l'hypertension pulmonaire (d'après [13])

<b>Groupe 1 : Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>1.1 Idiopathique <ul style="list-style-type: none"> <li>1.1.1 Non-répondants aux tests de vasoréactivité</li> <li>1.1.2 Répondants aigus aux tests de vasoréactivité</li> </ul> </li> <li>1.2 Héritable</li> <li>1.3 Associée à des médicaments et des toxines</li> <li>1.4 Associée à : <ul style="list-style-type: none"> <li>1.4.1 Maladie du tissu conjonctif</li> <li>1.4.2 Infection par le VIH</li> <li>1.4.3 Hypertension portale</li> <li>1.4.4 Cardiopathie congénitale</li> <li>1.4.5 Schistosomiase</li> </ul> </li> <li>1.5 HTAP avec caractéristiques d'atteinte veineuse/capillaire (MVO/HCP)</li> <li>1.6 HTP persistante du nouveau-né</li> </ul>
<b>Groupe 2 : HTP associée à une cardiopathie gauche</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>2.1 Insuffisance cardiaque : <ul style="list-style-type: none"> <li>2.1.1 avec fraction d'éjection préservée</li> <li>2.1.2 avec fraction d'éjection réduite ou légèrement réduite</li> </ul> </li> <li>2.2 Cardiopathie valvulaire</li> <li>2.3 Affections cardiovasculaires congénitales/acquises entraînant une HTP postcapillaire</li> </ul>
<b>Groupe 3 : HTP associée à des maladies pulmonaires et/ou à l'hypoxie</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>3.1 Maladie pulmonaire obstructive ou emphysème</li> <li>3.2 Maladie pulmonaire restrictive</li> <li>3.3 Maladie pulmonaire avec profil restrictif/obstructif mixte</li> <li>3.4 Syndromes d'hypoventilation</li> <li>3.5 Hypoxie sans maladie pulmonaire (p. ex. haute altitude)</li> <li>3.6 Anomalies du développement pulmonaire</li> </ul>
<b>Groupe 4 : HTP associée à des obstructions de l'artère pulmonaire</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>4.1 HTP thrombo-embolique chronique</li> <li>4.2 Autres obstructions des artères pulmonaires</li> </ul>
<b>Groupe 5 : HTP avec des mécanismes peu clairs et/ou multifactoriels</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>5.1 Troubles hématologiques</li> <li>5.2 Troubles systémiques</li> <li>5.3 Troubles métaboliques</li> <li>5.4 Insuffisance rénale chronique avec ou sans hémodialyse</li> <li>5.5 Microangiopathie thrombotique tumorale pulmonaire</li> <li>5.6 Médiastinite fibrosante</li> </ul>

## 2.3 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

### 2.3.1 Définition de l'HTAP

L'HTAP est définie par une PAPm supérieure à 20 mmHg, une pression artérielle pulmonaire d'occlusion inférieure ou égale à 15 mmHg et des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) > 2 unités Wood. Ces valeurs sont mesurées par cathétérisme cardiaque droit, au repos. L'HTAP est elle-même sous-divisée en 6 groupes en fonction de l'origine et des caractéristiques de la pathologie.

### 2.3.2 Classification

#### 2.3.2.1 HTAP idiopathique

L'HTAP idiopathique (HTAPi) correspond aux HTAP dont la cause est inconnue. Ce groupe est divisé en deux groupes : non-répondants et répondants aigus aux tests de vasoréactivité. Cette distinction s'effectue grâce au test de réactivité vasculaire pulmonaire (cf. 2.3.4 ). Lors de ma thèse, j'ai principalement travaillé sur l'HTAPi.

#### 2.3.2.2 HTAP héritable

Ce groupe comprend les patients dont l'HTAP a une cause génétique, que cela soit familial ou sporadique. Actuellement, une vingtaine de gènes de prédispositions à l'HTAP ont été identifiés (Tableau 2). La mutation du gène la plus fréquente est celle de *BMPR2* (*bone morphogenetic protein receptor 2*), avec des mutations hétérozygotes et perte de fonction. Effectivement, les mutations de *BMPR2* représentent 70-75 % des formes d'HTAPh [14,15]. Néanmoins, la pénétrance des variants *BMPR2* est incomplète (20-27 %) [16]. Identifiée pour la première fois en 2000, la mutation de *BMPR2* a permis de relier certaines HTAP à une origine génétique. Depuis, de nombreuses études ont identifié d'autres mutations. Parmi celles-ci, plusieurs concernent la signalisation BMPRII/TGF- $\beta$  (*ACVRL1*, *ENG*, *CAV1*, *SMAD1*, *SMAD4*, *SMAD9*, *GDF2* et *BMP10*) (voir partie 2.4.5.1 ).

D'autres mutations concernent les canaux potassiques (*KCNA5*, *KCNK3*, *ABCC8*, *ABCC9*) et la signalisation calcique avec des mutations dans le gène *EFCAB4B*, codant pour CRACR2A, une protéine régulatrice du *store-operated calcium entry* (SOCE) et des *single nucleotide polymorphism* (SNP) dans le promoteur du gène *TRPC6* (codant pour le canal calcique *transient receptor potential canonical 6*) chez des patients atteints d'HTAPi (cf 2.4.11 ).

La mutation de ces protéines va prédisposer le lit vasculaire au développement de l'HTAP, en le sensibilisant aux différents stimuli (hypoxie, changements hémodynamiques, inflammation, infection).

**Tableau 2 :** Gènes mutés dans l'HTAP

Gène	Gène	Transmission	Référence
<i>ABCC8</i>	<i>ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8</i>	Autosomique dominant	[17]
<i>ABCC9</i>	<i>ATP binding cassette subfamily C member 9</i>	<i>De novo</i>	[18]
<i>ACVLR1</i>	<i>Activin A receptor like type 1</i>	Autosomique dominant	[19]
<i>AQP1</i>	<i>Aquaporine 1</i>	Autosomique dominant	[20]
<i>ATP13A3</i>	<i>Polyamine-Transporting ATPase 13A3</i>	Autosomique récessif	[20–22]
<i>BMP10</i>	<i>Bone morphogenetic protein 10</i>	-	[23]
<i>BMPR2</i>	<i>Bone morphogenetic protein receptor type II</i>	Autosomique dominant	[24]
<i>CAV1</i>	<i>Caveolin 1</i>	Autosomique dominant	[25]
<i>EFCAB4B</i>	<i>EF-Hand Calcium-Binding Domain-Containing Protein 4B</i>	Autosomique récessif	[22]
<i>EIF2AK4</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4</i>	Autosomique dominant/autosomique récessif	[26]
<i>ENG</i>	<i>Endoglin</i>	Autosomique dominant	[19]
<i>G6PD</i>	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>	Autosomique dominant	[27]
<i>GDF2</i>	<i>Growth Differentiation Factor 2/Bone morphogenetic protein 9</i>	Autosomique dominant/autosomique récessif	[20]
<i>GGCX</i>	<i>Gamma-glutamyl carboxylase</i>	-	[28]
<i>KCNA5</i>	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 5</i>	-	[29]
<i>KCNK3</i>	<i>Potassium two pore domain channel subfamily K member 3</i>	Autosomique dominant	[30]
<i>KDR</i>	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>	Autosomique dominant	[31]
<i>KLK1</i>	<i>Kallikrein 1</i>	-	[28]
<i>SMAD1</i>	<i>Small Mother Against Decapenta-plegic Homologues family member 1</i>	Autosomique dominant	[32]

<i>SMAD4</i>	<i>Small Mother Against Decapenta-plegic Homologues family member 4</i>	Autosomique dominant	[32]
<i>SMAD9</i>	<i>Small Mother Against Decapenta-plegic Homologues family member 8</i>	Autosomique dominant	[32]
<i>SOX17</i>	<i>SRY-Related HMG-Box Transcription Factor 17</i>	Autosomique dominant	[20]
<i>TBX4</i>	<i>T-box transcription factor 4</i>	Autosomique dominant	[20,33]

### 2.3.2.3 HTAP associé à des médicaments et des toxines

Plusieurs médicaments ou toxines sont associés au développement de l'HTAP. Ces produits ont été classés comme association certaine ou potentielle avec la pathogenèse d'une HTAP (Tableau 3). De nos jours, parmi les associations certaines les causes les plus fréquentes sont la méthamphétamine, certains inhibiteurs de tyrosine kinase (dasatinib) alors que les supprimeurs d'appétit (aminorex, benfluorex, fenfluramine et dexfenfluramine) et l'huile de colza frelatée sont des causes plus historiques.

**Tableau 3** : Médicaments ou toxines associés avec l'HTAP

<b>Association certaine</b>	<b>Association potentielle</b>
Aminorex Benfluorex Dasatinib Dexfenfluramine Fenfluramine Méthamphétamines Huile de colza frelatée	Agents alkylants (cyclophosphamide, mitomycine C) Amphétamines Bosutinib Cocaïne Diazoxide Agents antiviraux à action directe contre l'hépatite Hépatite C (sofosbuvir) Indirubine (herbe chinoise Qing-Dai) Interféron alpha et bêta Leflunomide L-tryptophane Phénylpropanolamine Ponatinib Inhibiteurs sélectifs du protéasome (carfilzomib) Solvants (trichloroéthylène) Millepertuis

### 2.3.2.4 HTAP associée à une pathologie

Chez certains patients, l'HTAP peut être associée à une autre pathologie sous-jacente.

C'est le cas pour les maladies du tissu conjonctif, comme la sclérodémie systémique (la plus représentée en Europe et États-Unis), le lupus érythémateux systémique (le plus représenté en Asie), une maladie inflammatoire du tissu conjonctif [34–38]. L'HTAP peut aussi être liée à des maladies infectieuses, comme l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou la schistosomiase, une infection chronique par des vers parasites (trématodes du sang du genre *Schistosoma*) principalement retrouvés en Afrique, Amérique du Sud et Asie [39]. L'hypertension portale, définie par l'augmentation de pression sanguine dans la veine porte, est aussi associée à l'HTAP [40]. L'HTAP peut également être associée à une cardiopathie congénitale comportant un shunt gauche-droit (comme le syndrome d'Eisenmenger) provoquant une aggravation de la mortalité des patients [41].

#### 2.3.2.5 HTAP avec caractéristiques d'atteinte veineuse/capillaire (MVOP/HCP)

Ce groupe rassemble les patients atteints de maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) ou d'hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP). Histologiquement, la MVOP est caractérisée par une fibrose oblitérante des veines de petite taille ou des veinules pulmonaires. Ces modifications sont fréquemment accompagnées d'HCP, correspondant à une prolifération multifocale des capillaires pulmonaires pouvant envahir l'interstitium et infiltrer ou comprimer la paroi des vaisseaux [42]. Cliniquement, les patients ne montrent pas beaucoup de différences avec les autres groupes d'HTAP, ayant un profil hémodynamique similaire à ceux des HTP précapillaires. Cependant, étant donné que les biopsies pulmonaires sont déconseillées, car trop risquées, la MVOP/HCP peut être détectée au scanner et par un test de capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) effondrée (cela représentant la capacité de transfert des gaz entre alvéoles et le lit capillaire). La MVOP/HCP peut être héréditaire, par mutations bialléliques du gène *EIF2AK4* (*Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4*, codant pour la protéine GCN2) ou sporadique due à une exposition à des solvants (trichloroéthylène) ou agents alkylants (cyclophosphamide et mitomycine C) ou certaines chimiothérapies.

Il n'y a pas de traitement de la MVOP/HCP, les patients ne répondant pas aux thérapies de l'HTAP, l'action vasodilatatrice des traitements pouvant même provoquer des œdèmes pulmonaires à cause de l'obstruction des veines pulmonaires [43]. La transplantation pulmonaire reste donc la seule option curative de cette pathologie.

### 2.3.2.6 HTAP persistante du nouveau-né

L'HTAP persistante du nouveau-né se produit lorsque les RVP restent anormalement élevées après la naissance. En effet, normalement à la naissance une chute de la RVP est observée (en raison du déclenchement de la respiration), accompagnée d'une augmentation de la résistance vasculaire systémique (enlèvement du placenta de la circulation), provoquant la fermeture du shunt entre les oreillettes. Dans ce cas pathologique, les RVP demeurent constantes par une combinaison de facteurs anatomiques, physiques, biochimiques et humoraux, provoquant une réduction du débit sanguin et donc une diminution de l'O<sub>2</sub> sanguin. L'HTAP persistante du nouveau-né peut être idiopathique, héritable, mais aussi secondaire à une maladie pulmonaire parenchymateuse ou une hypoplasie pulmonaire [44]. La prise en charge est effectuée via les trois voies de traitement de l'HTAP (NO, endothéline et prostacycline).

### 2.3.3 Épidémiologie

Les données récentes des registres nationaux provenant des systèmes de soins centralisés permettent d'estimer la prévalence mondiale de l'HTAP à 48-55 cas par millions de personnes avec incidence de 6 cas par millions de personnes [45]. Dans la plupart des études menées durant les 20 dernières années, c'est l'HTAPi qui est la plus représentée (entre 30 à 75 % des cas en fonction des registres), suivie par l'HTAP associée à une maladie du tissu conjonctif (15-30 % des cas), d'une cardiopathie congénitale (3-30 % des cas), puis d'une HTP portale (4-10 %). La prévalence de HTAP familiale est entre 2 et 8 % [46].

Historiquement, l'HTAP est connue pour être diagnostiquée chez des patients jeunes (36 ± 15 ans chez les patients atteints d'HTAPi dans le premier registre américain de 1987), avec un ratio femme/homme de 1,7 : 1 [47]. Cependant, ces dernières années, les données provenant d'Europe et des États-Unis suggèrent que l'HTAP est diagnostiquée chez des patients plus âgés, avec par exemple une moyenne de 65,7 ± 15,5 ans pour un registre européen [48,49]. Cette différence d'âge est probablement due à l'amélioration des outils de diagnostic et de sensibilisation, l'HTAP pouvant être difficile à diagnostiquer. Ce « vieillissement » provoque dans le même temps une distribution intersexe plus égale. En effet, un registre européen (2007-2011) démontre deux fois plus de femmes touchées que d'hommes à 54 ans contre uniquement 1,2 fois plus pour les patients de 75 ans [50]. Néanmoins, ce constat historique reste valable pour l'HTAPh, qui touche deux fois plus de femmes que d'hommes. De surcroît, les

porteurs de mutation *BMPR2* développent une HTAP 7 à 10 ans plus tôt que ceux qui n'ont pas la mutation [51]. De plus, il a été montré pour l'HTAPi, HTAPh et HTAP associés à des médicaments ou toxines que les femmes ont une meilleure survie que les hommes [52]. Bien que leur influence n'est pas totalement comprise, les hormones féminines seraient impliquées, le ratio femme/homme diminuant lors des diagnostics de patients plus âgés ce qui correspond notamment avec l'apparition de la ménopause [53].

L'amélioration de la prise en charge des patients atteints d'HTAP lors de ces dernières années a permis une amélioration de la survie des patients. Cependant, la mortalité de l'HTAP reste élevée, avec par exemple des taux de survie de 89,2 %, 75,6 % et 56 % à 1, 3 ou 5, ans, en présence de traitements après diagnostic pour étude menée de 2009 à 2020 sur une cohorte canadienne [54]. Une étude menée aux Pays-Bas entre 2005 et 2020 a déterminé que la médiane de survie globale, sans transplantation, était de 6,2 ans [55].

#### 2.3.4 Diagnostic

La suspicion d'HTAP se fait dans un premier temps grâce à différents critères cliniques, avec notamment une stratification des patients selon le statut fonctionnel réalisée par la *World Health Organization* [56].

Ensuite, l'imagerie permet d'évaluer de manière non invasive la fonction du VD, avec notamment l'échocardiographie, ou l'imagerie par résonance magnétique cardiaque. Néanmoins, la présence d'HTAP doit être confirmée par cathétérisme cardiaque droit, qui doit être réalisé dans un centre expert. Le cathétérisme cardiaque droit est un test invasif permettant d'obtenir des valeurs hémodynamiques comme la PAPm ou la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) pour discriminer les HTP pré et postcapillaire.

Lors du cathétérisme cardiaque droit, un test de réactivité vasculaire est réalisé. Celui-ci permet de déterminer les patients répondeurs aux traitements par inhibiteurs calciques (voir partie 2.5.1) en utilisant un agent vasodilatateur comme le monoxyde d'azote ou l'iloprost. Lors du cathétérisme cardiaque droit, l'agent vasodilatateur est inhalé par le patient. Le patient est considéré répondant si l'inhalation induit une diminution supérieure ou égale à 10 mmHg afin d'obtenir une valeur inférieure ou égale à 40 mmHg de PAPm, sans changement du débit cardiaque. En fonction de ce constat, le patient pourra être traité par inhibiteurs calciques ou non. Afin d'affiner la

prise en charge thérapeutique, la stratification de sévérité des patients est effectuée selon différents tests. Ceux-ci incluent un test d'effort, comme le test de marche de 6 minutes, mesurant la distance parcourue en 6 minutes, ou encore la mesure de biomarqueurs comme le peptide cérébral natriurétique (*brain natriuretic peptide*, BNP) et N-terminal pro BNP, une hormone cardiaque corrélée avec le stress myocardial [57].

## 2.4 Physiopathologie de l'HTAP

L'HTAP est caractérisée par une obstruction vasculaire provoquant l'augmentation des résistances vasculaires. Cette obstruction est retrouvée sur les artères pulmonaires musculaires distales (70 à 500  $\mu\text{m}$ ), mais aussi sur les artérioles (20 à 70  $\mu\text{m}$ ) [58]. Cette obstruction est provoquée par des mécanismes multifactoriels induisant un intense remodelage vasculaire pulmonaire, une vasoconstriction et une inflammation périvasculaire provoqués par différents mécanismes cellulaires et moléculaires.

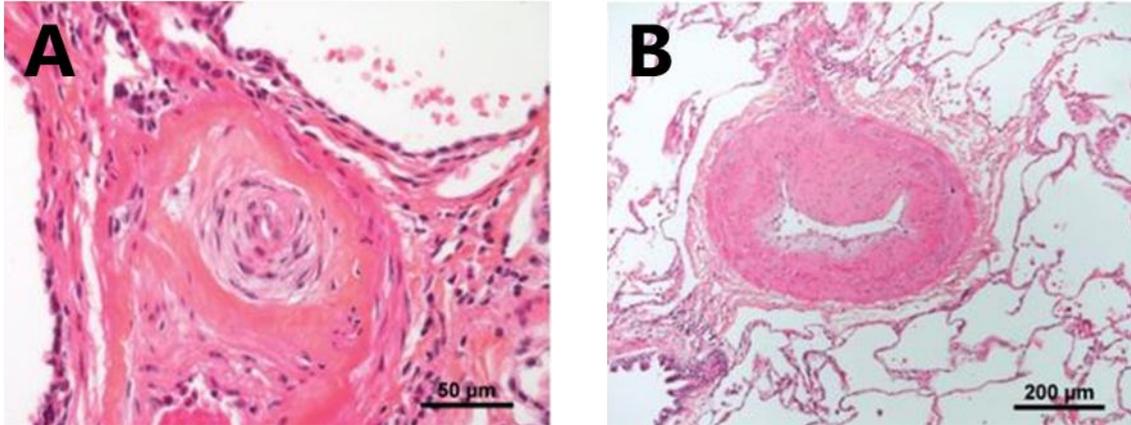
### 2.4.1 Aspects tissulaires et lésions anatomopathologiques

Histologiquement, plusieurs types d'atteintes vasculaires pulmonaires sont caractéristiques de l'HTAP : lésions intinales, hypertrophie de la média et lésions plexiformes.

#### 2.4.1.1 Lésions intinales

Des lésions intinales sont fréquemment retrouvées au niveau des AP de petits diamètres. Ces lésions consistent en l'épaississement du feuillet intimal, à cause de la prolifération et le recrutement des cellules endothéliales, fibroblastes, myofibroblastes, cellules musculaires lisses ou cellules du tissu conjonctif [59]. Ces lésions sont anormalement constituées de fibroblastes avec une sécrétion et un dépôt excessif de collagène.

L'épaississement de l'intima peut être concentrique ou excentrique (Figure 8A). Les lésions concentriques, uniformes, sont composées de couches fibrotiques (laminaires ou non), disposées « en couche d'oignons ». À l'inverse, certaines lésions se forment excentriquement, souvent associées à des thrombi ou résidus de thrombi adhérant à la paroi. Cela peut conduire à des lésions appelées « en forme de passoire », issues de l'organisation et de la recanalisation de matériel thrombotique (Figure 8B).



**Figure 8** : Lésion intimale d'AP de patients atteints d'HTAP [58]

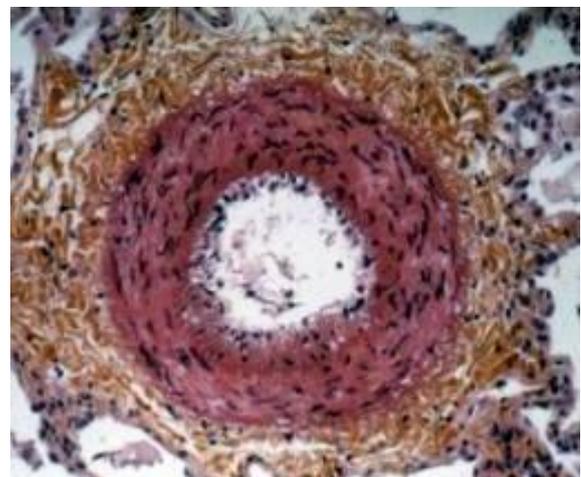
*A. Fibrose laminaire concentrique de l'intima, « couche d'oignons » B. Lésion excentrique généralement interprétée comme thrombotique*

Par ailleurs, ces lésions intimales peuvent être associées à une fibrose adventitielle ou à un infiltrat de cellules immunitaires, en particulier des lymphocytes.

#### 2.4.1.2 Hypertrophie de la média

L'hypertrophie de la média est probablement la lésion vasculaire la plus fréquente dans l'HTAP. Cette hypertrophie de la média concerne les AP muscularisées, pour lesquelles la média est considérée hypertrophiée si la couche entre les deux limitantes élastiques est supérieure à 10 % du diamètre total de l'AP. Une néo-muscularisation des artérioles non musculaires est également observée [59].

L'épaississement de cette média est principalement provoqué par la prolifération excessive des CML d'artères pulmonaires (CML-AP), mais également leur phénotype de résistance à l'apoptose. Cette lésion est souvent associée à d'autres lésions, comme la fibrose adventitielle (Figure 9).

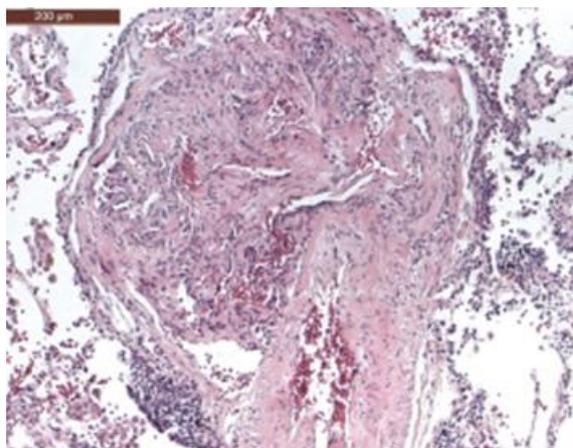


**Figure 9** : Hypertrophie de la média d'une artère pulmonaire d'un patient atteint d'HTAP [59]

*Grossissement x200, coloration de Weigert-hématoxyline-phloxine-safran.*

### 2.4.1.3 Lésions plexiformes

Les lésions plexiformes sont des lésions très caractéristiques d'un intense remodelage vasculaire. La lésion plexiforme est un assemblage de prolifération cellulaire (CE, CML) en structure glomérulaire, avec une angiogenèse désorganisée, et une matrice extracellulaire riche en collagène [60] (Figure 10). Cela peut être responsable d'une hémorragie et de l'organisation de la fibrose [61]. Certains patients ont également développé des lésions fibrovasculaires singulières, connectant la structure vasculaire systémique aux artères pulmonaires et aux veines.



**Figure 10 :** Lésion plexiforme à canaux sinusoidaux multiples d'artère pulmonaire d'un patient atteint d'HTAP [58]

## 2.4.2 Les modèles animaux d'études précliniques de l'HTAP

Au cours des années, il a été développé une variété de modèles animaux de l'HTAP. Cependant, ces modèles ne reproduisent pas parfaitement tous les paramètres cliniques et physiopathologiques de l'HTAP. La plupart des études sont menées principalement sur des rongeurs, mais certaines expériences ont également été menées sur des gros animaux.

### 2.4.2.1 Modèle monocrotaline

Ce modèle est induit par exposition à la MCT, un alcaloïde pyrrolizidine toxique provenant de la plante *Crotalaria spectabilis* [62]. La MCT est métabolisée au niveau du foie par le cytochrome P-450 (CYP3A4) en MCT pyrrole (MCTP), qui est la forme active de la molécule, qui est ensuite transportée par le sang jusque dans la circulation pulmonaire. Ce modèle est principalement utilisé chez le rat, l'administration de la MCT chez la souris ne provoque pas le développement d'HTAP [63]. Ce modèle permet aussi le développement d'une HTAP sur des plus gros animaux (primates non humains, chien) [64,65].

Mis au point en 1967, initialement par ingestion de *Crotalaria spectabilis*, ce modèle d'HTAP se démarque aujourd'hui en raison de sa facilité d'utilisation (une seule

injection sous-cutanée) et de sa fiabilité, ce qui en fait un modèle largement utilisé. Classiquement, la MCT est injectée à 60 mg/kg chez le rat, bien que cela puisse varier entre 40 et 100 mg/kg. Les rats développent une HTAP en 3 à 4 semaines, avec de nombreuses caractéristiques de l'HTAP humaine : augmentation de la pression artérielle pulmonaire, remodelage vasculaire pulmonaire (hyperplasie intimale, hypertrophie médiale), atteinte endothéliale (activation facteurs prolifératifs et antiapoptotiques, perturbation trafic intracellulaire) [66]. Cela conduit également à une hypertrophie ventriculaire droite et à une défaillance cardiaque [66,67]. Un rôle important des cellules inflammatoires est également décrit dans le modèle MCT [68,69]. Bien que les mécanismes d'induction de l'HTAP expérimentale ne soient pas connus, les premières lésions sont observées au niveau endothélial [70]. De plus, le développement de l'HTAP est progressif, avec un remodelage vasculaire et des pressions systoliques dans le VD déjà détecté entre la première et deuxième semaine post-injection.

Cependant, les lésions plexiformes caractéristiques de l'HTAP ne sont pas retrouvées dans ce modèle. Par ailleurs, bien que reproduisant de nombreuses caractéristiques de l'HTAP, ce modèle peut être critiqué de par son induction, les altérations du foie et du rein par le nombre de traitements améliorant l'HTAP induite par la MCT [71,72].

#### 2.4.2.2 Modèle d'hypoxie chronique

L'hypoxie chronique est associée à des changements structurels similaires chez de nombreux mammifères. Au début des années 1970, plusieurs études ont fait l'observation de l'impact de la haute altitude (bovin, lama, chien, chat, rongeurs) sur le développement de l'HTAP ainsi que de l'effet de l'hypoxie chronique expérimentale sur des rats placés en chambre à hypoxie hypobarique [73–75]. Le modèle d'hypoxie chronique est plus reconnu comme un modèle de groupe 3 d'HTP (associé à une maladie pulmonaire ou à l'hypoxie) [76]. L'hypoxie normo- et hypobare est fréquemment utilisée chez la souris ou le rat. Cela consiste généralement à exposer les rongeurs à 10 % d'oxygène pendant 3 à 4 semaines pour induire l'HTAP. Cela provoque une augmentation des pressions artérielles pulmonaires associée à une muscularisation rapide des petites artères [77]. Cependant, l'hypoxie chronique induit une HTAP modérée, avec une hypertrophie du VD, mais pas de défaillance cardiaque. Le remodelage observé n'est pas aussi sévère que chez les rats MCT, et que chez l'humain, ne permettant pas d'observer de lésions intimales obstructives des AP périphériques. Il est observé une inflammation périvasculaire pulmonaire avec

recrutement de cellules inflammatoires [78]. Par ailleurs, ce modèle est réversible en quelques semaines grâce à un retour en normoxie, et à l'avantage d'être reproductible au sein de la même souche animale [79].

#### 2.4.2.3 Modèle Sugén-hypoxie

Afin d'améliorer le modèle d'hypoxie chronique, pas assez sévère, le modèle Sugén/hypoxie (Su/Hx) a été développé : il combine l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur VEGFR-2, le Sugén 5416, et l'hypoxie chronique [80,81]. En effet, l'injection de Sugén 5416 sur des rats en normoxie provoque un remodelage vasculaire pulmonaire et une HTAP modérée, et l'injection sur des rats en combinaison avec l'hypoxie chronique conduit à une HTAP prononcée, avec formation de lésions plexiformes similaires à celles observées dans l'HTAP chez l'Homme [82]. Le protocole le plus couramment utilisé, chez le rat, consiste en une injection unique sous-cutanée de Sugén 5416 (20 mg/kg), suivie d'une exposition à l'hypoxie pendant 3 semaines, et d'un retour à la normoxie pendant 3 à 11 semaines supplémentaires. Effectivement, il a été démontré chez le rat que la pression systolique du VD augmente progressivement jusqu'à atteindre un plateau (100 mmHg) 5 semaines après l'injection de Sugén 5416, et cela est en corrélation avec l'occlusion des artères pulmonaires de petit diamètre [83]. Ceci est accompagné d'un déclin cardiaque entre la 3<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> semaine, qui s'aggrave avec les semaines en normoxie, montrant une aggravation progressive. Le modèle a aussi été effectué chez la souris avec un protocole similaire, permettant également le développement d'un remodelage vasculaire pulmonaire, d'une augmentation de la PAPm et une hypertrophie du VD [84]. De Raaf *et al.*, grâce à une étude menée sur l'évolution chronologique du modèle, ont démontré que le retour à la normoxie diminue la pression systolique du VD, provoquant une forme un plus légère, mais persistante d'HTAP [85]. Cependant, histologiquement ils ont mis en évidence que le remodelage vasculaire continuait à progresser après le retour en normoxie. Cela démontre l'intérêt du modèle avec une première phase vasoconstriction hypoxique, en partie réversible, associée à un remodelage vasculaire pulmonaire par la suite. Une étude, menée sur rats Wistar, avec 3 semaines d'hypoxie après l'injection de Sugén 5416 puis deux semaines de normoxie a reporté des emphysèmes [86]. Cependant, cela n'est pas retrouvé dans d'autres souches de rat [87].

Des années après la découverte de ce modèle, les mécanismes d'action impliqués ne sont pas encore compris. Il semblerait que l'inhibition du VEGFR combiné à l'hypoxie induit une apoptose des CE-AP, suivi par l'émergence de CE-AP avec un phénotype

pro-prolifération et résistant à l'apoptose. Par ailleurs, Sitapara *et al.* ont démontré que le remplacement du Sugen 5416 par le cabozantinib, un inhibiteur plus puissant et spécifique, avec une injection unique ou par diffusion via des mini pompes osmotiques pendant 14 jours, n'induisait qu'une légère augmentation réversible de la pression systolique du VD et aucun remodelage vasculaire pulmonaire significatif. Ils ont aussi démontré que le Sugen 5416, contrairement au cabozantinib, peut inhiber l'activité de BMPRII, suggérant une inhibition *in vivo* de VEGFR et BMPRII.

#### 2.4.2.4 Modèles alternatifs

##### 2.4.2.4.1 Modèle monocrotaline associé à l'hypoxie chronique

Ce modèle est l'association du modèle MCT et hypoxie chronique. Celui-ci conduit à une HTAP plus sévère que les modèles indépendants, avec un remodelage vasculaire pulmonaire comprenant des lésions intimaux, une hypertrophie médiale et des lésions plexiformes et même l'occlusion de certains vaisseaux avec des thrombi fibrotiques [88,89].

##### 2.4.2.4.2 Pneumectomie associée à la monocrotaline ou au Sugen 5416

Dès les années 1996, Tanaka *et al.* font l'hypothèse que les conditions hémodynamiques agissent sur les vaisseaux sanguins et donc modifient le remodelage artériel pulmonaire [90,91]. Ils ont donc développé un modèle de rat où l'injection de MCT est effectuée une semaine après une lobectomie du poumon gauche afin d'augmenter le flux sanguin du poumon droit. Il a également été démontré que le modèle pouvait également être effectué avec une injection de MCT suivi d'une lobectomie une semaine après. Afin d'exclure la possibilité que les observations effectuées soient dues à une croissance compensatoire du poumon, ce modèle a été confirmé par une anastomose entre l'artère sous-clavière et l'artère pulmonaire. Une augmentation des PAPm ainsi qu'une hypertrophie du VD, associées à des altérations néointimales des AP, ont été observées. L'histologie a également révélé une inflammation tissulaire [92]. Ce modèle a également été développé avec un second « hit » au Sugen 5416, provoquant une HTAP sévère à 6 semaines, incluant des lésions oblitérantes et inflammation [93,94].

##### 2.4.2.4.3 Modèle de cerclage de l'artère pulmonaire

Le modèle de cerclage de l'artère pulmonaire s'effectue principalement sur des rats, grâce à une constriction de l'AP avec des fils chirurgicaux. La constriction est rendue

fiable et reproductible grâce au placement d'un guide le long de l'AP lors de la constriction [95]. Ce modèle n'est pas réellement un modèle d'HTAP, mais un modèle permettant d'étudier l'adaptation du VD ainsi que sa défaillance indépendamment des changements vasculaires pulmonaires. Il permet donc d'étudier les mécanismes d'adaptation et de défaillance du VD, mais aussi l'effet cardioprotecteur de certaines molécules [96].

Bien qu'ils ne reproduisent pas parfaitement tous les paramètres cliniques et physiopathologiques de l'HTAP, ces modèles disposent de nombreux paramètres similaires à l'HTAP et permettent d'étudier de nouvelles cibles ou voies impliquées dans la pathogenèse de l'HTAP

### 2.4.3 La dysfonction des cellules vasculaires pulmonaires

Ces différents modèles d'études ainsi que les travaux menés sur le tissu et les cellules humaines ont permis de démontrer la dysfonction des cellules du lit vasculaire pulmonaire : CE-AP, CML-AP, fibroblastes, cellules inflammatoires, péricytes et progéniteurs.

#### 2.4.3.1 Dysfonction des cellules endothéliales d'artères pulmonaires (CE-AP)

Une des premières dysfonctions cellulaires responsables de cet intense remodelage vasculaire pulmonaire est la dysfonction endothéliale. Comme expliqué précédemment, les CE-AP sont exposées à différents stimuli (flux sanguin, oxygénation du sang, facteurs circulants), qui, en condition pathologique, peuvent entraîner un dysfonctionnement endothélial. Cependant, les causes responsables de cette dysfonction sont encore mal comprises. Cette dysfonction comprend un déséquilibre de la balance prolifération et apoptose des CE-AP, avec un phénotype pro-prolifératif et résistant à l'apoptose [97,98]. Une hypothèse explique en partie cette prolifération endothéliale. Dans un premier temps, suite à une lésion vasculaire, les CE-AP rentrent en apoptose favorisant dans un second temps l'émergence de CE-AP résistantes à l'apoptose [99]. En plus de la prolifération aberrante, les CE-AP vont développer un phénotype angiogénique (prolifération et migration accrue), associé à une rupture de la barrière endothéliale [100].

Au cours de la pathogenèse de l'HTAP, les cellules vasculaires pulmonaires vont subir différents changements. Les CE-AP vont entrer dans un processus de transition

endothélio-mésenchymateuse (endoMT), consistant au passage d'un phénotype endothélial à un phénotype de type mésenchymateux [101,102]. Ce processus va commencer par la perte de différentes protéines membranaires notamment impliquées dans l'adhésion et les jonctions cellulaires (VE-cadhérine, CD31 (PECAM-1) et caténine p120), associé à une invasion et migration des CE-AP dans le tissu interne du vaisseau [103,104]. Cela va provoquer, en plus de la perte des marqueurs endothéliaux (p. ex. le facteur Von Willebrand, VWF), l'apparition de marqueurs mésenchymateux ou myofibroblastiques comme l' $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), la vimentine, FSP-1 (*fibroblast-specific protein1*, aussi appelé *S100 calcium binding protein A4*), la fibronectine ou la transgéline (SM22  $\alpha$ ) [105]. Ces modifications vont également perturber la production de molécules vasodilatatrices comme le NO et la prostacycline et de molécules vasoconstrictrices comme le thromboxane, l'endothéline-1 et l'angiotensine (voir partie 2.4.4 ). Une dérégulation de la production de facteurs de croissance tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor 2* (FGF2), *platelet-derived growth factor* (PDGF) ou *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF  $\beta$ ) est aussi observé (voir partie 2.4.5 ). De plus, cela engendre également une modification de la composition et quantité de matrice extracellulaire.

#### 2.4.3.2 Dysfonction des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires (CML-AP)

En condition physiologique, la fine régulation de la balance prolifération / apoptose des CML-AP est primordiale afin de maintenir l'intégrité et la fonction vasculaire. Cependant, dans l'HTAP, la dérégulation de cette balance est responsable de l'épaississement de la média et ainsi de l'obstruction des AP. En effet, les CML-AP de patients HTAP ont une prolifération et une migration exacerbée associée à une résistance à l'apoptose [106]. Ce phénotype est retrouvé dans les CML-AP en culture isolées des patients atteints d'HTAP et donc sorti de l'environnement local du lit vasculaire. Cela indique que les CML-AP présentent des dérégulations intrinsèques en plus des anomalies provoquées par les modifications de stimuli ou matrice extracellulaire [107]. En effet, les CML sont connues pour avoir un phénotype synthétique ou contractile. Les CML avec un phénotype synthétique sont des cellules proliférantes, migratoires, synthétisant de la matrice extracellulaire et peu contractiles, tandis que le phénotype contractile est plus quiescent, avec une faible synthèse de matrice extracellulaire. Dans des conditions physiologiques, les CML-AP composant la média sont principalement contractiles, et acquièrent un phénotype synthétique dans

l'HTAP. Ce changement phénotypique est notamment dû à la dysfonction endothéliale et la perte d'intégrité de la barrière endothéliale, ce qui va exposer les CML-AP à des stimuli physiques, hypoxiques, de la matrice extracellulaire ou à des facteurs solubles (TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF...). La dérégulation des CML-AP influe également sur le dialogue avec l'endothélium, pouvant ainsi renforcer ce phénotype pathologique et la vasoconstriction. Plusieurs études ont également mis en évidence une reprogrammation métabolique des CML-AP accompagnant ce changement phénotypique, avec notamment un passage de la phosphorylation oxydative à la glycolyse (voir partie 2.4.7 ).

**De plus, la dérégulation de l'expression et de la fonction des canaux ioniques est un mécanisme important de la dysfonction des CML-AP. En effet, il est observé des dérégulations des canaux potassiques, chlorures et de la signalisation calcique pouvant affecter la prolifération, migration, résistance à l'apoptose, mais aussi la vasoconstriction (voir partie 2.4.11 ).**

Toutes ces modifications se traduisent par la dérégulation de différentes voies de signalisation. Notre équipe a montré que les CML-AP de patients atteints d'HTAPi ont une plus forte activation de ERK1/2, P38 et Akt1, qui sont connus pour réguler la prolifération, migration ou l'apoptose cellulaire [108]. Cela n'est pas lié à une augmentation de la synthèse pour ERK1/2 et Akt, mais à une augmentation des formes phosphorylées, tandis qu'une augmentation de la synthèse de P38 est retrouvée. Une diminution de l'expression de P21, un inhibiteur du cycle cellulaire, de la pro-caspase9 (sans changement de la caspase 9 clivée, un inhibiteur de l'apoptose) ainsi qu'une augmentation de la survivine, qui a un rôle d'inhibition de l'apoptose a également été trouvée.

#### 2.4.3.3 Dysfonction des fibroblastes d'artères pulmonaires

Les fibroblastes, situés au niveau de l'adventice, sont capables d'interagir avec l'endothélium et la média, mais aussi avec les cellules « externes » comme les cellules immunitaires. Les dysfonctions ayant lieu dans l'HTAP vont également activer les fibroblastes. Cette activation va induire leur dédifférenciation en myofibroblastes, qui sont retrouvés dans les parois des vaisseaux remodelés. L'état myofibroblaste correspond également à l'acquisition d'un phénotype proprolifératif, augmentant ainsi la sécrétion de MEC et participant fortement au remodelage de la MEC (voir partie 2.4.9 ). De plus, les fibroblastes participent également à l'inflammation observée dans les vaisseaux remodelés (voir partie 2.4.10 ). En effet, plusieurs études menées par le

groupe de Stenmark ont démontré que les fibroblastes adventitiels issus d'AP de patients atteints d'HTAPi et de bovins hypertendus régulent l'activation des macrophages notamment par des signaux paracrines Interleukine-6 (IL6) ou hypoxia inducible factor-1 (HIF1) [109]. Une reprogrammation métabolique avec glycolyse anaérobie a également été retrouvée dans les fibroblastes adventitielles de patients atteints d'HTAPi [110]. Cette reprogrammation est liée au phénotype prolifératif et inflammatoire des fibroblastes. La dysfonction des fibroblastes peut aussi être régulée par des canaux calciques, notamment avec le canal TRPV4 (voir partie 2.4.11).

#### 2.4.3.4 Dysfonctions d'autres types cellulaires

Le processus inflammatoire est reconnu comme un élément pathogénique du remodelage vasculaire pulmonaire. En effet, différentes cellules comme les macrophages et les lymphocytes sont retrouvées au sein des lésions, et sont responsables d'une élévation des taux de cytokines et chimiokines (voir partie 2.4.10).

Les péricytes sont des cellules occupant une position stratégique à l'interface entre le sang et l'espace interstitiel, à proximité immédiate des cellules endothéliales et musculaires lisses. De ce fait, ils sont capables de réguler la prolifération, migration et différenciation des CE-AP, la contraction des CML-AP et les fonctions des cellules immunitaires. En 2014, Ricard *et al.* ont démontré une surabondance des péricytes autour des AP distales dans l'HTAP humaine et expérimentale, potentiellement lié au FGF2 et à l'IL6 [111]. En effet, les péricytes sont deux fois plus présents autour des AP de patients atteints d'HTAP et ont une prolifération et migration, une fois isolés *in vitro*, plus importante que les péricytes des patients contrôles. De plus, le traitement des péricytes avec du TGF- $\beta$  promeut leur différenciation en CML.

Au sein du lit vasculaire pulmonaire, il est également possible de trouver des cellules progénitrices endothéliales. Ces cellules sont des précurseurs endothéliaux d'origine médullaire pouvant se différencier en cellules endothéliales suite à une lésion vasculaire. Il a été trouvé une augmentation des marqueurs de ces cellules progénitrices dans les artères remodelées de patients atteints d'HTAP, en particulier dans les lésions plexiformes [112]. Le traitement avec des cellules progénitrices endothéliales ou un milieu conditionné par ces cellules améliore la relaxation des AP, suggérant un rôle paracrine vasoprotecteur, notamment grâce à la libération de prostacycline et AMPc [113].

Par ailleurs, plusieurs cellules progénitrices des CML comme les cellules souches

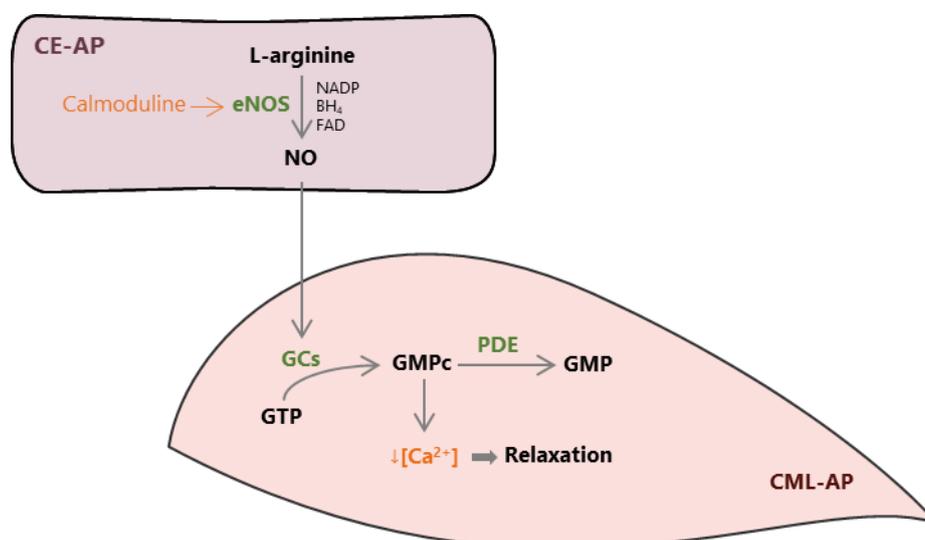
mésenchymateuses ont été identifiées dans les AP. Ces cellules sont capables de se différencier en CML suite à des stimuli (comme les facteurs de croissance dérivés des CE) et peuvent être responsables de la néomuscularisation de certaines artérioles [114].

## 2.4.4 Le déséquilibre des facteurs vasoactifs

### 2.4.4.1 Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote, aussi appelé oxyde nitrique (NO) est un médiateur de différentes fonctions biologiques, jouant un rôle de neurotransmetteur, de médiateur du système immunitaire, mais surtout de vasodilatateur au sein du système cardiovasculaire. C'est en 1980 que Furchgott et Zawadzki démontrent que les CE contrôlent la relaxation des CML via le NO [3]. Cette découverte a donné lieu au prix Nobel de physiologie en 1988.

Le NO est principalement produit par la conversion de l'acide aminé L-arginine par la NO synthase endothéliale (eNOS) pour former la L-citruline et le NO, grâce à des cofacteurs comme le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) [115]. Elle est régulée par la calmoduline, une protéine régulée par la concentration calcique intracellulaire ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) [116]. Dans la circulation pulmonaire, le NO est principalement produit par les CE-AP, grâce à la eNOS [117]. Le NO ainsi produit va diffuser et agir sur les CML-AP, en stimulant l'enzyme guanylate cyclase soluble (GCs) qui va ainsi produire la guanosine monophosphate cyclique (GMPc). La GMPc va activer la protéine kinase G (PKG) ce qui va conduire à la relaxation des CML-AP. Par ailleurs, il a également été mis en évidence que le NO pouvait agir directement sur la prolifération des CE-AP et CML-AP via l'activation de la GCs [118]. L'action du NO est résumée en Figure 11.



**Figure 11** : Voie du monoxyde d'azote (NO) conduisant à la relaxation cellulaire

Du fait de son action vasodilatatrice importante, de nombreuses études se sont portées sur la production du NO chez les patients atteints d'HTAP. Tout d'abord, Giaid et Saleh ont démontré une diminution de l'expression de la eNOS dans les poumons de patients atteints d'HTAP, en corrélation avec les modifications histologiques et les RVP [119]. Le taux de NO exhalé par les patients atteints d'HTAP est également diminué [120,121]. Cependant, une expression pulmonaire inchangée de la eNOS a également été retrouvée sur d'autres patients atteints d'HTAP [122]. Paradoxalement, la eNOS est également fortement exprimée au niveau des lésions plexiformes [123]. Dans les modèles expérimentaux de l'HTAP, il y a une diminution de la eNOS pulmonaire chez les rats traités à la MCT, associée à une diminution de la phosphorylation Ser<sup>1177</sup>, marqueur de l'activation de la eNOS par la kinase Akt. À l'inverse, une augmentation de l'expression de la eNOS est retrouvée chez les rats exposés à l'hypoxie chronique [124–126]. Cependant, cela semble être dépendant du stade du développement de l'HTAP, la phosphorylation Ser<sup>1177</sup> étant diminuée après une semaine d'hypoxie.

Néanmoins, la modification d'expression de la eNOS ne signifie pas obligatoirement une modification de production du NO, cette dernière étant aussi dépendante des cofacteurs : un couplage et une activation incomplète de la eNOS provoquent la production des superoxydes OONO<sup>-</sup>. Ces superoxydes sont capables de capturer le NO produit, ce qui induit une diminution de la disponibilité du NO. Dans les CE-AP de patients atteints d'HTAP, Gosh *et al.* n'ont pas retrouvé de modification d'expression de la eNOS, mais ont démontré une phosphorylation augmentée Thr<sup>495</sup>, ayant pour conséquence une inhibition de l'enzyme [127].

Les phosphodiesterases (PDE) sont aussi des acteurs importants de la voie du NO. La famille des PDE est composée de 11 isoformes, différentes de parts leurs structures, activités catalytiques et leur expressions. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les liaisons phosphodiester, permettant le passage de la forme active de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à la forme inactive (GMP), ou de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) en AMP. Le passage à la forme inactive va ainsi réduire l'effet vasorelaxant de la voie du NO [128]. Les PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 et PDE11 peuvent hydrolyser le GMPc et l'AMPc tandis que les PDE5, PDE6 et la PDE9 n'hydrolysent que le GMPc [129]. L'expression et l'activité des PDE ont ainsi été étudiées dans l'HTAP, avec notamment la PDE5 qui est connue pour être ubiquitaire, mais abondante dans le poumon et les CML-AP [130]. Une expression et une activité augmentée de la PDE5 ont été retrouvées dans les CML-AP isolées de patients atteints

d'HTAP et l'inhibition de la PDE5 induit une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des CML-AP [131]. Son inhibition provoque une relaxation des AP dose-dépendante [132]. De plus, une augmentation de l'expression de la PDE5 est retrouvée dans le VD humain et de rats exposés à la MCT [133]. L'expression de la PDE5 est également augmentée dans les AP de rats exposés à l'hypoxie chronique, et son inhibition réduit les effets hémodynamiques de l'hypoxie chronique [134].

Dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP et dans différents modèles animaux d'HTAP, l'expression de la PDE1, une PDE calcium/calmoduline dépendante impliquée dans la prolifération et la vasodilatation par le NO, est augmentée [135–139]. Une augmentation d'expression de l'ARNm (acides ribonucléiques messagers) de PDE3, impliquée dans la vasorelaxation dépendante du NO, est observée dans les AP de rats et les CML-AP humaines contrôles exposés *in vitro* à l'hypoxie [140]. Concernant la PDE4, impliquée dans la prolifération, son inhibition atténue le remodelage vasculaire pulmonaire chez le rat exposé à la MCT ou à l'hypoxie chronique [141]. Pour finir, dans les poumons de rats MCT, l'expression de l'ARNm de PDE7 et 10A est augmentée tandis que la PDE8 est diminuée. Dans ce même modèle, l'inhibition de la PDE10A réduit la prolifération des CML-AP et réduit la sévérité de l'HTAP expérimentale [142].

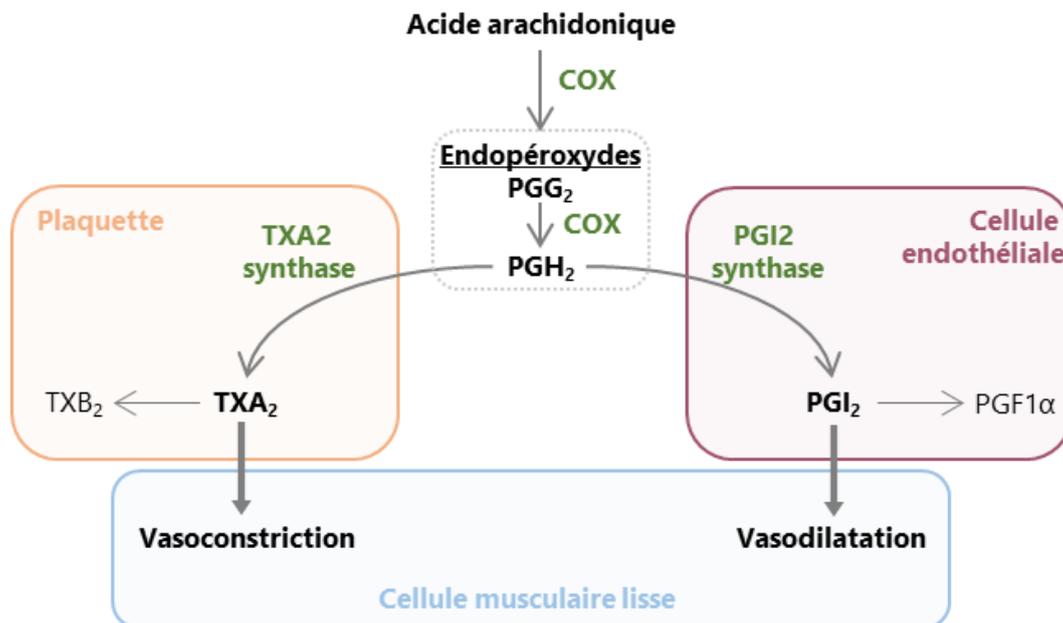
Le rééquilibrage de la voie du NO est un axe de traitement important de l'HTAP, soit par activation de la production de GMPc (activateur de la GC) ou par inhibiteur de la dégradation du GMPc (inhibiteur de la PDE5) (voir partie 2.5.3 ).

#### 2.4.4.2 Prostacycline et thromboxane A2

La prostacycline (aussi appelée prostaglandine I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) et le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) sont des prostanoides, métabolites de l'acide arachidonique. La PGI<sub>2</sub> est produite principalement au niveau endothélial par la cyclo-oxygénase (COX) 2, pour former les endopéroxydes prostaglandine 2 (PGG<sub>2</sub>) et prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), puis transformée en PGI<sub>2</sub> par la prostacycline synthase (Figure 12).

La production du TXA<sub>2</sub> résulte principalement de l'activité de la COX1 plaquettaire puis la thromboxane synthase. Ces prostanoides ont une demi-vie courte, ils sont rapidement métabolisés en 6-ketoprostaglandin F<sub>1</sub>α et 2,3-dinor-6-ketoPGF<sub>1</sub>α pour les PGI<sub>2</sub>, et thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) ou ses dérivés 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> et 11-dehydroTXB<sub>2</sub> pour le TXA<sub>2</sub> [143]. L'expression des COX peut être stimulée par le Ca<sup>2+</sup> [144]. La PGI<sub>2</sub> est un puissant vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. Son action vasodilatatrice s'effectue sur les CML-AP par le biais de son récepteur couplé aux

protéines G (récepteur de la PGI<sub>2</sub>, ou récepteur IP). Il a également été reconnu un rôle de la PGI<sub>2</sub> sur l'angiogenèse et sur le maintien de l'intégrité endothéliale, avec notamment une action anti-inflammatoire [145,146]. Le TXA<sub>2</sub> est lui un vasoconstricteur puissant. Il peut avoir un effet autocrine sur la régulation des plaquettes, mais aussi avoir un effet paracrine sur les CML-AP, via son récepteur couplé aux protéines G (récepteur du TXA<sub>2</sub>, ou récepteur TP) et donc provoquer la contraction.



**Figure 12 :** Production de thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) et Prostacycline (PGI<sub>2</sub>)

Dès 1992, Christman *et al.* ont reporté un déséquilibre des métabolites urinaires de ces prostanoides avec une diminution du PGI<sub>2</sub> associée à une augmentation de TXA<sub>2</sub> chez les patients atteints d'HTAP [147]. Une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique de la prostacycline synthase dans les poumons de patients atteints d'HTAP a également été observée [148]. Dès 1986, Czer et ses collègues avaient mis en évidence un bénéfice d'un traitement par PGI<sub>2</sub> sur des modèles d'HTAP de chien traité à la MCT [64]. À l'inverse, en 1997, Nagata *et al.* ont démontré que l'inhibition de la thromboxane synthase ou l'utilisation d'antagoniste des récepteurs du TXA<sub>2</sub> réduisait le développement de l'HTAP induite par la MCT chez le rat [149]. Par la suite, le terbogrel, un inhibiteur de la TXA<sub>2</sub> synthase et antagoniste du récepteur au TXA<sub>2</sub>, a été testé chez des patients atteints d'HTAP. Malgré une efficacité pharmacologique (réduction des métabolites du thromboxane), cela n'a pas été accompagné d'une amélioration hémodynamique et les patients ont eu de fortes douleurs aux jambes, écartant la possibilité de traitement par le terbogrel [150]. Plus récemment, le NTP42,

un nouvel antagoniste du récepteur au TXA<sub>2</sub>, a permis de réduire le remodelage vasculaire pulmonaire, la fibrose, l'inflammation et a permis une amélioration hémodynamique des rats traités à la MCT [151]. Il a également été démontré, dans le modèle d'HTAP de rats Sugén/hypoxie, que la monothérapie par traitement au NTP42 ou Sildenafil (un inhibiteur de la PDE5 approuvé pour le traitement de l'HTAP) était insuffisante pour permettre une amélioration hémodynamique, alors que la bithérapie améliore les caractéristiques hémodynamiques [152]. Afin d'évaluer son effet cardioprotecteur, le NTP42 a également été testé sur le modèle de dysfonction ventriculaire droite de cerclage de l'AP. Le traitement des rats a atténué le dysfonctionnement du VD, montrant un effet cardiaque en plus de l'effet sur les vaisseaux pulmonaires [153]. La phase 1 des essais cliniques a confirmé que le NTP42 était bien toléré et avec un bon profil pharmacocinétique chez les patients [154].

L'équilibre entre le facteur vasodilatateur PGI<sub>2</sub> et le facteur vasoconstricteur TXA<sub>2</sub> est donc modifié chez les patients atteints d'HTAP. La restauration de la balance des prostanoïdes a rapidement donné lieu à un traitement des patients avec l'administration de prostacycline [155]. Le rééquilibrage de cette balance représente un axe important des traitements des 20 dernières années (voir partie 2.5.3).

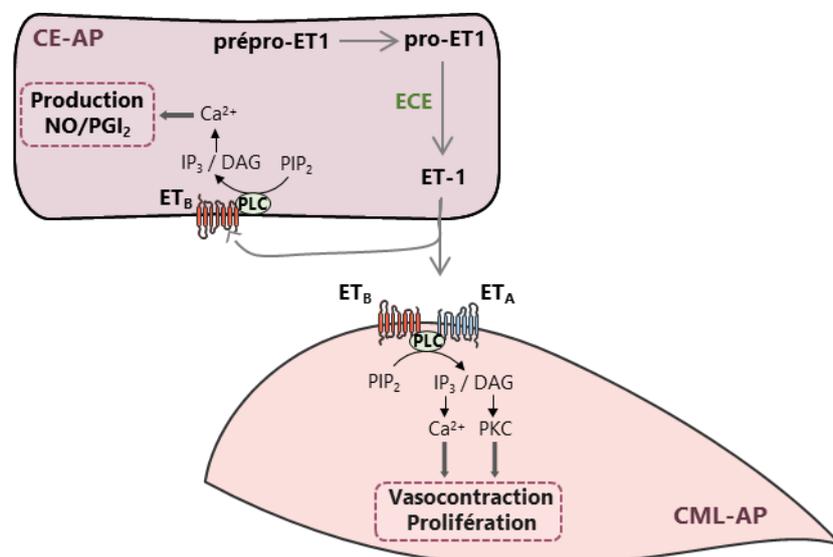
#### 2.4.4.3 Endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide vasoconstricteur de 21 acides aminés découvert en 1988 par Yanagisawa *et al.* [156]. L'ET1 est synthétisée principalement dans les CE, sous la forme de prépro-ET1, une forme quasiment inactive biologiquement. La prépro-ET1 est clivée par une peptidase afin de former la pro-ET1, de 38 acides aminés, puis est activée par des métalloprotéases appelées enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) afin de former l'ET-1 [157]. L'ET-1 forme avec l'ET-2 et ET-3 la famille de l'endothéline. Les CE-AP produisent essentiellement de l'ET-1.

Suite de la découverte de l'ET-1, les deux récepteurs de l'ET-1 ont été clonés et se sont révélés être des récepteurs, à 7 domaines transmembranaires (RCPG), couplés aux protéines G : ET-A et ET-B [158–161].

L'ET-A est principalement exprimé dans les CML-AP tandis que l'ET-B est retrouvé dans les CE-AP et CML-AP [162]. Une fois l'ET-1 fixée sur les récepteurs des CML-AP, la sous-unité G $\alpha$ q des récepteurs ET-A et ET-B va activer la phospholipase C (PLC) qui va hydrolyser le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et l'inositol-3,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>). Le DAG ainsi formé va activer la PKC qui va notamment

phosphoryler des protéines pro-prolifératives comme les Mitogen-activated protein kinases (MAPK) ou P38 et ainsi induire la prolifération des CML-AP [163]. L'IP<sub>3</sub> va, lui, se fixer sur son récepteur à l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) situé à la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) et ainsi provoquer une libération de calcium du RS provoquant la contraction cellulaire. Au niveau endothélial, l'activation de l'ET-B a un effet autocrine en favorisant la clairance de l'ET-1 circulante, en stimulant la production du NO et du PGI<sub>2</sub> par activation de la PLC, augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> et ainsi stimulation de la eNOS et des COX, mais également en inhibant l'expression de l'ECE-1, favorisant une vasodilatation [164,165]. Les récepteurs à l'endothéline sont également présents sur les fibroblastes (l'ET-A est prédominant), augmentant la synthèse de collagène et la fibrose, et sur les cellules immunitaires (macrophages, monocytes et leucocytes) [166]. Le mécanisme d'action de l'endothéline sur les CE-AP et CML-AP est résumé en Figure 13.



**Figure 13 :** Production et rôle de l'endothéline-1 sur les cellules vasculaires pulmonaires

Chez les patients atteints d'HTAP, une élévation du taux plasmatique d'ET-1 est observée, et cette augmentation corrèle avec l'augmentation des RVP [167,168]. L'ET-1 et la preproET-1 ont été retrouvées fortement exprimées au niveau des cellules endothéliales des AP muscularisées et les lésions plexiformes alors que cela est rarement observé au niveau des AP des patients contrôles [169].

De ce fait, des antagonistes des récepteurs à l'ET-1 ont été développés dans les 20 dernières années, montrant leur efficacité sur les modèles précliniques d'HTAP ainsi que sur les patients atteints d'HTAP [170,171].

#### 2.4.4.4 Le système rénine-angiotensine-aldostérone

Le système rénine-angiotensine-aldostérone est un système hormonal très important

organisé autour du rein et du foie, mais agissant sur le système cardiovasculaire. La principale régulation de ce système s'effectue par la rénine, synthétisée par le rein, clivant l'angiotensinogène en Angiotensine I, qui est ensuite clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*angiotensin converting enzyme*, ACE) pour former l'angiotensine II (AngII). L'ACE est exprimé par l'endothélium pulmonaire et rénal. L'AngII ainsi formé est un peptide actif se fixant sur les récepteurs 1 et 2 de l'angiotensine (AT<sub>1</sub>R et AT<sub>2</sub>R).

Dans l'HTAP, certains polymorphismes du récepteur AT<sub>1</sub> et de l'ACE ont été associés avec la progression de la pathologie [172,173]. De plus, l'activité de l'ACE est augmentée dans les CE pulmonaires de patients atteints d'HTAP, provoquant une production importante d'AngII résultant en l'augmentation de la prolifération et la vasoconstriction [174,175]. Il a également été mis en évidence une surexpression de l'AT<sub>1</sub>R dans les AP de patients atteints d'HTAP.

Il a été mis en évidence une augmentation de l'ACE dans les AP de rats exposés à l'hypoxie chronique [176,177]. De surcroît, le traitement au losartan (antagoniste des AT<sub>1</sub>R) améliore le remodelage vasculaire et ventriculaire droit dans le modèle de rats exposés à la MCT.

En outre, les taux plasmatiques et les niveaux d'expression pulmonaire de l'aldostérone sont élevés dans les patients atteints d'HTAP. Cette hormone minéralocorticoïde, sécrétée par les glandes surrénales, peut avoir un effet sur la prolifération des CML-AP, le stress oxydatif et l'inflammation par le biais du récepteur aux minéralocorticoïdes (un récepteur nucléaire de facteurs de transcription). De plus, l'AngII peut activer ce récepteur intracellulaire aux minéralocorticoïdes via l'activation de la PKC par l'AT<sub>1</sub>R [178]. Il a été démontré que le traitement à l'eplérenone, un antagoniste sélectif du récepteur aux minéralocorticoïdes, ou au spironolactone, un antagoniste non sélectif du récepteur aux minéralocorticoïdes, réduisait le remodelage vasculaire pulmonaire et la condition hémodynamique dans les modèles d'HTAP induit par exposition à la MCT ou l'hypoxie chronique chez le rat [179,180]. De plus, Ly *et al.* ont démontré que le finerenone, un antagoniste non stéroïdien du récepteur aux minéralocorticoïdes (avec une plus grande affinité pour le récepteur comparé aux antagonistes stéroïdiens) atténue le remodelage vasculaire, l'infiltration de cellules inflammatoires et les données hémodynamiques des rats exposés à la MCT ou à un protocole Sugén/hypoxie [181].

Le système rénine-angiotensine-aldostérone est donc un axe de traitement important de l'HTAP, pouvant être régulé par différentes voies. Cependant, ce système est

impliqué dans de nombreux mécanismes et doit donc être régulé avec prudence.

## 2.4.5 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des protéines induisant des voies de signalisation spécifiques par liaison avec des récepteurs à activité tyrosine kinase (récepteurs-enzymes s'autophosphorylant sur les résidus tyrosine), favorisant ainsi la prolifération, migration, différenciation et la survie cellulaire. Depuis plusieurs années, les facteurs de croissance sont connus pour être impliqués dans le développement de l'HTAP, avec notamment la superfamille du *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), le *platelet-derived growth factor* (PDGF) et *Fibroblast growth factor-2* (FGF-2).

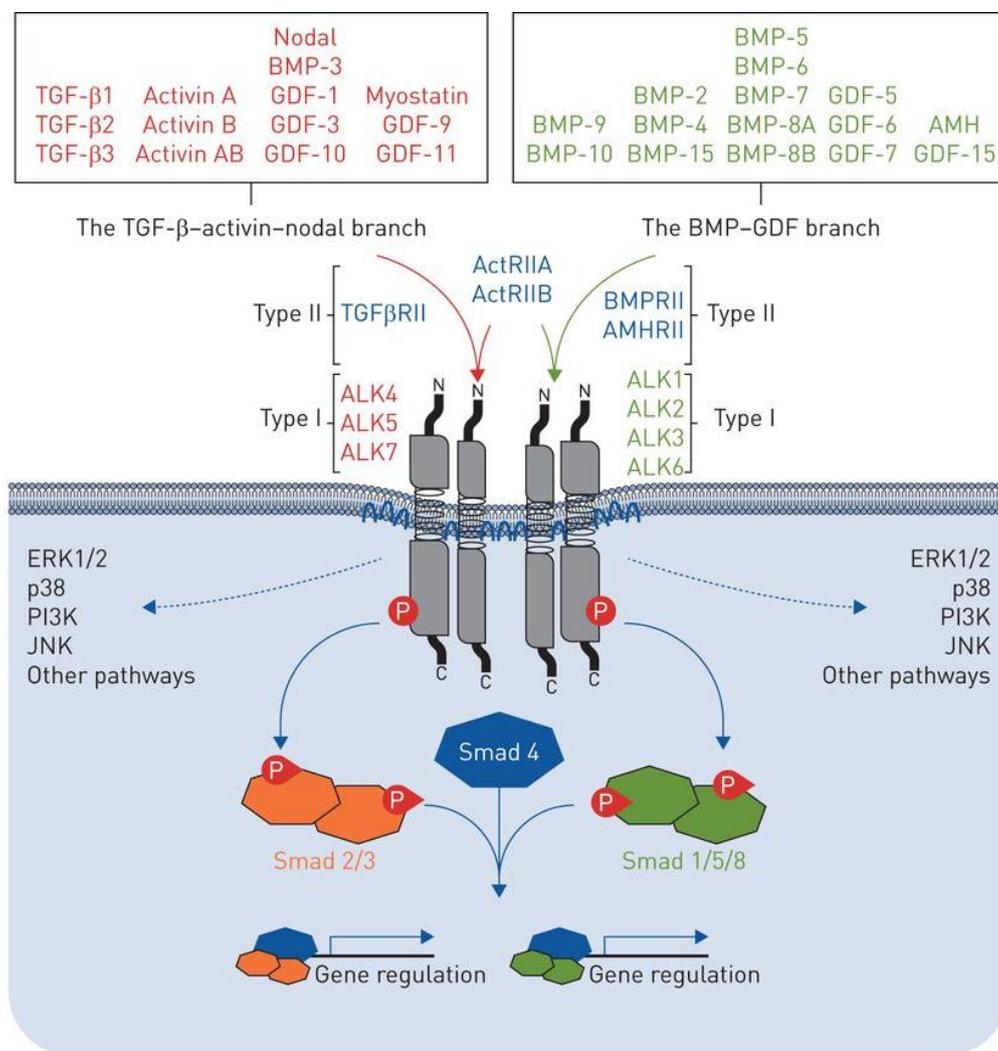
### 2.4.5.1 La superfamille du *transforming growth factor- $\beta$*

La superfamille du TGF- $\beta$  est une famille de protéines regroupant une grande diversité de facteurs de croissance polypeptidique. Les ligands comprennent les TGF- $\beta$ , les *bone morphogenetic proteins* (BMP), les *activins*, les *inhibins*, *growth differentiation factor* (GDF) ou encore les *left-right determination factor* (lefty), l'homologue nodal ou l'hormone anti-müllérienne (AMH) [182]. L'action de ces ligands s'effectue par un complexe comprenant deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II (s'associant en dimère). Les récepteurs de type I sont les ALK, qui comprennent 7 isoformes (ALK1-7) tandis que les récepteurs de type II comprennent le récepteur du TGF- $\beta$  de type II, le BMPRII, le récepteur de l'activine type 2 (A ou B, ActRIIA/actRIIB) ou le récepteur de l'AMH [183]. De plus, l'endogline (Eng) et le bétglycan sont des corécepteurs de ce complexe.

Ces différents récepteurs, co-récepteurs et facteurs de croissance ont des interactions et des signalisations complexes qui peuvent être régulées par des antagonistes endogènes (Noggin, gremlin-1, chordine ou follistatine). Lors de la fixation d'un ligand, le récepteur de type II phosphoryle le récepteur de type I, déclenchant une voie canonique, dépendante des Smad (*small mother against decapentaplegic*), et une voie non canonique, indépendante des Smad, notamment par les voies PI3K/AKT, MAPK ou JNK.

Les Smad sont regroupées en 3 catégories : les Smad2/3 et Smad1/5/8 servent à transduire le signal ; Smad4, agissant comme cofacteur en permettant aux Smad2/3 et Smad1/5/8 de transloquer au noyau et jouer le rôle de facteur de transcription ; et Smad 6/7 qui ont une action inhibitrice sur la signalisation du signal. Les Smad 2/3 sont

activés par le TGF- $\beta$ R associé à Alk4, Alk5 ou Alk7 à la suite de la liaison du TGF- $\beta$ , l'activin-A, l'homologue nodal ou certains GDF. Les Smad1/5/8 sont activées par le BMPRII ou le récepteur de l'AMH associé à Alk1, Alk2, Alk3 ou Alk6 à la suite de la fixation des BMP, de certains GDF ou de l'AMH (Figure 14). Cela peut mener, comme dans le cas du TGF- $\beta$ , à favoriser les mécanismes de prolifération, migration et angiogenèse [184,185]. La détermination de l'activation de la voie canonique ou non canonique est complexe et liée à la dimérisation des récepteurs. Les dimères BMPRII déjà formés semblent activer préférentiellement la voie canonique, tandis que la liaison entre les récepteurs de type I et II induite par les ligands semble activer la voie non canonique [185].



**Figure 14 :** Voies de signalisation liées au *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) et au *bone morphogenetic proteins* (BMP) [186]

Ces deux voies, agissant en parallèle afin d'assurer l'équilibre de la balance prolifération/apoptose, sont dérégulées dans l'HTAP. Tout d'abord, différentes

mutations impliquant des membres de la voie ALK1/BMPRII ont été retrouvées, avec notamment les mutations hétérozygotes perte de fonction de *BMPRII* qui représentant 53 à 86 % des patients avec une HTAP familiale et dans 14 à 35 % des patients avec une HTAP sporadique [186]. Cependant, outre ces mutations démontrant qu'une perte d'activité de l'axe des BMP induit une prédisposition à l'HTAP, plusieurs études ont confirmé qu'un déséquilibre de cette balance a lieu dans l'HTAP. Il a été détecté une plus forte présence, par immunohistologie, de ALK3, BMPRII, Smad 3 et pSmad 1/5/8 dans les artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP, tandis qu'une immunoréactivité plus forte a été retrouvée pour l'activin A, GDF-8, 11 et 15, pSmad2/3 et TGF- $\beta$ 3 [186]. TGF- $\beta$ 1 est augmenté dans les CE-AP ainsi qu'au niveau des lésions plexiformes de patients atteints d'HTAP [187]. Des résultats similaires ont été observés dans le sérum de rats exposés à l'hypoxie chronique ou la MCT. Plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées (déficience en ALK1, BMPRII, ENG, Smad1 ou Smad8) ou les rats déficients en BMPRII ont montré une plus grande susceptibilité au remodelage vasculaire pulmonaire [188].

La superfamille du TGF- $\beta$  joue donc un rôle majeur dans l'HTAP, avec une réduction de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et une augmentation de la voie de signalisation du BMPRII favorisant la prolifération et le développement de l'HTAP. Différents acteurs de cette voie sont fortement étudiés et représentent de potentielles thérapies (voir partie 2.5.5).

#### 2.4.5.2 *Platelet-derived growth factor*

Le PDGF a été découvert dans les années 1970 au niveau des plaquettes, mais il est également exprimé dans les cellules vasculaires pulmonaires [189]. Il existe 4 isoformes (PDGF-A à PDGF-D), pouvant former des homodimères (PDGF-AA, -BB, -CC et -DD) ou un hétérodimère (PDGF-AB) [190]. Le PDGF va se lier et activer les RTK PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$ . La fixation de ces ligands sur les récepteurs entraîne leur dimérisation, phosphorylation et l'activation de voies de transduction impliquées dans la prolifération, survie et migration cellulaire [191].

Dès 1998, Humbert *et al.* ont mis en évidence une expression accrue du PDGF-A dans les poumons de patients atteints d'HTAP [192]. Ces résultats ont ensuite été confirmés et précisés, avec une expression accrue du PDGF-A, PDGF-B et de ses deux récepteurs au niveau des lésions vasculaires pulmonaires et le tissu pulmonaire de patients atteints d'HTAP [164]. L'expression du PDGF-BB est aussi augmentée dans le sérum de ces

patients [195]. Ogawa et al. ont trouvés que le traitement de CML-AP isolées des patients contrôles avec du PDGF a stimulé l'expression du canal calcique Orai1 et de son partenaire STIM1 via la voie de signalisation Akt [196].

Par ailleurs, il a été démontré que le PDGF favorise la prolifération des CML-AP de rat, en induisant notamment l'augmentation de l'expression du canal calcique TRPC6 [167]. L'expression du PDGFR $\beta$  est également augmentée dans les poumons de rongeurs exposés à l'hypoxie chronique ou la MCT. L'expression du PDGFR $\alpha$  et du PDGFR $\beta$  est également augmentée, à un stade précoce, dans les poumons de souris exposés à l'hypoxie chronique [199].

L'activation constitutive de PDGFR $\beta$  par mutation génétique (mutation induisant une autophosphorylation du récepteur indépendante du ligand) chez la souris ne permet pas à elle seule d'induire une HTAP, mais aggrave l'HTAP expérimentale induite par exposition à l'hypoxie chronique [200]. De plus, le traitement de ces souris avec l'imatinib (inhibiteur du PDGFR et des kinases c-kit et Abl) réduit l'HTAP expérimentale induite par l'hypoxie chronique. Une seconde étude a démontré une augmentation des pressions systoliques et de l'hypertrophie du VD après 5 semaines d'activation constitutive du PDGFR $\alpha$  par mutation génétique chez les souris mâles, mais pas chez les souris femelles [201]. De plus, *in vivo*, l'inhibition du PDGFR par l'imatinib réduit l'HTAP induite par la MCT ou l'exposition à l'hypoxie chronique chez le rat [202]. L'imatinib a fait l'objet d'un essai clinique de phase 3, par voie orale [203,204]. Malheureusement, malgré une amélioration de certains paramètres hémodynamiques chez les patients traités avec l'Imatinib, les essais ont été suspendus en raison d'apparitions de sérieux effets secondaires (apparition d'hématomes sous-duraux) [205].

À l'inverse, il a été démontré que le Dasatinib, un inhibiteur des RTK, peut prédisposer au développement d'HTAP [206]. Contrairement à l'imatinib, le Dasatinib entraîne une dysfonction endothéliale provoquant une surproduction des ROS pouvant prédisposer les patients au développement de l'HTAP [207]. Néanmoins, le Dasatinib est connu pour réguler d'autres molécules, dont la tyrosine kinase Src. Dans les CML-AP humaines, cette kinase est colocalisée avec le canal potassique KCNK3 (*Potassium two pore domain channel subfamily K member 3*), dont l'équipe a démontré que les dysfonctions contribuent au développement de l'HTAP (voir partie 2.4.11.1). La sous-expression de la kinase Src diminue la fonction de KCNK3, induisant une dépolarisation des cellules pouvant contribuer à la pathogenèse de l'HTAP induite par le dasatinib [208,209].

Malgré plusieurs essais cliniques, la toxicité des inhibiteurs des RTK demeure un frein à la réussite de ces traitements, et plusieurs solutions sont étudiées afin de réduire les effets secondaires de ces molécules [201]. Actuellement, un essai clinique de phase 3 est en cours pour l'imatinib inhalé, qui est bien toléré par les patients, évitant les effets systémiques provoqués par l'imatinib par voie orale [210].

#### 2.4.5.3 *Fibroblast growth factor-2*

Le FGF-2 fait partie de la famille des FGF, composé de 23 membres. Il est sécrété par différents types cellulaires, incluant les CE, fibroblastes et macrophages. Le FGF2 a une action grâce à sa liaison sur un récepteur à activité tyrosine kinase, le FGFR (FGFR1 et FGFR2). Une augmentation du taux circulant et de l'expression pulmonaire du FGF2 a été mise en évidence chez les patients atteints d'HTAP [211]. Cela est également le cas dans les modèles expérimentaux d'HTAP (rat exposé à la MCT et agneau dont l'HTAP a été développée par mise en place d'un pontage aorto-pulmonaire) [212,213]. De plus, *in vitro* les CE-AP isolées de patients atteints d'HTAP sécrètent plus de FGF-2 que les CE-AP des patients contrôles, et cette augmentation contribuait à l'hyperprolifération des CML-AP [214]. Cette surproduction de FGF-2 peut également être à l'origine d'un effet autocrine participant au maintien du phénotype hyperprolifératif et de la résistance à l'apoptose des CE pulmonaires de patients atteints d'HTAP [215]. Au contraire, la suppression de FGFR1 ou FGFR2 (par transgénèse) spécifiquement dans les CE de souris, favorise le développement de l'HTAP de ces souris exposées à l'hypoxie chronique. À l'inverse, les souris ayant une activation constitutive du FGFR1 spécifiquement au niveau des CE sont protégées contre le développement l'HTAP induite par exposition l'hypoxie chronique [216]. Une fine régulation de la production et sécrétion du FGF2 semble donc importante dans le développement de l'HTAP.

#### 2.4.6 Sérotonine

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une monoamine jouant un rôle de neurotransmetteur dans le système nerveux central et une hormone locale dans le système périphérique. La 5-HT est synthétisée à partir du L-tryptophane via l'activité de la tryptophane hydroxylase (TPH1), qui convertit le L-tryptophane en 5-hydroxy-L-tryptophane. Cette dernière est convertie en sérotonine par la décarboxylase de l'acide L-aminé aromatique et la 5-hydroxytryptophane décarboxylase. La majorité de la production corporelle de 5-HT s'effectue par les cellules entérochromaffines de la paroi

intestinale. La 5-HT peut également être synthétisée au niveau de l'endothélium pulmonaire, et il a été montré que la TPH1 et la production de 5-HT est augmentée dans les CE-AP de patients atteints d'HTAP [217]. Un taux élevé de sérotonine périphérique circulante est associé au développement de l'HTAP [218]. Il existe un transporteur de la sérotonine (SERT) ainsi que 7 récepteurs (5-HT1 à 5-HT7). Grâce au SERT et au 5-HT1B et 5HT2B, la 5-HT peut avoir un effet paracrine sur les CML-AP en agissant sur la contraction ou la prolifération cellulaire par le biais de la voie des MAPK [219–221]. Il a été montré que l'expression du récepteur 5-HT1B est augmentée dans les CML-AP de patientes atteintes d'HTAP, potentiellement provoqué par une diminution du microARN-96 (miR-96) médiée par les œstrogènes [222]. De plus, les inhibiteurs des récepteurs 5-HT1B, 5-HT2B ou du SERT ont permis de réduire ou inhiber l'HTAP expérimentale dans différents modèles [223–225]. La TPH1 est aussi retrouvée augmentée dans les modèles animaux d'HTAP, et son inhibition réduit le développement de l'HTAP expérimentale [226–228]. Il a été montré qu'après traitement par l'imatinib, des patients avaient des taux plasmatiques de sérotonine réduits par rapport au placebo, suggérant que l'imatinib pourrait réguler à la baisse la TPH1 via l'inhibition de la signalisation du PDGF $\beta$  [227]. En outre, l'inhibition du SERT a provoqué une aggravation des cas cliniques, la 5-HT s'accumulant et induisant l'activation des récepteurs [229,230]. Ces observations ont également été effectuées lors de l'apparition des HTAP induites par les médicaments supprimeurs d'appétit. En effet, le fenfluramine et ses dérivés sont des inhibiteurs de la recapture de la 5-HT et peuvent interagir directement avec le SERT, provoquant ainsi une augmentation des niveaux de sérotonine associée à une augmentation de la vasoconstriction des AP et une prolifération des CML-AP [231]. Cependant, de nombreux patients n'ont pas développé d'HTAP, supposant l'implication d'autres facteurs ou une prédisposition génétique provoquant l'apparition de l'HTAP induite par ces supprimeurs d'appétit.

#### 2.4.7 Dérégulations mitochondriales : métabolisme et stress oxydatif

Depuis plusieurs années, des travaux étudient le rôle de la reprogrammation métabolique des cellules vasculaires pulmonaires dans la pathogenèse de l'HTAP. Dans la littérature, les CML-AP de patients atteints d'HTAP sont décrites pour présenter une transition glycolytique vers la glycolyse, une hyperpolarisation du potentiel de membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) et une diminution de la production de ROS mitochondriales.

Les mitochondries sont reconnues pour avoir un rôle primordial dans l'homéostasie

cellulaire, en produisant notamment l'ATP grâce à la phosphorylation oxydative. De plus, elles contrôlent la survie cellulaire et le processus apoptotique en cas de manque de nutriments (glucose, lipides, oxygène) [234]. En fonction des disponibilités et besoin en glucose et oxygène, les mitochondries peuvent passer de la voie classique aérobie de la phosphorylation oxydative, dépendant de l'oxygène, à une voie axée sur glycolyse anaérobie. Ce phénomène est notamment retrouvé dans les cellules cancéreuses, et est appelé effet Warburg [235]. Une transition vers la glycolyse anaérobie, similaire à l'effet Warburg, a été observée dans les CE et CML-AP de patients atteints d'HTAP [236,237]. Ce changement glycolytique a aussi été retrouvé dans le VD hypertrophié, avec une augmentation de l'absorption du glucose dans le VD corrélée avec la sévérité de l'HTAP [238].

HIF est un facteur de transcription régulateur de l'homéostasie liée à la disponibilité en oxygène jouant un rôle essentiel dans la régulation de ce changement glycolytique. C'est un complexe hétérodimérique composé d'une sous-unité sensible à l'oxygène HIF- $\alpha$  (3 isoformes, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , et HIF-3 $\alpha$ ) et une sous-unité insensible à l'oxygène HIF-1 $\beta$ , identifiée comme ARNT1-3 (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Une augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  ou HIF-2 $\alpha$  est observée dans les poumons ou AP de patients atteints d'HTAP [239,240], bien qu'une étude a démontré la diminution de HIF-1 $\alpha$  dans les CML-AP isolées de patients atteints d'HTAP [241]. Lors d'une déprivation en O<sub>2</sub>, les sous-unités HIF- $\alpha$  se stabilisent, se lient avec HIF- $\beta$  et transloquent au noyau afin d'induire une réponse cellulaire adaptée à l'hypoxie. Cette signalisation régule de nombreux gènes impliqués dans le tonus artériel pulmonaire, la prolifération et l'apoptose, l'angiogénèse ou encore le métabolisme cellulaire. L'activation de HIF-1 $\alpha$  régule la transcription de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), qui peut inhiber la pyruvate déshydrogénase (PDH). La PDH catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA dans les mitochondries, facilitant ainsi l'entrée du substrat dans le cycle de Krebs. Dans les CML-AP, les cardiomyocytes et les fibroblastes du VD, l'activation de la PDK promeut la transition métabolique observée. L'expression de la PDK est d'ailleurs augmentée dans les AP de patients atteints d'HTAP [242]. L'inhibition de la PDK par le dichloroacétate réduit l'HTAP induite par exposition à l'hypoxie chronique ou la MCT chez le rat [243,244]. Une étude clinique de phase 1 menée sur des patients atteints d'HTAP, ayant déjà un traitement permettant d'avoir une condition clinique stable, a mis en évidence que l'inhibition de la PDK par le dichloroacétate a amélioré les mesures hémodynamiques des patients atteints d'HTAP

[242]. D'autres études indiquent également une augmentation de la glutaminolyse (passage de la glutamine en glutamate puis en  $\alpha$ -cétoglutarate) et une altération de l'oxydation des acides gras dans les CE-AP et CML-AP de patients atteints d'HTAP [245].

Les mitochondries sont capables d'effectuer des processus de fission (division d'une organelle unique en deux indépendantes) ou de fusion (réaction opposée), pouvant contrôler la taille et le nombre de mitochondries dans la cellule. Dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP, il est reporté une augmentation du nombre de petites mitochondries (fragmentation). Ceci est lié à la diminution de l'expression de la *mitofusin-2* et l'augmentation conjointe de la protéine de fission DRP1 (*dynamamin-related protein 1*) [246].

Le  $\Delta\Psi_m$  a été décrit pour être hyperpolarisé dans des CML-AP de patients atteints d'HTAP, ainsi que certains modèles expérimentaux [244,247]. Effectivement, le  $\Delta\Psi_m$  (environ -200 mV) est généré par les pompes à protons de la chaîne de transport d'électron, lors de la phosphorylation oxydative. Cette énergie est exploitée par l'ATP synthase pour produire l'ATP. De plus, la modification du  $\Delta\Psi_m$  peut aussi influencer l'apoptose médiée par les mitochondries, le MTP (*mitochondria transition pore*), permettant la sortie de médiateur proapoptotique, étant dépendant du voltage. Les CML-AP hyperpolarisées sont donc plus résistantes à l'apoptose.

L'homéostasie calcique mitochondriale joue un rôle essentiel dans les processus métaboliques, notamment la respiration mitochondriale, la détection de l'oxygène et l'apoptose. Grâce à leur potentiel membranaire négatif, les mitochondries peuvent aussi directement réguler l'homéostasie calcique et la  $[Ca^{2+}]_i$ . Sur la membrane externe des mitochondries, des transporteurs dépendants du voltage permettent les mouvements du calcium entre le cytosol et l'espace intermembranaire. Le calcium est ensuite transporté à travers la membrane mitochondriale interne notamment par le MCU (*mitochondrial calcium uniporter*) ou le canal calcique TRPC3 [248]. Le MCU est un canal calcique sélectif à rectification entrante permettant l'entrée du calcium dans la matrice mitochondriale. Le calcium peut également sortir de la matrice mitochondriale par les échangeurs  $Na^+/Ca^{2+}$  et  $H^+/Ca^{2+}$ . Les mitochondries ont aussi des sites de contact avec le RE ou la membrane plasmique, formant des microdomaines fortement concentrés en  $Ca^{2+}$ . Hong *et al.* ont démontré, dans les CML-AP humaine et de rats exposés à la MCT, une diminution de l'expression de l'uniport MCU [249]. La diminution de l'expression de la MCU est associée à une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et à une diminution du calcium mitochondrial. Dans les CML-AP de patients atteints

d'HTAP, la surexpression de la MCU induit une augmentation du calcium mitochondrial, une diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$ , une diminution de la prolifération, de la migration, de la résistance à l'apoptose ainsi qu'une diminution de l'effet Warburg. Dans cette étude, ils ont aussi identifié que le miR-138 et 25 régulent négativement la MCU et que le traitement de rat exposé à la MCT avec les anti-miR-25 et 138 restaure l'expression de la MCU et ainsi atténue le développement de l'HTAP.

Enfin, les mitochondries représentent une source majeure de ROS. Les ROS sont un groupe de molécules comme l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'hypochlorite ( $OCl^-$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^-$ ), pouvant notamment se lier à des protéines grâce à des résidus cystéine et tyrosine, aux lipides ou à l'acide désoxyribonucléique (ADN) [250]. Durant la phosphorylation oxydative, des électrons sont formés par le complexe I et III mitochondriaux. Ces électrons interagissent avec l' $O_2$  pour former l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ). Ces superoxydes ainsi formés peuvent être convertis en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la superoxyde dismutase (SOD), avec SOD1 dans l'espace intermembranaire, SOD2 dans la matrice mitochondriale. Dans l'HTAP, les mROS sont diminués, avec une diminution d'expression des SOD1, 2 et 3, ainsi que dans les modèles expérimentaux d'HTAP et particulièrement de la SOD2 dans les lésions plexiformes et les AP humaines de patients atteints HTAP [251–254]. L' $H_2O_2$  peut activer certains facteurs de transcription, comme HIF-1 $\alpha$ .

L'activation de HIF-1 $\alpha$  provoque la diminution de l'expression des canaux potassiques Kv1.5, entraînant une dépolarisation membranaire, l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage et ainsi la contraction cellulaire [252]. De plus, l'influx de calcium par les canaux calciques dépendants du voltage, activant notamment le facteur de transcription NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*). De plus, l'augmentation de la concentration  $K^+$  intracellulaire peut également provoquer la résistance à l'apoptose ou la prolifération des CML-AP, par inhibition de l'activité des caspases.

Ces dérégulations mitochondriales (sont caractéristiques des CE-AP et CML-AP de patients atteints d'HTAP. Cependant, il n'est pas encore clair si cette reprogrammation métabolique est une cause ou une conséquence du remodelage vasculaire afin de s'adapter à l'hyperprolifération cellulaire.

#### 2.4.8 Modifications épigénétiques

Les dérégulations épigénétiques ayant lieu chez les patients atteints d'HTAP sont de plus en plus étudiées. Les mécanismes épigénétiques modifient l'expression de certains

gènes, sans affecter la séquence d'ADN, à cause d'un impact sur la chromatine, l'expression et l'accessibilité des gènes. Ces modifications peuvent survenir par une méthylation de l'ADN, une modification des histones ou encore les microARN (miR) non codants.

Premièrement, une augmentation de l'expression de l'ADN méthyltransférase 3 $\beta$  a été observée dans les CML-AP, mais pas dans les CE-AP, de patients atteints d'HTAP [255]. Cette augmentation a aussi été retrouvée dans les poumons de rats exposés à l'hypoxie chronique ou à la MCT. Cette augmentation a été retrouvée dans les CML-AP humaines traitées au PDGF-BB, et l'inhibition de l'ADN méthyltransférase 3 $\beta$  a induit une migration et prolifération de ces cellules, supposant un rôle protecteur. Une augmentation globale de la méthylation de l'ADN est également retrouvée dans les CE-AP de patients atteints d'HTAP. Des différences de méthylations, qui ne dépendent pas de l'âge, du sexe ou des causes génétiques de l'HTAP, sont retrouvées sur des promoteurs de gènes ayant un lien avec la contraction cardiaque, l'inflammation, mais surtout le transport des lipides et du cholestérol. Par ailleurs, Archer *et al.* ont identifié une hyperméthylation dans le gène de SOD2, responsable d'une diminution de son expression (similaire à l'humain), chez les rats *fawn-hooded* (FR), développant une HTP spontanée [256]. L'inhibition de cette méthylation par la 5-aza-2'-deoxycytidine (inhibiteur d'ADN méthyltransférase) a permis de réduire la prolifération, la fonction mitochondriale et favoriser l'apoptose des CML-AP de rats FH. Cette méthylation étant réversible, elle pourrait être un mécanisme intéressant pour traiter la fonction mitochondriale chez les patients atteints d'HTAP.

Le niveau d'acétylation des histones composant la chromatine est régulé en partie par les histones désacétylases (HDAC). Les HDAC retirent les groupes acétyles des histones et répriment la transcription de l'ADN en resserrant la chromatine. Zhao *et al.* ont montré que l'expression des HDAC1, 4 et 5 est augmentée dans les poumons de patients atteints d'HTAP [257]. Les différentes études menées sur les différents modèles expérimentaux d'HTAP, chez le rat, sont limitées par l'utilisation d'inhibiteur à spectre large des HDAC [258]. Cependant, Boucherat *et al.* ont rapporté une augmentation du niveau d'expression d'HDAC6, une histone déacétylase exclusivement cytoplasmique, dans les poumons et AP de patients atteints d'HTAP ainsi que dans les modèles expérimentaux de rats induits par exposition à la MCT ou le Sugén/hypoxie [259]. L'inhibition de l'activité de l'HDAC6 diminue la prolifération, la résistance à l'apoptose et la migration des CML-AP HTAP, et l'inhibition pharmacologique sur des rats exposés

à la MCT ou le Sugén/hypoxie réduit le développement de l'hypertension pulmonaire. Les micro ARN (miR) sont des ARN non codants de 21 à 25 nucléotides capables de réguler l'expression de très nombreux gènes en se fixant de manière complémentaire sur les ARNm. Les miR jouent ainsi un rôle important de régulation de la prolifération, migration, l'apoptose et la différenciation. Il a été démontré que les miR peuvent être régulés par l'hypoxie (plusieurs miR peuvent être régulés par HIF-1 $\alpha$ ). De plus, différents miR peuvent affecter la signalisation BMP/Smad, PPAR $\gamma$ , la voie Rho/ROCK ou des canaux ioniques de la membrane plasmique [260–262,258]. En 2011, Courboulin *et al.* ont identifié six miR surexprimés dans les CML-AP de patients atteints d'HTAPi (miR-450a, miR-145, miR-302b, miR-27b, miR-367, et miR-138-5p) [263]. De plus, ils ont mis en évidence une diminution de l'expression de miR-204, que son expression est corrélée à la sévérité de l'HTAP humaine (également chez les rats exposés à la MCT) et qu'elle est régulée par le PDGF, l'ET1 et l'AngII. L'apport ectopique de miR-204 au niveau des CML-AP de patients atteints d'HTAP a provoqué une diminution de la prolifération et de la résistance à l'apoptose tandis que son administration *in vivo* par nébulisation chez le rat a permis d'atténuer l'HTAP induite par la MCT. De plus, au sein de l'équipe il a été mis en évidence que l'inhibition du miR-138-5p (par nébulisation avec un anti-miR-138-5p), dont l'expression est augmentée dans les poumons de rats exposés à la MCT, réduit le remodelage vasculaire pulmonaire, la prolifération cellulaire et ainsi le développement de l'HTAP. Son inhibition permet également de réduire l'inflammation et les infiltrations de cellules inflammatoires. Un des sites d'action du miR-138-5p se situe dans la région 3'UTR de KCNK3, dont l'expression est diminuée dans les poumons de rat exposés à la MCT, et la nébulisation de l'anti-miR-138-5p a permis de restaurer l'expression de l'ARNm de KCNK3.

La compréhension de tous ces mécanismes de régulation ainsi que les différentes interactions dans l'HTAP est incomplète, mais certaines cibles thérapeutiques commencent à émerger.

#### 2.4.9 Remodelage de la matrice extracellulaire

Dans l'HTAP, il est établi que le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) forme un milieu permissif favorisant l'angiogenèse, la motilité, la prolifération et différenciation des cellulaires vasculaires ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires. L'expansion de la MEC au sein des différentes couches de la paroi vasculaire pulmonaire entraîne la fibrose, conduisant à la rigidité des artères

pulmonaires observée dans l'HTAP [58]. La composition de la MEC est régulée par la balance entre les enzymes protéolytiques et leurs inhibiteurs endogènes. Ces enzymes sont notamment les MMP (métalloprotéinases matricielles), ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*), les sérine élastases et les lysyl oxydases. Les MMP peuvent être régulées par leurs inhibiteurs, les TIMP (*tissue inhibitors of MMP*). L'expression et l'activité de ces enzymes peuvent également être modulées par différents facteurs de croissance et cytokines au sein même des cellules vasculaires pulmonaires. L'infiltration des cellules immunitaires représente une source majeure de ces protéases [264]. Ces MMP peuvent avoir une action directe ou indirecte sur le phénotype des cellules vasculaires pulmonaires, notamment en condition pathologique. De plus, il a été prouvé que ces enzymes peuvent libérer des facteurs de croissance ou des substances vasoactives sous forme active en dégradant la MEC [265].

Premièrement, il est retrouvé une accumulation de collagène dans les AP de patients atteints d'HTAP. L'analyse du collagène total dans les AP de patients atteints d'HTAP a mis en évidence qu'il y avait une plus forte déposition de collagène dans l'intima, puis la média et enfin au niveau périvasculaire [252]. De plus, dans l'intima et la média des AP de patients atteints d'HTAP, il est retrouvé une plus forte expression des gènes codant pour des collagènes : COL14A1 (*collagen Type XIV Alpha 1 Chain*), COL4A5 (*collagen type IV alpha 5 chain*) et COL18A1 (*collagen type XVIII alpha 1 chain*). De plus, dans l'intima et la média d'AP de patients atteints d'HTAPi, il a été retrouvé une augmentation de l'ARNm de la MMP19 et ADAM associée à une diminution de MMP-10, ADAM17, TIMP1 et TIMP3 [252]. Dans une seconde étude, une augmentation de TIMPR-1 et une diminution de MMP-3 ainsi qu'une augmentation de l'activité de MMP-2 (augmentation de la forme active) dans les CML-AP isolées de patients atteints d'HTAP [253].

Dans le modèle de rat exposé à l'hypoxie chronique ou la MCT, il a été montré que l'utilisation d'inhibiteur de la sérine élastase réduit le remodelage vasculaire pulmonaire et réduit le développement de l'HTAP [268]. De plus, dans le modèle d'hypoxie chronique, une diminution du développement de l'HTAP a été observée chez des souris transgéniques ayant une surexpression de l'élafine (inhibiteur physiologique de la sérine élastase) [269]. L'administration d'un inhibiteur de la synthèse du collagène (cis-4-hydroxy-l-proline) a réduit le dépôt de collagène et d'élastine ainsi que le remodelage vasculaire pulmonaire et atténué le développement de l'HTAP chez des rats exposés à l'hypoxie chronique [270]. L'inhibition *in vivo* des MMP a donné des

résultats nuancés sur le remodelage vasculaire pulmonaire en fonction du modèle animal et du type d'inhibiteur utilisé [264]. De plus, en l'absence d'inhibiteur sélectif, l'efficacité clinique des inhibiteurs est limitée avec l'apparition de syndrome musculosquelettique [271].

Les mécanismes régulant le remodelage de la MEC doivent encore être étudiés, mais la dérégulation des enzymes et de leurs inhibiteurs physiologiques semble jouer un rôle important dans la production anormale de composants de la MEC et dans la libération de facteurs de croissances ou de substances vasoactives et ainsi sur le développement de l'HTAP.

#### 2.4.10 La dérégulation du système immunitaire

Les études menées ces dernières années ont montré que les cellules vasculaires pulmonaires ont une signature pro-inflammatoire prononcée et représentent une source importante de cytokine, chimiokines et molécules d'adhésion des cellules inflammatoires.

Des concentrations anormalement élevées de cytokines et chimiokines proinflammatoires sont retrouvées dans le sérum de patients atteints d'HTAP. En effet, des taux élevés d'interleukines  $1\beta$  (IL $1\beta$ ), un élément clé de la réponse inflammatoire, ainsi que d'IL-6, une cytokine pléiotrope, ont été retrouvés chez des patients atteints d'HTAP, ces niveaux étant corrélés au degré de sévérité de la maladie [272,195]. Il a d'ailleurs été reporté que l'IL- $1\beta$  stimule la prolifération et la contraction des CML-AP par inhibition de la voie de la prostacycline et diminution de la production d'AMPc via la diminution de l'activité de l'adénylate cyclase [273]. L'élévation des taux circulants d'IL-6 est également corrélée à l'aggravation de la fonction ventriculaire droite [274]. De plus, une augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-6 a été mise en évidence dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP [275]. Cette surexpression est liée à la résistance à l'apoptose des CML-AP, l'inhibition du récepteur par un anticorps spécifique ou un antagoniste permettant de réduire la survie des cellules. Chez les souris transgéniques, la surexpression de l'IL-6 a provoqué un remodelage vasculaire pulmonaire et le développement spontané d'une HTAP [276]. L'IL-6 est également impliquée dans l'inflammation pulmonaire induite par l'hypoxie et le remodelage vasculaire pulmonaire, la suppression de l'IL-6 ou le blocage de son récepteur réduisant l'HTAP expérimentale [277,278]. De plus, la délétion du récepteur à l'IL-6 dans des souris transgéniques prévient le développement de l'HTAP induite par hypoxie

chronique.

D'autres cytokines, comme l'IL-13, ont également été retrouvées dans les lésions plexiformes et les infiltrats inflammatoires pulmonaires de patients atteints d'HTAP, ainsi que dans le plasma de patients atteints d'une HTAP associée à une sclérodémie systémique, mais leurs implications dans l'HTAP ne sont pas totalement claires [279]. Le taux d'IL-18 est aussi supérieur dans le sérum de patients atteints d'HTAP et son récepteur, notamment présent sur les CML-AP, peut participer à leur migration et donc l'épaississement de la couche musculaire lisse vasculaire [280,281].

Des taux élevés, de plusieurs chimiokines, comme les CCL2 ou MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) et CCL5 (*Chemokine (C-C motif) ligand* ou RANTES), ont été observés dans le plasma et les poumons de patients atteints d'HTAP [282–284]. CCL2 et CCL5 sont produites par les cellules vasculaires pulmonaires et leur rôle est notamment d'attirer et d'activer différentes cellules immunitaires. L'administration d'un inhibiteur de CCL2 freine la progression de l'HTAP dans le modèle MCT [285]. Il est observé un effet similaire sur des souris Sugén/hypoxie déficientes en CCL5, suggérant une implication des cellules immunitaires dans le remodelage vasculaire pulmonaire [286]. Une augmentation d'expression de CXCL12 (*CXC-chemokine stromal cell-derived factor 12*) et de CX3CL1 (aussi appelé Fractalkine) est aussi retrouvée dans les cellules vasculaires pulmonaires de patients atteints d'HTAP [287–290]. Ce constat est aussi retrouvé dans différents modèles expérimentaux [291,292].

En outre, l'endothélium pulmonaire surexprime plusieurs molécules facilitant l'adhésion et le recrutement de cellules inflammatoires sur la paroi vasculaire pulmonaire : ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), E-selectin et P-selectin [293].

Une inflammation périvasculaire pulmonaire est également observée dans les différentes formes d'HTAP ainsi que dans les différents modèles expérimentaux d'HTAP [294,295]. Cette inflammation est majoritairement constituée d'infiltrats de cellules immunitaires, associés avec une augmentation des cytokines pro-inflammatoires. Les cellules immunitaires retrouvées peuvent provenir du système immunitaire inné, comme les monocytes/macrophages, cellules dendritiques et mastocytes ou du système immunitaire adaptatif comme les lymphocytes T et lymphocytes B [296–298]. En outre, ces infiltrats sont retrouvés de manière plus importante autour des lésions plexiformes et ont été reliés à l'aggravation de l'HTAP [272,299].

Enfin, il a été mis en évidence des autoanticorps circulants chez les patients atteints d'HTAP, sans pathologie auto-immune associée [300]. Ces anticorps peuvent réagir aux protéines sécrétées par les cellules vasculaires pulmonaires. La formation de follicules lymphoïdes tertiaires aux environs des vaisseaux remodelés ainsi que le dépôt d'immunoglobulines au niveau des lésions vasculaires a également été mise en évidence [301].

En outre, plusieurs pathologies inflammatoires (VIH, connectivite, infection parasitaire) sont reliées au développement de l'HTAP. Le lien entre le système immunitaire et l'HTAP est complexe, incluant de nombreux acteurs, mais semble influencer le développement de la maladie.

Cependant, les traitements aux stéroïdes ou à l'aspirine ne sont pas efficaces dans l'HTAPi ou l'HTAP héritable [58,302]. À part dans l'HTAP associé à des maladies du tissu conjonctif, en particulier l'HTAP associée au lupus érythémateux disséminé, pour lesquelles les études actuelles soutiennent l'utilisation d'une thérapie, l'utilisation d'immunosuppresseur dans l'HTAPi ou héritable n'est pas recommandée. Cela démontre qu'il est nécessaire d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes immunopathologiques afin d'avoir une approche plus thérapeutique et potentiellement complémentaire pour la prise en charge de l'HTAP.

#### 2.4.11 La dérégulation des canaux ioniques

Le transport des ions à travers la membrane plasmique, qui est imperméable aux ions, est essentiel au maintien de la balance électrophysiologique. Ce transport peut s'effectuer par des transporteurs ou pompes, principalement grâce à une réaction enzymatique permettant le passage de l'ion, contrairement aux canaux ioniques qui permettent le passage des ions à travers la membrane plasmique en fonction de leur gradient électrochimique.

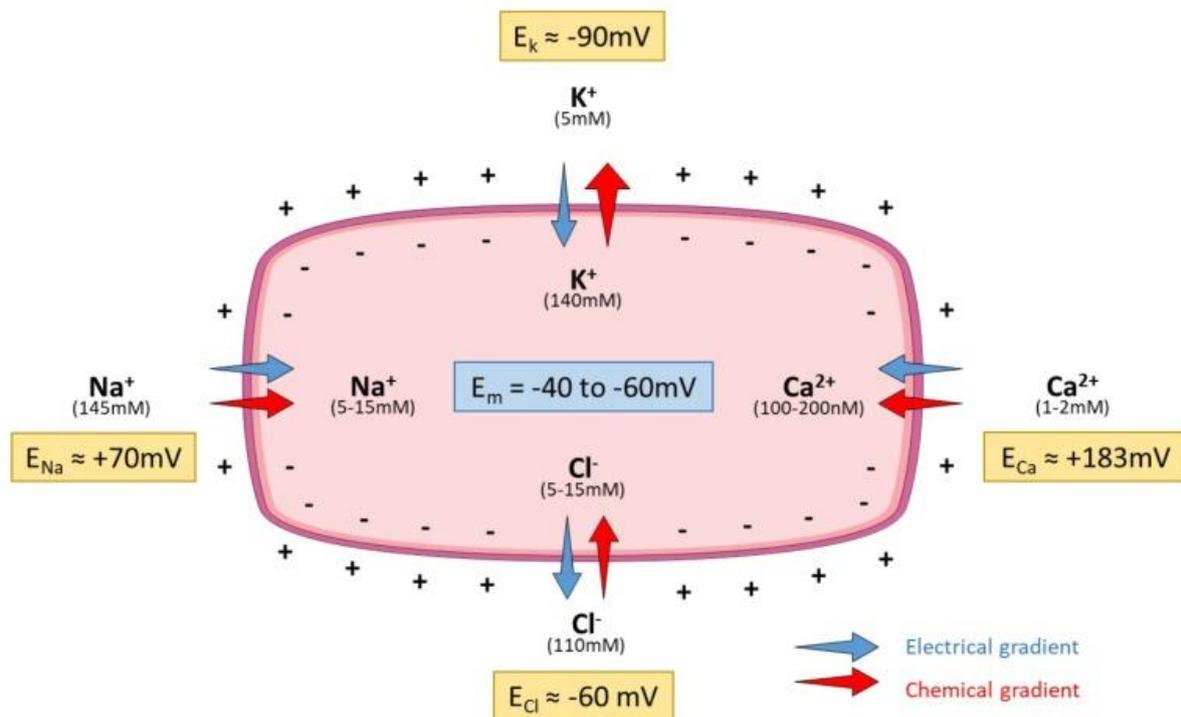
En effet, la membrane plasmique des cellules agit comme un isolant électrique, créant une séparation de charge entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire. La distribution des ions n'étant pas homogène de chaque côté de la membrane, une différence de potentiel électrique de part et d'autre de la membrane est formée. Cette différence est appelée le potentiel de membrane. Ce potentiel de membrane est la résultante de la distribution inégale des ions de part et d'autre de la membrane et de la sélectivité des canaux aux différents ions. La distribution inégale des ions est assurée par la présence de transport actif, comme les pompes, qui permettent le passage d'un

ion à travers la membrane plasmique contre son gradient électrochimique. Cela nécessite une source d'énergie, comme notamment l'hydrolyse de l'ATP. La spécificité de la membrane aux différents ions est déterminée par l'ouverture des différents canaux ioniques. Quand ils sont ouverts, les canaux ioniques permettent le passage d'ions spécifiques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) à travers la membrane plasmique. Ces canaux peuvent être constitutivement actifs ou modulés par différents stimuli (signalisation, potentiel de membrane, mécanique, réserve intracellulaire).

Lorsque la cellule est au repos, son potentiel de membrane est appelé potentiel de repos. Celui-ci varie en fonction des types cellulaires, et dépend des concentrations ioniques des milieux extracellulaire et intracellulaire et de la perméabilité de la membrane aux différents ions. Au repos, quasiment toutes les cellules de mammifères sont principalement perméables à l'ion  $\text{K}^+$ , leur potentiel de membrane est donc proche du potentiel d'équilibre de l'ion  $\text{K}^+$  (-90 à -80 mV). Le potentiel de repos des CML-AP est situé entre -60 et -40 mV et -55 à -30 mV dans les cellules non excitables (y compris les CE-AP).

Les ions étant chargés positivement ou négativement, leur mouvement va provoquer une modification des charges d'un côté à l'autre de la membrane, provoquant un gradient électrique. Le gradient électrique forme avec le gradient chimique (attirant les ions en fonction de leurs concentrations) le gradient électrochimique. Les ions ont donc un potentiel d'équilibre pour lequel les gradients chimique et électrique s'opposent de manière égale. Le flux net de l'ion est alors nul.

Le calcium est beaucoup plus concentré à l'extérieur de la cellule (1 à 2 mM) que à l'intérieur (100 à 200 nM). De ce fait, le potentiel d'équilibre du  $\text{Ca}^{2+}$  est situé à environ 183 mV. Ainsi, lorsque des canaux sont ouverts, le gradient chimique, mais aussi électrique du  $\text{Ca}^{2+}$  va provoquer son entrée dans la cellule (Figure 15).



**Figure 15 :** Concentration et gradients électriques et chimiques des principaux ions dans les cellules de mammifères [303]

Les canaux ioniques sont connus pour jouer un rôle important dans le système vasculaire pulmonaire, en contrôlant l'homéostasie calcique, le tonus vasculaire, la prolifération/apoptose et migration cellulaire ou encore l'angiogenèse (voir partie 3.1). Dans l'HTAP, leurs dérégulations peuvent être à l'origine du développement de la pathologie ou secondaire aux modifications de l'environnement cellulaire, contribuant à l'aggravation de l'HTAP [304].

#### 2.4.11.1 Les canaux potassiques

##### 2.4.11.1.1 Canaux Kv

Dès 1998, Yuan *et al.* ont mis en évidence une dysfonction des canaux Kv1.5 (canaux potassiques dépendant du voltage, codé par le gène *KCNA5*), responsable de l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  provoqué par la diminution du courant Kv ( $I_{kv}$ ) dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP [305]. La sous-expression des canaux Kv1.5 par oligonucléotides antisens ou *short interfering* ARN (siARN) entraîne une dépolarisation membranaire et une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  provoquant une constriction des AP, la prolifération et la résistance à l'apoptose des CML-AP [303,306]. De plus, une diminution de l'expression de l'ARNm de Kv1.5 est retrouvée dans les poumons de patients atteints d'HTAP portant une mutation *BMPR2*. Également, l'expression

protéique et la fonction de Kv1.5 est augmenté dans les CML-AP humaines traitées avec du BMP2, suggérant une régulation de la voie BMP2 sur le canal Kv1.5 [307]. Par la suite, il a aussi été mis en évidence que l'expression des canaux Kv1.5 pouvait être régulée par l'activation des récepteurs aux protéines G à l'ET-1, à la 5-HT et au TXA2 via le clivage du PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub> et DAG [307,308]. Une diminution de l'expression de Kv1.5 est retrouvée dans les CML-AP de souris et de rats exposés à l'hypoxie chronique ainsi que dans les poumons de rats exposés à la MCT ou au protocole Su/Hx [262,309,310]. Dans le modèle d'hypoxie chronique, il a été mis en évidence que la surexpression de HIF-1 $\alpha$  provoque la diminution d'expression de Kv1.5. Le canal Kv1.5 est également sensible à l'hypoxie, l'exposition *in vitro* de CML-AP surexprimant Kv1.5 à une hypoxie aiguë provoquant une diminution du courant Kv [311]. De plus, il a été démontré que la réexpression de Kv1.5 *in vivo* par l'utilisation d'adénovirus atténue le développement de l'HTAP chez des rats exposés à l'hypoxie chronique [312].

Il a également été mis en évidence des SNP dans le gène *KCNA5*. En 2007, Remillard *et al.* ont identifié 17 SNP dans une cohorte de patients atteints d'HTAP [303]. Ni l'expression ni la fonction du canal ont été testées, mais ces SNP sont localisées dans les régions traduites ou du promoteur. Wipff *et al.* ont également identifié 4 SNP chez des patients atteints d'HTAP associée à une sclérose systémique [313,314]. En 2023, sept nouveaux variants ont été identifiés au sein d'une cohorte espagnole de patients atteints d'HTAP avec une prévalence d'environ 1 %. Il est confirmé que deux de ces variants entraînent une diminution de la fonction de Kv1.5. Néanmoins, la pathogénicité de ces SNP est incertaine et est encore à confirmer [315].

En outre, il a récemment été identifié un patient, atteint de sclérose en plaques et traité avec la 4-aminopyridine (inhibiteur des canaux Kv), qui a développé une HTAP réversible à l'arrêt du traitement [316]. En outre, la 4-aminopyridine est aussi connu pour réduire la fonction du canal KCNK3 [317].

#### 2.4.11.1.2 Canaux KCNK3

Le canal KCNK3, aussi appelé *TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> Channel 1* (TASK-1) est un canal potassique à deux domaines pores. C'est un canal ubiquitaire, qui participe au maintien du potentiel de repos des cellules et du tonus vasculaire [318,319].

Plusieurs mutations ont été identifiées chez des patients atteints d'HTAP, notamment sur le gène codant pour le canal KCNK3 avec l'identification de 28 différentes mutations chez 39 patients [30,320,321]. 4 porteurs sains ont également été identifiés. Ces

mutations hétérozygotes sont observées dans des formes sporadiques ou familiales d'HTAP. Les patients atteints d'HTAP et porteurs d'une mutation *KCNK3* sont plus âgés au moment du diagnostic et ont une PAPm plus élevée (âge médian de 28 ans et 76 mmHg de PAPm contre 42 ans et 56,4 de PAPm pour les patients atteints d'HTAP idiopathique) [322]. Parmi ces mutations, 8 ont été fonctionnellement caractérisées et entraînent une perte de fonction du canal *KCNK3*. Parmi elles, la fonction de *KCNK3* a pu être restaurée dans 2 cas grâce au ONO-RS-082 (un activateur de *KCNK3*), suggérant qu'une approche pharmacologique pourrait être utilisée sur ces cas d'HTAP. De plus, une diminution de l'expression de *KCNK3* est observée dans les CE-AP et CML-AP de patients atteints d'HTAPi ou d'HTAP héréditaire porteurs de la mutation *BMPR2*. Une diminution de la fonction de *KCNK3* est également observée dans les CML-AP de patients atteints d'HTAPi. Cette diminution est également retrouvée dans les CE-AP et CML-AP de rats exposés à la MCT. Son inhibition pharmacologique ou sa sous-expression par siARN provoque une dépolarisation de la membrane des CML-AP [319]. Les CML-AP isolées de rat avec une mutation perte de fonction sont aussi dépolarisés [323].

La sous expression de *KCNK3* par siARN augmente la prolifération des CML-AP contrôles, en corrélation avec une augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et une phosphorylation exacerbée de ERK1/2, caractéristique de l'HTAP, et a provoqué la dépolarisation et la fragmentation des mitochondries. Une analyse protéomique menée sur les CE-AP et CML-AP humaines avec une sous-expression de *KCNK3* par siARN, a mis en évidence que la perte de *KCNK3* favorisait la prolifération et la migration des CML-AP ainsi que la résistance à l'apoptose et le changement métabolique opérant dans les CE-AP [324].

*In vivo*, l'inhibition chronique de *KCNK3* avec le A293 induit une prolifération des cellules vasculaires pulmonaires et des pressions systoliques du VD. Les rats avec une mutation perte de fonction pour *KCNK3* développent spontanément une néomuscularisation des vaisseaux pulmonaires associée à une élévation de la pression systolique du VD et des résistances vasculaires pulmonaires, démontrant que la perte de fonction de *KCNK3* chez le rat est suffisante pour provoquer une HTAP [323]. De plus, l'exposition de ces rats à l'hypoxie chronique ou à la MCT a induit une aggravation de l'HTAP comparé aux rats ne possédant pas la mutation *KCNK3*.

L'activation pharmacologique de *KCNK3* pourrait être une approche intéressante pour l'HTAP, cependant chez certains patients cette expression est totalement perdue,

limitant la possibilité d'un traitement pharmacologique. Cela pourrait être pallié par une thérapie personnalisée ou un traitement permettant de réexprimer KCNK3 dans les cellules vasculaires pulmonaires.

#### 2.4.11.1.3 Canaux ABCC

Depuis 2018, 45 variants du gène *ABCC8* (*ATP binding cassette subfamily C member 8*), codant pour le *Sulfonylurea receptor 1* (SUR1) ont également été identifiés chez des patients atteints d'HTAP [17,325,326]. SUR1 est une sous-unité régulatoire du canal potassique Kir6.2 [327]. Les conséquences sur la fonction du canal SUR1/Kir6.2 ont été étudiées pour 12 de ces variants, démontrant une diminution de la fonction. Le traitement avec un activateur de SUR1, le diazoxide, a restauré la fonction de 8 de ces variants. Selon des études *in silico*, 9 autres variants seraient pathogènes, mais cela reste à confirmer grâce à d'autres approches [325,326,328]. Les patients atteints d'HTAP et porteurs de variants *ABCC8* sont particulièrement jeunes au moment du diagnostic (âge médian de 14 ans contre 42 ans pour les patients atteints d'HTAP idiopathique). Nous avons mis en évidence qu'il n'y a pas de différence d'expression de SUR1 ou Kir6.2 dans les CE-AP ou CML-AP de patients atteints d'HTAP comparé aux patients contrôles. Cependant, l'activation pharmacologique SUR1/Kir6.2 entraîne une diminution de la prolifération des CE-AP et CML-AP isolées de patients atteints d'HTAP, la vasodilatation des AP de patients atteints d'HTAP et l'activation pharmacologique de SUR1 *in vivo* réduit le développement de l'HTAP dans deux modèles expérimentaux chez le rat [309]. Ces résultats, auxquels j'ai contribué durant ma thèse, suggèrent un intérêt pour l'activation pharmacologique de SUR1 dans les patients atteints d'HTAP.

En 2014 a été identifié des mutations gain de fonction dans le gène *ABCC9* (*ATP binding cassette subfamily C member 9*), codant pour la protéine *Sulfonylurea receptor 2* (SUR2). SUR2 forme un canal potassique avec Kir6.1. Ces mutations gain de fonction provoquent le syndrome de Cantu (notamment caractérisé par une hypertrichose congénitale et des anomalies cardiaques) [329]. Certains de ces patients ont développé une HTAP secondaire à ces anomalies. Au niveau cellulaire, nous n'avons pas trouvé de différence d'expression dans les CE-AP ou CML-AP de patients contrôles ou atteints d'HTAP [330]. *In vitro*, l'activation de SUR2 induit une diminution de la prolifération et de la migration. Nous avons également montré que l'activation pharmacologique de SUR2 induit une forte relaxation des AP d'humains et de rats, et l'activation *in vivo* réduit le développement de l'HTAP expérimentale. Au cours de ma thèse, j'ai contribué à ces résultats qui soulignent que l'activation pharmacologique de SUR2 peut être

considérée comme une cible thérapeutique d'intérêt pour les patients atteints d'HTAP.

#### 2.4.11.2 Les canaux chloriques

Certains canaux chloriques ( $\text{Cl}^-$ ) sont également impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP, notamment avec les canaux TMEM16A (aussi appelé anocatmine-1) et CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*).

TMEM16A, codé par le gène *ANO1*, fait partie avec TMEM16B des canaux  $\text{Cl}^-$  activé par le  $\text{Ca}^{2+}$ . TMEM16A est régulé directement par le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, mais aussi indirectement par son interaction avec la calmoduline [331]. L'activation de TMEM16A favorise la dépolarisation de la membrane et peut induire l'ouverture des CCDV (canaux calciques dépendants du voltage), provoquant l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et la contraction cellulaire [332]. Papp *et al.* ont démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm, de la présence de la protéine à la membrane ainsi que de la fonction de TMEM16A dans les CML-AP de patients atteints d'HTAPi [333]. Une seconde étude a permis de mettre en évidence une augmentation d'expression dans les CE-AP de patients atteints d'HTAP. La surexpression de TMEM16A dans les CE-AP contrôles induit une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , des stocks  $\text{Ca}^{2+}$  du RE et de l'influx SOCE. Cette surexpression entraîne l'augmentation de la prolifération, migration et de la capacité à former des tubes *in vitro* [334]. L'inhibition pharmacologique de TMEM16A par le benzbromarone et la sous-expression par siARN a repolarisé les CML-AP atteints d'HTAPi. De plus, chez les souris exposées à l'hypoxie chronique ou les rats exposés à la MCT, le traitement avec du benzbromarone a amélioré le remodelage vasculaire pulmonaire et la pression systolique du VD. L'hypertrophie du VD a été améliorée dans le modèle MCT, mais pas chez les souris exposées à l'hypoxie chronique. L'ensemble de ces résultats suggèrent que TMEM16A est une nouvelle cible thérapeutique important pour le traitement de l'HTAP.

CFTR est une protéine transmembranaire exprimée par les tissus épithéliaux, mais aussi les CE-AP, CML-AP et cardiomyocytes. C'est une protéine membranaire dépendante de l'AMPc ayant une activité régulée par l'ATP. CFTR permet le transport du  $\text{Cl}^-$  et du bicarbonate à travers la membrane plasmique. En 2019, Papp *et al.* ont mis en évidence une diminution de l'expression de CFTR dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP [333]. Récemment, mon équipe au laboratoire a également retrouvé cette diminution d'expression dans les CML-AP, mais aussi dans les CE-AP de patients atteints d'HTAP, ainsi que dans les AP de rats exposés à la MCT et à l'hypoxie chronique [335].

L'activation de CFTR induit une relaxation des AP de rats et des AP humaines et cette relaxation est diminuée dans les AP de patients atteints d'HTAP ou dans les AP de rats exposés à l'hypoxie chronique ou la MCT.

De plus, *in vivo*, l'inhibition chronique de CFTR induit une prolifération cellulaire dans l'endothélium et la média des AP, une néomuscularisation des vaisseaux ainsi qu'une augmentation de la pression systolique du VD. L'inhibition chronique de CFTR chez les rats exposés à la MCT a aggravé l'augmentation de la pression systolique du VD provoqué par la MCT. Chez les rats transgéniques avec une mutation de CFTR (F508delCftr), une néomuscularisation des vaisseaux pulmonaires est également retrouvée. De plus, il a été observé chez les patients atteints de mucoviscidose sévère (mutation F508delCFTR) une hypertrophie de la média et une fibrose intinale. Enfin, une seconde étude a démontré que l'inhibition de CFTR dans les CE humaines provoque un état pro-inflammatoire responsable d'une augmentation de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, suggérant un rôle similaire dans le développement de l'HTAP [336,337].

#### 2.4.11.3 Canaux calciques

De par son rôle de régulateur de la contraction, mais aussi de nombreux autres mécanismes cellulaires impliqués dans le remodelage vasculaire, l'homéostasie et la dynamique calcique sont primordiales dans le contexte physiologique et physiopathologique. Ce sujet est abordé dans la troisième partie de cette introduction (voir partie 3).

#### 2.4.11.1 Autres canaux membranaires

Quelques études se sont intéressées au rôle des canaux sodiques ( $\text{Na}^+$ ) sur le développement de l'HTAP. Geraci *et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'expression du SCN1B (*sodium channel subunit beta-1*), dans les poumons de patients atteints d'HTAPi [338]. Cette sous-unité  $\beta 1$  forme un canal  $\text{Na}^+$  dépendant du voltage pouvant jouer sur la vasoconstriction et le remodelage vasculaire observé dans l'HTAP.

En 2018, Gräl *et al.* ont identifié, chez des patients atteints d'HTAP, des variants dans le gène AQP1 codant pour la protéine membranaire aquaporine 1. La protéine aquaporine 1 (AQP1) transporte de l'eau à travers les cellules et peut réguler la migration et l'angiogenèse des CE. Les patients atteints d'HTAP avec un variant AQP1 sont plus jeunes au diagnostic que les patients atteints d'HTAPi [20]. L'analyse

structurale de la localisation de ces différents variants prédit que la plupart de ces variants sont situés dans des régions critiques pour la fonction du canal. L'hypoxie est connue pour augmenter l'expression de l'AQP1 dans les CML-AP, et son inhibition préserve les CML-AP de la migration induite par l'exposition à l'hypoxie [339]. L'inhibition de l'AQP1 a permis la réduction de l'HTAP induite par l'hypoxie chronique chez les souris [340]. De plus, la réduction de son expression par siARN induit une diminution la prolifération et la migration des CML-AP isolées de rats exposés au Sugen/hypoxie, suggérant une implication de l'AQP1 dans le remodelage vasculaire pulmonaire survenant dans l'HTAP [341]. Au niveau des CE-AP, la sous-expression de BMPRII par siARN induit une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine AQP1 et de la fonction d'AQP1 (par test de perméabilité à l'eau) [342]. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre l'implication d'AQP1 dans la pathogenèse de l'HTAP et déterminer son éventuel intérêt thérapeutique.

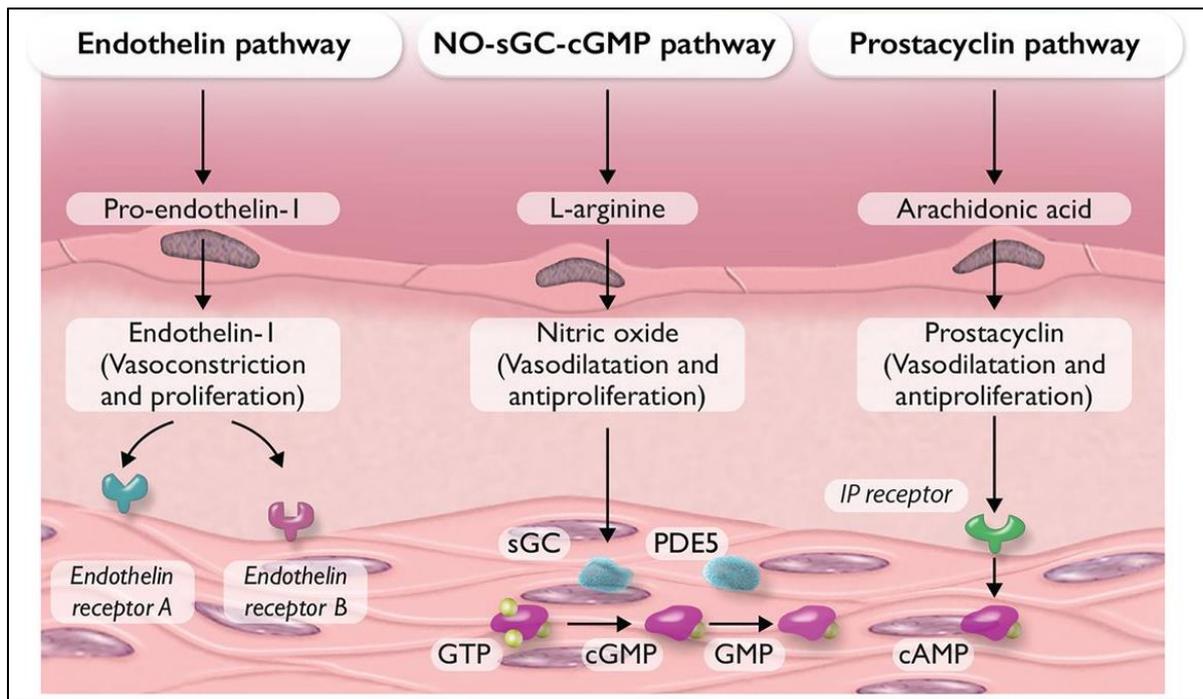
## 2.5 Traitements de l'HTAP

Les patients atteints d'HTAP sont classés en fonction de l'évaluation des risques selon différents facteurs pronostics et ils sont pris en charge selon une stratégie thérapeutique globale.

S'ils sont répondeurs au test de vasodilatation, les patients seront traités par les inhibiteurs de canaux calciques, tandis que les patients non répondants peuvent être traités par les thérapies spécifiques de l'HTAP. Ces thérapies agissent directement sur la dysfonction endothéliale en ciblant trois grandes voies (Figure 16) :

- La voie de l'endothéline, avec les antagonistes des récepteurs de l'endothéline
- La voie du NO avec les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 et les stimulateurs de la guanylate cyclase
- La voie des prostacyclines avec les analogues de la prostacycline et les agonistes des récepteurs de la prostacycline.

Actuellement, ces différentes thérapies sont principalement utilisées en combinaison, comme la bithérapie antagonistes des récepteurs à l'endothéline/inhibiteur de la PDE5, ou la trithérapie (ajout d'un analogue de la prostacycline) pour les patients avec une HTAP sévère, bien que les bénéfices à long terme ne sont pas toujours clairs [13].



**Figure 16 :** Voies de traitement actuel de l'HTAP [13]

### 2.5.1 Les bloqueurs des canaux calciques

Les patients atteints d'HTAP répondeurs au test de vasoréactivité aiguë sont de potentiels répondeurs au traitement avec les bloqueurs des canaux calciques. Ces inhibiteurs, communément appelés bloqueurs des canaux calciques, sont plus précisément des bloqueurs des canaux calciques dépendants du voltage de type L (voir partie 3.2.1.1). Ils permettent de réduire l'influx calcique activé par la dépolarisation membranaire et ainsi la vasoconstriction. Parmi les patients atteints d'HTAP idiopathique, héritable ou associée à des médicaments ou toxines, moins de 10 % peuvent recevoir ce traitement [13,343]. Il est observé un très bon taux de survie, une étude de 2005 montrant après 7 ans de traitement uniquement 1 décès dans le groupe des patients traités, contre 48 % de survie à 5 ans pour le groupe non traités aux bloqueurs de canaux calciques. En clinique, les bloqueurs les plus utilisés sont la nifédipine, le diltiazem ou l'amlodipine.

### 2.5.2 Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline-1

L'ET-1 est reconnue comme une voie importante de la pathophysiologie de l'HTAP, et le blocage de ces récepteurs par des antagonistes représente un moyen très efficace d'inhiber cette voie. L'action de l'ET-1 va favoriser la vasoconstriction et la prolifération des CML-AP. Ces antagonistes peuvent avoir une forte affinité pour les deux récepteurs ou être plus spécifiques de l'ET<sub>A</sub> ou de l'ET<sub>B</sub> [344]. Ces antagonistes sont une option

importante de traitement de l'HTAP depuis les années 2000 avec le bosentan, premier traitement de l'HTAP par voie orale, ciblant les deux récepteurs. Le second antagoniste approuvé est l'ambrisentan, bloquant préférentiellement l'ET<sub>A</sub> [345]. Par la suite, le macitentan, ciblant deux récepteurs comme le bosentan, a également été approuvé [346,347]. Le choix de l'inhibiteur est effectué en fonction des patients et de leurs antécédents, le bosentan pouvant avoir une toxicité hépatique, l'ambrisentan augmentant l'incidence d'œdème périphérique et le macitentan pouvant provoquer une diminution de l'hémoglobine. Le blocage sélectif des seuls récepteurs ET-A de l'endothéline ou le blocage non sélectif des récepteurs ET-A et ET-B ont montré une efficacité similaire dans l'HTAP.

### 2.5.3 Les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 et les stimulateurs de la guanylate cyclase

Le monoxyde d'azote stimule la guanylate cyclase soluble, entraînant ainsi la production du GMPc (Figure 16). Le GMPc, qui a une forte activité vasorelaxante, est dégradé par les phosphodiesterases, principalement la PDE5 dans les cellules vasculaires pulmonaires. Les thérapies disponibles actuellement visent donc soit la production soit la dégradation de GMPc et ne doivent pas être combinées, cela pouvant résulter en une hypotension systémique. Actuellement, deux inhibiteurs de la PDE5 sont approuvés, le Sildenafil et le Tadalafil [348,349]. Tous deux permettent une amélioration des symptômes et valeurs hémodynamiques ainsi que de la capacité d'exercice. Le troisième traitement est le Riociguat, qui va lui directement stimuler l'enzyme afin d'augmenter la production. Ce traitement démontre également une bonne efficacité avec une amélioration des paramètres hémodynamiques et de la capacité d'exercice [350].

### 2.5.4 Les analogues de la prostacycline et les agonistes des récepteurs de la prostacycline

Les analogues de la prostacycline et les agonistes des récepteurs de la prostacycline ont pour but d'induire une puissante vasodilatation des AP, d'inhiber l'agrégation plaquettaire et ont une activité antiproliférative. Ils ont pour but de rétablir la voie métabolique de la prostacycline, qui est dérégulée chez les patients atteints d'HTAP.

L'époprostenol, un analogue synthétique de la prostacycline, est un puissant vasodilatateur utilisé depuis 1995 et représente une des thérapies les plus efficaces.

Néanmoins, de par sa demi-vie courte, il nécessite une administration intraveineuse continue et peut se maintenir en solution pendant 48h [351].

Deux autres analogues de la prostacycline sont également approuvés. Le treprostinil, pouvant être distribué par voie sous-cutanée, intraveineuse, orale ou inhalé [352]. L'injection sous-cutanée de treprostinil améliore les symptômes, les valeurs hémodynamiques ainsi que la capacité d'exercice des patients (évaluée par le test de marche 6 minutes). Cependant, il est observé une douleur au point d'infusion pouvant mener à l'arrêt du traitement. Le traitement par voie inhalée a amélioré la capacité d'exercice des patients, tandis que le traitement par voie orale a montré des résultats mitigés, certaines études ne montrant pas d'amélioration de la capacité d'exercice. Le traitement par voie inhalée ou orale n'est pas approuvé en Europe. Sa stabilité permet son injection par des pompes implantables, mais avec comme effet secondaire une douleur au point d'injection. L'iloprost, chimiquement stable, peut être distribué par inhalation [353].

Le selexipag, quant à lui, est un agoniste sélectif du récepteur à la prostacycline. Il a une pharmacologie totalement différente de la prostacycline et est distribué oralement [354].

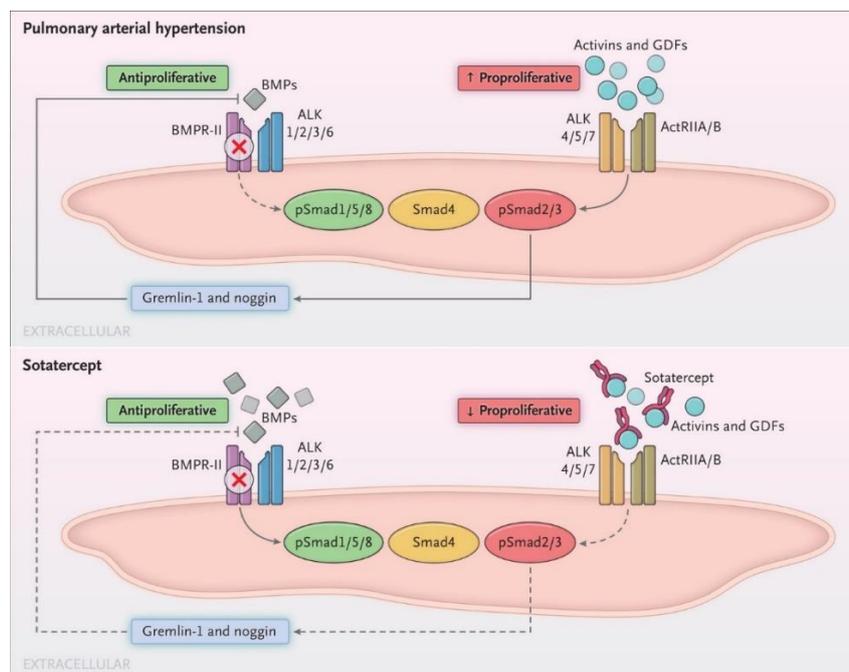
### 2.5.5 Nouveaux traitements (études cliniques de phase 3)

Malgré ces thérapies visant à restaurer l'équilibre de la balance des facteurs vasoactifs, l'HTAP reste une maladie incurable avec une forte mortalité et nécessitant de nouveaux traitements. Actuellement, deux nouvelles molécules sont en phase avancée de développement clinique (phase 3) : le ralinepag et le sotatercept.

Le ralinepag est un agoniste des récepteurs à l'endothéline avec une distribution orale. En phase 2, il a permis d'améliorer les résistances vasculaires pulmonaires des patients atteints d'HTAP après 22 semaines de traitement [355].

Le sotatercept est, lui, une protéine de fusion « *first-in-class* » comprenant le domaine extracellulaire du récepteur de l'activine humaine de type IIA lié au domaine Fc de l'immunoglobuline humaine G1. Il agit donc comme un piège à ligands pour les membres de la superfamille du TGF- $\beta$  (activines et GDF)(Figure 17). Cette thérapie prometteuse a permis une nette amélioration des conditions cliniques en phase 2 [356,357]. En phase 3, le traitement avec du sotatercept, par voie sous-cutanée (toutes les 3 semaines), de patients atteints d'HTAP et traités avec un traitement de fond stable a amélioré la capacité d'exercice. Une amélioration des huit critères secondaires,

comme les résistances vasculaires pulmonaires, le niveau de N-terminal pro BNP ont été observés. Les effets secondaires comprennent l'apparition de vertiges, saignements de nez ou l'augmentation du taux d'hémoglobine. Ce traitement offre la perspective d'avancée importante dans la prise en charge de l'HTAP. Le Sotatercept est en cours d'évaluation par les autorités de santé en vue d'une éventuelle autorisation de mise sur le marché.



**Figure 17 :** Mécanisme d'action proposé du sotatercept dans l'hypertension artérielle pulmonaire [356]

D'autres essais cliniques sont en cours afin de déterminer leur efficacité thérapeutique. Parmi-eux, le rodatristat, un inhibiteur de la TPH-1, l'enzyme permettant la synthèse de 5-HT est actuellement en phase II pour un traitement par voie inhalée (étude ELEVATE 2, NCT04712669). Le séralutinib inhalé, un inhibiteur des RTK ciblant le récepteur du PDGF, le récepteur du *colony-stimulating factor 1* et c-KIT est aussi en cours d'essai clinique (étude TORREY, NCT04456998). Les résultats de cette étude de phase 2 menée sur des patients en bi ou trithérapies sont en cours de publication, mais démontrent une amélioration des résistances vasculaires pulmonaires (critère principal) et des niveaux de N-terminal pro BNP. Seuls les patients les plus sévères ont eu une amélioration de la capacité d'exercice. Une autre étude clinique de phase 2b/3 est en cours, visant à évaluer l'efficacité thérapeutique de 3 doses d'imatinib inhalé en phase 2b sur les résistances vasculaires pulmonaires (phase 2b) et sur la capacité d'exercice (phase 3).

### 2.5.6 La transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire

Malgré les dernières avancées thérapeutiques, la transplantation pulmonaire reste l'unique option pour les patients atteints d'HTAP ne répondant pas au traitement thérapeutique ou lorsque le risque de décès est élevé ou lorsque les patients ont une MVOP/HCP héritable. Actuellement, la plupart des patients transplantés ont une transplantation bi-pulmonaire, les transplantations cœur-poumons étant réservées aux patients avec des atteintes cardiaques non opérables [358]. Une étude a montré que la survie médiane des patients atteints d'HTAP transplanté, ayant survécu au moins 1 an, était de 10 ans [359]. Cependant, cette stratégie reste limitée par la disponibilité des organes.

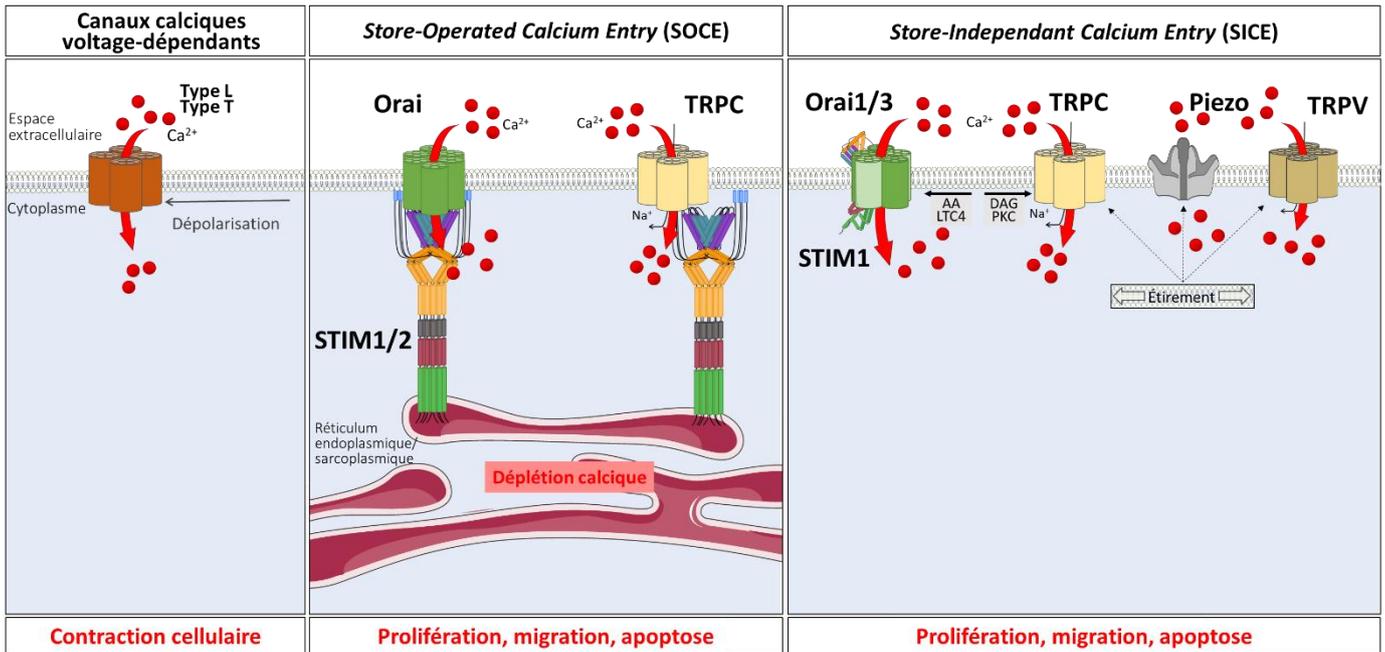
### 3 LE ROLE DE LA SIGNALISATION CALCIQUE DANS L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE

#### 3.1 Importance du maintien de l'homéostasie calcique

Chez les mammifères, la modulation spatio-temporelle de la  $[Ca^{2+}]_i$  constitue un mécanisme de transduction du signal pour tous les types de cellules, régulant un large éventail de fonctions cellulaires, notamment la contraction, la prolifération, la migration, la transcription des gènes, le métabolisme, l'apoptose et la mort cellulaire [360–362]. Les cellules doivent maintenir une  $[Ca^{2+}]_i$  constante d'environ 100 nM à 200 nM afin d'assurer la dynamique calcique en cas de signaux déclencheurs. Certaines organelles comme le RE/RS et les mitochondries agissent comme réserves de calcium, avec des concentrations variant entre 100 et 800  $\mu$ M, permettant une rapide diffusion du  $Ca^{2+}$  [363]. Les signaux intracellulaires de  $Ca^{2+}$  sont générés par la libération de  $Ca^{2+}$  à partir des réserves internes et/ou par l'entrée de  $Ca^{2+}$  à partir du compartiment extracellulaire par l'intermédiaire des canaux  $Ca^{2+}$ .

Dans les cellules de mammifères, y compris les cellules vasculaires pulmonaires, la signalisation calcique est régulée par 3 principaux influx provenant de la membrane plasmique, classés en fonction de la nature de leur activation (Figure 18) :

- Dépendants du voltage
- Indépendants du voltage, mais dépendants des stocks de  $Ca^{2+}$  du RE/RS (SOCE)
- Indépendants du voltage et indépendants des stocks de  $Ca^{2+}$  du RE (*Store-Independent  $Ca^{2+}$  Entry*, SICE)



**Figure 18** : Entrée calcique dans une cellule de mammifère : les canaux calciques dépendants du voltage, Store-Operated Calcium Entry (SOCE) et Store-Independent Calcium Entry (SICE)

Les canaux visibles sur cette figure ne sont pas exhaustifs. D'autres canaux participent également, comme les canaux TRPM, ASIC (acid sensing ion channel), récepteurs N-méthyl-d-aspartate (NMDAR) ou Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor (CaSR)

## 3.2 Les influx calciques dans l'artère pulmonaire

### 3.2.1 Les influx calciques dépendants du voltage

Les CCDV sont un groupe de canaux de la membrane plasmique présents dans de nombreux types cellulaires. Durant les années 1970 à 1980, les avancées en patch-clamp et en pharmacologie ont permis la découverte de ces différents canaux [364–366]. Les travaux effectués les années suivantes ont permis l'identification des six différents types de CCDV (sous-type L, T, N, P/Q, R) en fonction de leur distribution cellulaire/tissulaire, propriété pharmacologique et électrophysiologique (conductance, activation par le voltage, cinétique d'ouverture et de fermeture).

Dans les cellules de l'artère pulmonaire, ce sont principalement les canaux de type L et T qui sont exprimés.

#### 3.2.1.1 Canaux calciques dépendants du voltage de type L

Les CCDV de type L (CCDV-L), aussi appelé *high voltage-activated* ou CaV1, nécessitent une dépolarisation pour l'activation (potentiel de membrane d'environ -10 mV dans les CMLV) [367]. Tout comme les autres CCDV, ils sont composés de 5 sous-unités ( $\alpha$ 1,

$\alpha 2/\delta$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ). Ces sous-unités sont organisées autour de la sous-unité  $\alpha 1$  formant le pore à travers la membrane plasmique. Cette sous-unité est formée de six hélices  $\alpha$  transmembranaires contenant chacune un segment sensible au voltage. Le pore est formé par les segments S6, qui contient les sites bloqués par les antagonistes des CCDV-L [368]. Quatre sous-types de CCDV-L ont été identifiés, différenciés par leur unité  $\alpha 1$  : CaV1.1, CaV1.2 CaV1.3, CaV1.4. Dans les CML-AP, le Cav1.2 est reconnu comme étant le plus impliqué dans la modification de la  $[Ca^{2+}]_i$  suite à une dépolarisation [369].

Concernant la physiopathologie de l'HTAP, McMurtry *et al.* ont mis en évidence, dans les CML-AP de rats exposés à l'hypoxie chronique, une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  principalement provoqué par une augmentation des CCDV-L, associée à la prolifération cellulaire et vasoconstriction [370]. Il a également été démontré que l'ET-1, dérégulée dans l'HTAP, pouvait activer les CCDV-L par la PKC [371]. En outre, l'inhibition des CCDV-L par des bloqueurs de canaux calciques (voir partie 2.5.1 ) peut être utilisée comme traitement à long terme pour les patients atteints d'HTAP qui répondent positivement à un test de vasodilatation aiguë.

### 3.2.1.2 Canaux calciques dépendants du voltage de type T

Les CCDV de type T (CCDV-T), aussi appelé *low voltage-activated* ou Cav3, nécessitent une plus faible dépolarisation (potentiel de membrane d'environ -30 mV dans les CMLV) que les CCDV-L pour s'activer [372]. Ils ont une structure similaire aux CCDV-L, avec 5 sous-unités organisées autour de  $\alpha 1$ . Il existe 3 isoformes de sous unités  $\alpha 1$ , formant les canaux Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3. Seuls Cav3.1 et Cav3.2 sont exprimés dans les cellules d'AP, Cav3.3 étant essentiellement cardiaque.

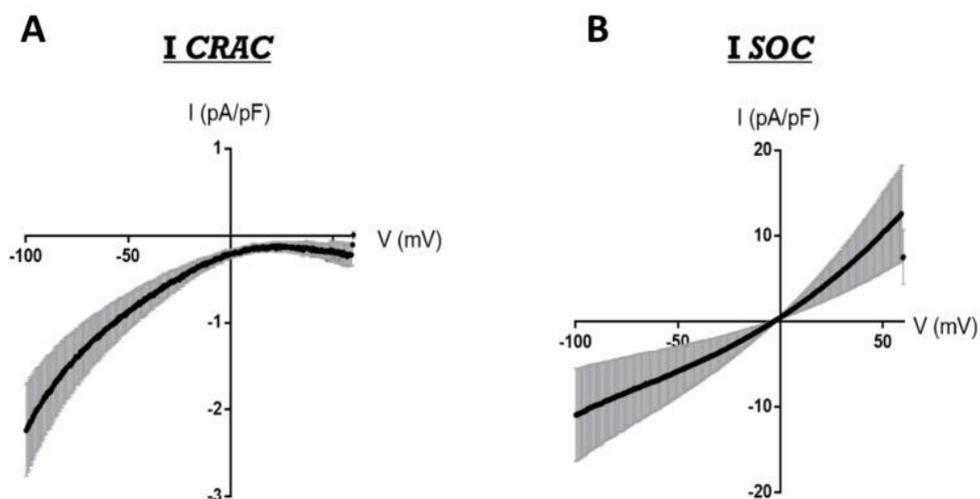
L'expression de Cav3.2 est augmentée dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP ainsi que dans les modèles d'HTAP par hypoxie chronique [373,374]. Dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP, l'équipe a également été mis en évidence que les CCDV-T régulent la prolifération via l'activation des protéines phosphatase 2A et donc l'activation de voie de signalisation incluant ERK1/2, P38 et Akt1 [108,373]. De plus, une dépolarisation des CML-AP est observée dans les modèles d'hypoxie chronique et MCT pouvant être à l'origine d'une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  via par l'activation des CCDV-T (2.4.11 ). Les CCDV-T sont également présents dans l'endothélium des AP, où ils participent à la vasoconstriction et la relaxation médiée par l'acétylcholine [375,376].

## 3.2.2 Store-operated $\text{Ca}^{2+}$ Entry (SOCE)

### 3.2.2.1 Découverte et généralités

L'une des voies principales d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule se fait par les canaux SOCs, responsable du SOCE. La première observation du SOCE a été effectuée par Putney en 1986, dans des cellules non excitables, où il a découvert qu'un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire était couplé à une déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$  du RE [377]. Ce mécanisme serait essentiel pour reformer les stocks calciques intracellulaires, le  $\text{Ca}^{2+}$  rentrant ensuite dans le RE par l'activité de la SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*). Quelques années plus tard, dans les mastocytes, Hoth et Penner ont apporté la preuve que la SOCE est en partie médiée par des courants  $\text{Ca}^{2+}$  appelés courants  *$\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  current* ( $I_{\text{CRAC}}$ ) [378]. L' $I_{\text{CRAC}}$  est décrit comme un courant  $\text{Ca}^{2+}$  entrant, non activé par le voltage, avec une forte rectification entrante, un potentiel d'inversion supérieur à +50 mV et une forte sélectivité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 19A). L' $I_{\text{CRAC}}$  est régulé par une boucle de rétroaction empêchant l'afflux excessif de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule, appelé inactivation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  [378,379]. Cette inactivation est décomposée en inactivation lente et rapide.

Pendant une certaine période, le candidat moléculaire proposé pour le canal SOC a été les canaux TRPC. Néanmoins, il est apparu que les propriétés électrophysiologiques (voir partie 3.2.2.4.3 ) des canaux TRPC ne correspondent pas au  $I_{\text{CRAC}}$ . Effectivement, les canaux TRPC forment un courant non sélectif, à rectification sortante, avec un potentiel d'inversion proche de 0 mV, appelé  $I_{\text{SOC}}$  (Figure 19B).



**Figure 19** : Comparaison entre  $I_{\text{CRAC}}$  et  $I_{\text{SOC}}$  dans des cellules HEK transfectées avec STIM1 + Orai1

Pendant presque deux décennies, l'identité moléculaire du SOCE est restée incertaine. Cependant, l'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis d'identifier les molécules responsables du SOCE. En 2005-2006, deux acteurs majeurs et ubiquitaires du SOCE ont été identifiés : le senseur de calcium du RE, STIM1 (*stromal interacting molecule*) et le canal  $\text{Ca}^{2+}$  Orai1 activé par STIM1 [380–382]. C'est en 2005 que Roos et ses collègues, grâce à un criblage siARN mené dans des cellules de drosophile, identifie la protéine STIM1 comme acteur commun au  $\text{I}_{\text{CRAC}}$  et  $\text{I}_{\text{SOC}}$  [380]. Cette découverte a été confirmée deux mois après par Liou et ses collègues, démontrant que les protéines STIM agissent comme senseurs des réserves calciques du RE [381]. En 2006, Feske *et al.* ont décrit l'absence d' $\text{I}_{\text{CRAC}}$  sur des cellules T isolées de patients atteints du syndrome SCID (*severe combined immunodeficiency*) [383]. En séquençant l'ADN génomique de patients atteints du SCID, ils ont identifié des mutations perte de fonction de *ORAI1*, identifiant dans le même temps Orai1 comme l'archétype du  $\text{I}_{\text{CRAC}}$  [382]. Par la suite, Zhang *et al.* ont confirmé que Orai1 est le canal principal responsable du  $\text{I}_{\text{CRAC}}$ , ce qui a été très rapidement confirmé par d'autres études [384–387].

Il est maintenant reconnu, dans plusieurs types de cellules, qu'en plus de l'activation du canal  $\text{Ca}^{2+}$  Orai, les protéines STIM activent, de manière directe ou indirecte, les canaux TRPC, qui sont des canaux cationiques non sélectifs mais perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ . Au cours des dernières années, le SOCE a été décrit dans une grande variété de types cellulaires et son implication dans de nombreux processus cellulaires en fait une cible thérapeutique potentielle pour différentes pathologies [388].

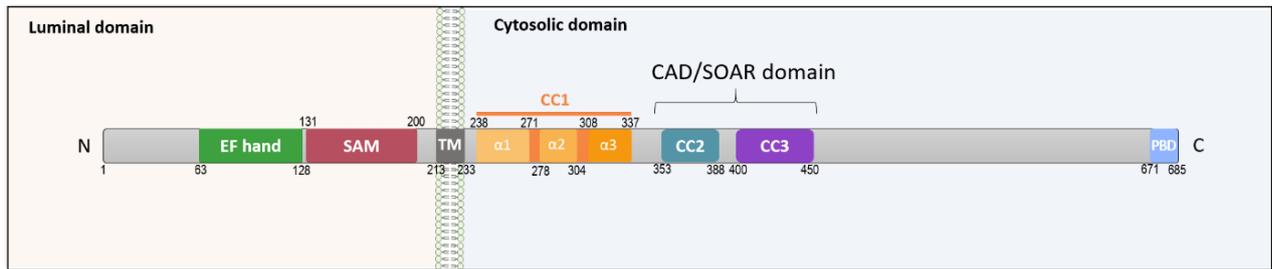
### 3.2.2.2 STIM : senseur de calcium du réticulum endoplasmique

Le lien entre la déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$  du RE et l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  a été résolu avec la découverte de STIM1 [380,381]. STIM1 est une protéine retrouvée en grande majorité dans le RE, bien qu'il soit retrouvé quelque protéines formant un *pool* au niveau de la membrane plasmique. STIM1 est capable de détecter les variations de  $[\text{Ca}^{2+}]$  réticulaire et d'activer les canaux Orai et TRPC.

#### 3.2.2.2.1 Structure

STIM1 est formé de 685 acides aminés. Cette protéine est constituée d'une partie luminale N-terminale, qui contient notamment un domaine *EF hand* liant le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une affinité d'environ 200  $\mu\text{M}$ , permettant de détecter les variations de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE (Figure 20) [389–392]. Ce domaine *EF hand* précède le domaine SAM

(sterile alpha motif), qui entraîne l'oligomérisation de STIM1 suite à la diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE [390,393,394].



**Figure 20 :** Topologie et organisation des domaines clés de STIM1

Cette partie luminaire est suivie d'un segment transmembranaire (TM), potentiellement impliqué dans le changement de conformation de STIM lors de la déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$  du RE [17]. La partie cytosolique de STIM1 est composée de trois domaines *coiled-coil* (CC1, CC2 et CC3). L'interaction structurelle entre ces trois domaines CC est nécessaire à l'allongement de STIM1 pendant son activation [395–397]. Les domaines CC2 et CC3 font partie de la région activatrice du canal Orai1, appelée SOAR (*STIM1–Orai1-activating region*, entre les acides aminés 342 et 448), ou CAD (*CRAC-activating domain*, entre les acides aminés 344 et 442) [398–400]. Ce domaine contrôle le couplage et ainsi l'activation du canal Orai1. À l'extrémité cytosolique de STIM, un domaine polylysine chargé positivement permet l'interaction électrostatique entre les STIM et les canaux TRPC. La partie cytosolique COOH se termine par un domaine polybasique (PBD). Celui-ci permet l'interaction avec les phospholipides chargés négativement de la membrane plasmique, assurant ainsi l'accumulation de STIM en puncta à la jonction entre la membrane plasmique et le RE [401]. Au contraire, lorsque les stocks en  $\text{Ca}^{2+}$  du RE sont remplis, STIM1 conserve une conformation inactivée et se localise sur toute la membrane du RE. Dans cette conformation, STIM1 est capable de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  avec son domaine EF hand-SAM. Cette conformation inactivée de STIM1 empêche son activation spontanée puisque le domaine CC1 est associé à CAD-SOAR [402].

#### 3.2.2.2.2 Isoformes de STIM

La famille STIM est également composée de STIM2, formé de 746 acides aminés qui présente une forte homologie de séquence avec STIM1 avec quelques différences au niveau des parties N- et C-terminales [389]. STIM2 est plus sensible aux changements de  $[\text{Ca}^{2+}]$  du RE en raison de sa plus faible affinité pour  $\text{Ca}^{2+}$  (environ 500  $\mu\text{M}$ ) et a ainsi besoin d'un niveau plus faible de déplétion des réserves pour son activation [403–405]. De ce fait, il est majoritairement localisé aux jonctions ER-PM afin de répondre aux

petites variations de  $[Ca^{2+}]$  réticulaire et ainsi maintenir l'homéostasie calcique basale du cytosol et du RE.

Au fil des ans, quelques variants supplémentaires ont été découverts pour STIM1 et STIM2. En effet, STIM1 long (STIM1L) a été décrit comme le produit d'un épissage alternatif de l'exon 11. STIM1L possède un ajout de 106 acides aminés dans la région C-terminal. Darbellay *et al.* ont mis en évidence la formation de *cluster* linéaire entre STIM1L et Orai1, même lorsque les réserves de  $Ca^{2+}$  du RE sont complètes. Ces *clusters* ne sont pas retrouvés avec STIM1 classique. Ces *clusters* sont provoqués par la présence d'un domaine de liaison à l'actine situé après le CAD/SOAR dans la partie supplémentaire de STIM1L, permettant l'interaction entre STIM1L et les fibres d'actine. Dans les cellules musculaires squelettiques, STIM1L a une activation plus rapide que STIM1, associée à une activation rapide du SOCE, très probablement en raison de ces *clusters* déjà formés [406]. Par ailleurs, il est normalement observé une augmentation du RE cortical (à proximité de la membrane plasmique) après déplétion des stocks du RE des cellules exprimant STIM1, ce qui n'est pas retrouvé avec STIM1L. Dans des cellules HEK, il a été observé que le SOCE induit par STIM1L est plus important comparé au SOCE induit par STIM1 classique. Cela a été confirmé dans les fibroblastes de souris [407]. Dans les myotubes humains, il a été mis en évidence que STIM1L interagissait physiquement avec TRPC1 et TRPC4 après une déplétion des réserves du RS et que la sous-expression par siARN de STIM1L, TRPC1 ou TRPC4 provoquait une diminution du SOCE et de sa cinétique, démontrant leur implication dans le SOCE [408]. Il a également été montré que STIM1L permettait une meilleure activation de TRPC1 que STIM1 classique, mais une moins bonne activation d'Orai1 [409].

Il a également été mis en évidence un variant d'épissage spécifique au neurone : STIM1B. Ce variant est provoqué par l'insertion de l'exon 13B, ce qui provoque une protéine plus courte de 145 acides aminés. Spécifiquement localisé dans le RE présynaptique, STIM1B active lentement la SOCE et réduit l'inactivation  $Ca^{2+}$ -dépendante de  $I_{CRAC}$  [410].

Concernant les variants de STIM2, il existe STIM2.1 (ou STIM2 $\beta$ ) et STIM2.3, sachant que le STIM2 classique (connu pour activer la SOCE) est appelé STIM2.2 ou STIM2 $\alpha$ . STIM2.1, formé de 754 acides aminés, a une séquence supplémentaire insérée dans le domaine CAD/SOAR ne lui permettant pas de se lier à Orai1. Cependant, STIM2.1 est toujours capable de colocaliser avec Orai1, sans pouvoir se lier et l'activer. Cependant, il peut se lier avec STIM1 ou STIM2.2 et ainsi réguler négativement la SOCE [411,412].

STIM2.3, lui, contient un exon 13 alternatif conduisant à une fin de traduction plus tôt que STIM2.2, mais il n'est pas connu beaucoup plus d'informations sur ce variant.

### 3.2.2.3 Le canal calcique Orai

#### 3.2.2.3.1 Isoforme du canal calcique Orai

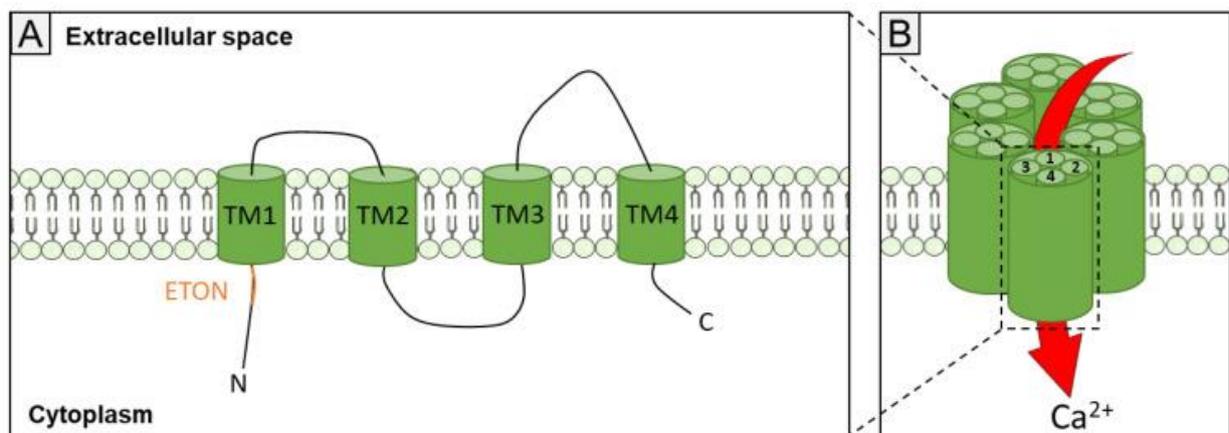
La famille des canaux Orai, aussi appelé CRACM1 (*calcium release-activated calcium modulator 1*) ou TMEM142A (transmembrane 142A), se compose de trois membres : Orai1, Orai2 et Orai3. Ces trois membres sont largement exprimés chez l'humain et peuvent constituer un courant  $I_{CRAC}$  fonctionnel [413]. La co-expression de STIM1 et de Orai2 ou Orai3 induit des courants similaires à ceux de  $I_{CRAC}$  induit par Orai1, avec de petites différences dans la sélectivité et l'inactivation [414,415]. Effectivement, le canal Orai3 est plus perméable aux cations monovalents comme le  $Na^+$  et possède une inactivation dépendante du calcium (*Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation*, CDI) rapide plus importante (voir partie 3.2.2.5 ) [416]. Le canal Orai2, lui, ne possède pas d'inactivation lente [417].

Chez l'Homme, Orai1 possède deux isoformes fonctionnelles : la forme longue Orai1 $\alpha$ , d'environ 33 kDa, et la forme courte Orai1 $\beta$ , d'environ 23 kDa, résultant d'un site alternatif d'initiation de la traduction [418,419]. Les deux formes d'Orai1 sont capables d'induire l'ICRAC et la participation de chacun au SOCE dépend des cellules [419]. Fukushima *et al.* ont suggéré qu'en perdant un domaine de liaison aux phospholipides, la mobilité membranaire d'Orai1 $\beta$  est augmentée. De plus, les 63 acides aminés supplémentaires présents sur Orai1 $\alpha$  contiennent des régions permettant l'interaction entre Orai1 et des partenaires comme la cavéoline pouvant induire une distribution le long de la membrane plasmique différente [420]. Lorsque les réserves calciques du RE se vident, en plus de la forte présence de canaux Orai1 à la membrane plasmique, quelques canaux Orai1 sont insérés à la membrane à partir d'un compartiment endosomal. Récemment, Jardin *et al.* ont suggéré une interaction entre les deux formes d'Orai1 au sein de ce compartiment endosomal. L'étude de Jardin *et al.* a montré que le *trafficking* des deux formes d'Orai1 à la membrane était permis par Orai1 $\alpha$  et que Orai1 $\beta$  seul ne pouvait pas s'insérer dans la membrane cellulaire, suggérant une interaction fonctionnelle entre ces deux formes [420]. En outre, uniquement Orai1 $\alpha$  est capable de réaliser un influx SICE (voir partie 3.2.3.1 ).

#### 3.2.2.3.2 Structure

Le canal Orai1 présente une structure hexamérique, telle que définie par la structure

cristalline de *Drosophila melanogaster* Orai [421]. Cette architecture est formée de six sous-unités Orai1 provenant de trois dimères (Figure 21). Chacune d'entre elles contient un assemblage de quatre hélices  $\alpha$  transmembranaires (TM1-TM4). Cet arrangement se fait autour d'un point central : le pore ionique. Les 6 sous-unités TM1 tapissent le pore ionique. Les extrémités N et C se trouvent dans le cytosol et contiennent les sites de liaison pour la protéine STIM, notamment avec l'extension de la région transmembranaire Orai1 N-terminal (*extended transmembrane Orai1 N-terminal*, ETON). Cette région va permettre l'interaction avec la région SOAR de STIM1 [422].



**Figure 21** : Topologie du canal calcique Orai1 et domaine d'interaction avec STIM1

#### 3.2.2.3.3 Propriétés biophysiques

Les premiers enregistrements du  $I_{CRAC}$  ont décrit un courant rectifiant entrant, très sélectif pour le  $Ca^{2+}$  (avec un potentiel d'inversion supérieur à 40mV), indépendant du voltage et avec une faible conductance [378]. En effet, la conductance unitaire extrêmement faible du canal (10-35 fS) rend l'enregistrement d'un seul canal ou d'un courant Orai1 endogène très difficile dans la plupart des types cellulaires [423]. Des études de mutagenèse dirigée ont ensuite révélé que le TM1 et la boucle extracellulaire entre TM1 et TM2 contiennent des résidus chargés négativement (E106, D110, D112, D114) conférant au canal sa haute sélectivité au  $Ca^{2+}$ . De plus, un résidu d'acide glutamique dans TM3 (E190) détecte les variations de pH externe tandis que trois cystéines dans TM2 et TM3 (C126, C143, C195) agissent comme des capteurs d'oxydation [424–426].

#### 3.2.2.3.4 Pharmacologie

Depuis la découverte des canaux Orai, plusieurs molécules ont été mises au point afin

de moduler sélectivement l'influx de calcium intracellulaire. Une des premières molécules testées fut le YM-58483 ([N-{4-[3,5-bis(Trifluorométhyl)-1H-pyrazol-1-yl]phényl}-4-méthyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide]), aussi appelé BTP2, un dérivé pyrazole dont sont issus différents inhibiteurs (Tableau 4).

**Tableau 4** : Inhibiteurs d'Orai1

Composé	Mode d'action	IC50	Effets secondaires	Références
YM-58483 (BTP2 ou Pyr2)	-	10–590 nM	Inhibe TRPC3 et -C6 (IC50: 0,3 µM) ; Active TRPM4 (EC50: 8 nM) ; Inhibe Orai2 et Orai3 à 10 µM	[427–432]
GSK7975A and GSK-5503A	Effet potentiellement allostérique sur le filtre de sélectivité d'Orai	4 µM	Inhibe Orai2 et Orai3 à 10 µM, CCDV-L (IC50: 8 µM), et TRPV6	[432,433]
CM4620		120 nM	Inhibe Orai2 (IC50: 900 nM)	[434]
Synta-66	Se lie aux hélices TM1 et TM3 et aux segments de la boucle extracellulaire	26 nM-3 µM	Potentilise Orai2 à 10 µM	[432,435–438]
JPIII	-	244 nM	-	[439]
Gd <sup>3+</sup> ou La <sup>3+</sup>	Se lie à la boucle extracellulaire d'Orai1	200 nM	Inhibe Orai2/3	[432,440]
AnCoA4	Se lie à l'extrémité C-terminale d'Orai1	880 nM	-	[441]
5J-4	-	10 µM	-	[442]

### 3.2.2.4 Les canaux transient receptor potential canonical (TRPC)

#### 3.2.2.4.1 Isoformes des canaux TRPC

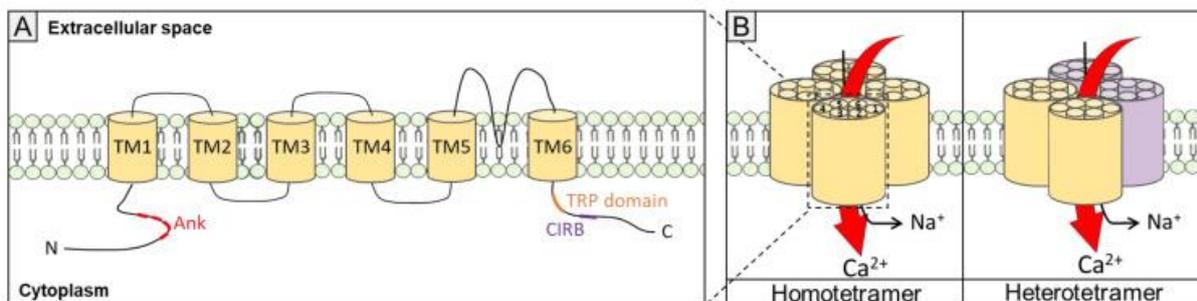
La superfamille des canaux transient receptor potential (TRP) est subdivisée en sept sous-familles distinctes en fonction de leur homologie de séquence : TRPC (canonique), TRPV (vanilloïde), TRPM (mélastine), TRPA (ankyrine), TRPP (polycystine), TRPML (mucolipine) et TRPN (drosophila no mechanoreceptor potential C (NOMPC)) [404,405].

La famille TRPC peut être divisée, à partir de leurs caractéristiques fonctionnelles et

séquences d'acides aminés, en quatre sous-groupes : TRPC1 ; TRPC3, -C6, -C7 ; TRPC4, -C5 ; et TRPC2, qui est un pseudogène chez l'Homme [443]. Malgré une structure relativement analogue, les différentes isoformes diffèrent de par leur sélectivité, conductance, ou mécanisme d'activation.

#### 3.2.2.4.2 Structure

Sur le plan structurel, les canaux TRPC sont relativement analogues [444,445]. Ils peuvent former des hétérotétramères ou des homotétramères. Chaque sous-unité TRPC est constituée de six domaines transmembranaires avec un pore ionique formé entre TM5 et TM6 (Figure 22). Le domaine cytosolique N-terminal comporte quatre à cinq répétitions d'ankyrine permettant les interactions protéine-protéine [446,447]. Du côté C-terminal, le domaine TRP est une région bien conservée dans toutes les TRPC, essentielle pour le fonctionnement du canal. Il est suivi par le site de liaison calmoduline/récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (CIRB). La liaison de la calmoduline s'effectue de manière dépendante du  $Ca^{2+}$  [448,449]. Ce domaine est également nécessaire à l'adressage du canal, un adressage incorrect de TRPC3 ayant été observé lorsque la région CIRB a été supprimée [450].



**Figure 22** : Topologie des canaux TRPC et principaux domaines

#### 3.2.2.4.3 Propriétés biophysiques

Les canaux TRPC sont pour la plupart sélectifs au  $Ca^{2+}$  et au  $Na^{+}$  (Tableau 5) [451]. Les canaux TRPC sont à l'origine d'un courant non sélectif avec un potentiel d'inversion entre 0 et 10 mV. Celui-ci est différent du courant  $I_{CRAC}$  formé par le canal Orai, dû aux propriétés électrophysiologiques des canaux TRPC.

**Tableau 5** : Propriétés électrophysiologiques des canaux TRPC

Canal	Sélectivité P <sub>Ca</sub> /P <sub>Na</sub>	Conductance (pS)	Références
TRPC1	1	16	[452–454]
TRPC2	2.7	42	[455]
TRPC3	1.6	66	[456–460]
TRPC4	1.1–7.7	42	[461–463]
TRPC5	1.8–9.5	63	[461,463,464]
TRPC6	5	35	[455,465,466]
TRPC7	1.9	25–50	[457,467,468]

Cependant, les canaux TRPC peuvent aussi former des hétérotétramères. Ces hétérotétramères ont des propriétés distinctes des homotétramères, formant une forte diversité dans les propriétés biophysiques de ces canaux.

#### 3.2.2.4.4 Pharmacologie

En raison des similarités structurelles entre les différentes isoformes, il existe peu ou pas d'inhibiteurs spécifiques des canaux TRPC (Tableau 6). Les travaux de recherche effectués avec ces inhibiteurs, notamment *in vivo*, doivent donc tenir compte de ces inconvénients.

**Tableau 6** : Inhibiteurs des canaux TRPC

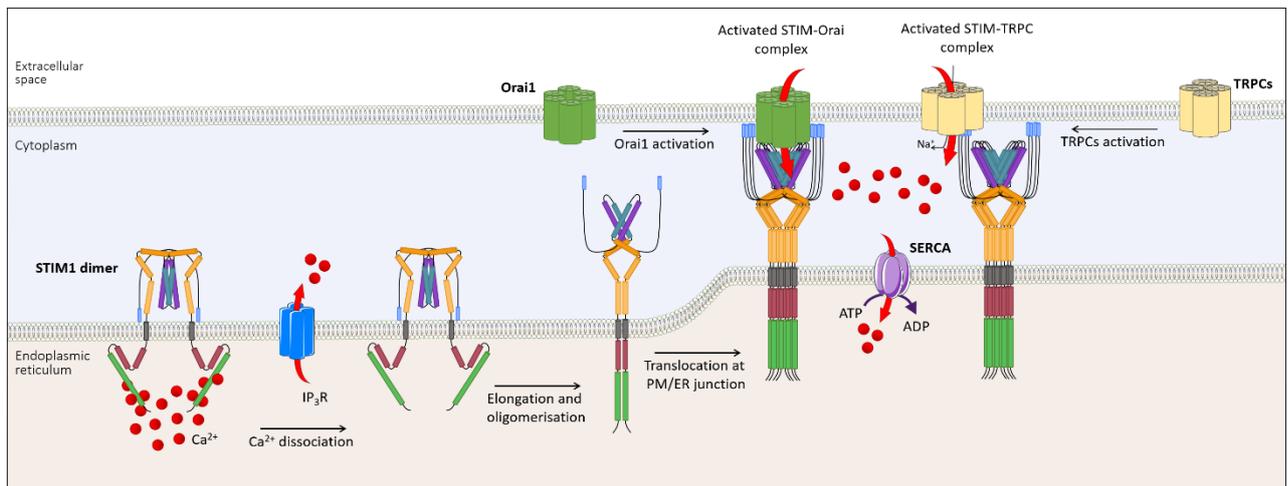
Composé	Mode d'action	IC50	Effets secondaires	Références
<b>TRPC3</b>				
<b>Pyr3</b>	Liaison directe	0.7 µM	Inhibe Orai1 et TRPC6 à 3 µM	[431,469]
<b>Pyr10</b>	-	0.72 µM	-	[431]
<b>TRPC4</b>				
<b>ML-204</b>	-	1–3 µM	Inhibe TRPC5 et faiblement TRPC6	[470]
<b>HC-070</b>	Liaison directe	9.3 nM	Inhibe TRPC4 (IC50:46 nM) et TRPC3 (IC50: 1 µM)	[471,472]
<b>HC-608 (Pico145)</b>	-	0.35 nM	Inhibe TRPC5 (IC50: 1.3 nM), le complexe TRPC1-4 (IC50: 0.03 nM) et le complexe TRPC1-5 (IC50: 0.2 nM)	[473]

TRPC5				
<b>AC1903</b>	-	13.6 $\mu$ M	Inhibe TRPC4 (IC50 > 100 $\mu$ M)	[474]
<b>GFB-8438</b>	Liaison directe	0.18 $\mu$ M	Inhibe TRPC4 (IC50: 0.29 $\mu$ M)	[475,476]
TRPC6				
<b>SAR7334</b>	-	9.5 nM	Inhibe TRPC3 (IC50: 282 nM) et TRPC7 (IC50: 226 nM)	[477]
<b>GSK2833503</b>	-	3 nM	Inhibe TRPC3 (IC50: 21 nM)	[478,479]
<b>BI 749327</b>	-	19 nM	-	[480]
<b>SH045</b>	-	7.9 nM	Inhibe TRPC3 (IC50: 282 nM) et TRPC7 (IC50: 226 nM)	[481]
<b>AM-1473</b>	Liaison directe	0.22 nM	-	[482]
Non sélectif				
<b>SKF-96365</b>	-	10 $\mu$ M	Inhibe les CCDV-T (IC50 560 nM pour Cav3.1)	[483,484]

### 3.2.2.5 Mécanisme du SOCE

L'influx SOCE commence par la déplétion des réserves de calcium du RE/RS : un des mécanismes physiologiques le plus connu est l'activation de la PLC via des récepteurs couplés à la protéine G, avec la génération d'inositol 1,4,5-triphosphate et l'activation du récepteur IP<sub>3</sub> [485,486]. Après déplétion du Ca<sup>2+</sup> dans le RE/RS, le côté luminal de STIM1 se réarrange par oligomérisation du domaine SAM [393]. Cette association induit la modification du domaine transmembranaire, conduisant à la libération de CAD-SOAR, une oligomérisation rapide de STIM1 par le domaine CC3 et donc à une translocation vers la jonction entre la membrane plasmique et le RE, formant ainsi des *puncta* (Figure 23) [487]. Ces *puncta* ainsi formés font partie d'une restructuration du RE durant le SOCE. En effet, ces *puncta* sont formés au sein d'un compartiment du RE appelé RE cortical car ils se localisent au niveau du cortex (sur la face interne de la membrane plasmique) des cellules [488]. Le nombre et la longueur de ces structures juxtaposées à la membrane plasmique augmentent en cas de déplétion des réserves du RE. La stœchiométrie Orai1-STIM1 est aussi un déterminant important pour l'activation du canal. Il a été démontré qu'un à deux STIM1 pouvaient piéger Orai1, mais que huit STIM1 pour chaque canal Orai1 (6 sous-unités) sont nécessaires pour activer ces canaux de manière optimale. À des niveaux élevés d'expression d'Orai1,

l'amplitude du SOCE peut diminuer [489]. Une étude plus récente a démontré que toutes les sous-unités d'Orai1 doivent être liées à STIM1 afin d'obtenir un courant optimal, indiquant au minimum 6 protéines STIM pour une activation optimale d'Orai1 [490]. Une fois l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  effectuée, les réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ER/SR se remplissent grâce à l'activité de la pompe SERCA située au niveau de la membrane de l'ER/SR. Dans le même temps, le  $I_{\text{CRAC}}$  est régulé par la CDI.



**Figure 23 :** Mécanisme d'activation du *store operated calcium entry* (SOCE)

Cette inactivation  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante se décompose en deux différentes phases : une diminution du courant rapide (*Fast CDI*), de l'ordre de la milliseconde, et une plus lente (*Slow CDI*), de l'ordre de la seconde à la minute [379]. Il a été proposé que le *Fast CDI* soit médié par l'accumulation d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  à proximité du pore intracellulaire du canal, exerçant ainsi une rétroaction négative directe sur le courant. La *Slow CDI*, elle, serait plus en réponse à la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la présence d'EGTA en intracellulaire empêchant la *Slow CDI*. Les protéines régulatrices du SOCE peuvent faciliter cette inactivation.

### 3.2.2.6 Partenaires régulateurs du SOCE

Depuis l'identification des acteurs du SOCE, plusieurs protéines ont été décrites pour réguler le SOCE. Parmi ces protéines, certaines ont été décrites comme renforçant ou facilitant le SOCE. C'est notamment le cas de *CRAC regulator 2A* (*CRACR2A*, codée par le gène *EFCAB4B*), qui est exprimé dans le cytoplasme avec une affinité pour Orai1 et STIM1 [491]. Elle a été décrite en 2010, dans les lymphocytes T et semble jouer un rôle de stabilisation du complexe STIM1-Orai1 par une interaction directe avec les deux protéines. En effet, la sous-expression de *CRACR2A* par siARN diminue le regroupement (*clustering*) de STIM1 et Orai1 à la membrane, ce qui est corrélé avec une diminution du SOCE, tandis que sa surexpression induit une augmentation du

SOCE. CRACR2A est composé d'un domaine EF-hand, une partie riche en leucine et un domaine CC, lui permettant d'interagir avec STIM1 et Orai1 en fonction de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Une autre protéine cytosolique interagissant directement avec STIM1 et Orai1 est l' $\alpha$ -SNAP ( *$\alpha$ -soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein*). En effet, outre son rôle de protéine de fusion, Miao *et al.* ont mis en évidence que la sous-expression de  $\alpha$ -SNAP diminue fortement le SOCE sans modifier les *clusters* STIM1-Orai1. L'interaction entre  $\alpha$ -SNAP et STIM1 semble s'effectuer par le domaine CAD/SOAR de STIM1 tandis que l'interaction avec Orai1 semble se faire par la partie C-terminale. Les études sur le rôle d' $\alpha$ -SNAP semblent également démontrer l'importance de la protéine pour l'activation d'Orai1 [492].

Homer1 (*Homer scaffold protein 1*) fait partie d'une famille de protéine « adaptatrices » (Homer1, 2 ou 3). Les protéines Homer 1 (Homer1a, b ou c) contiennent un domaine EVHI (*Ena/VASP homology 1*) avec un motif riche en proline permettant l'interaction avec différentes protéines comme l'IP<sub>3</sub>R ou les canaux TRPC [493]. Jardin *et al.* ont mis en évidence, dans les plaquettes humaines, que Homer1 s'associait avec Orai1 et STIM de manière  $Ca^{2+}$  dépendante, stabilisant ainsi le complexe.

STIMATE (*STIM-activating enhancer*) est une autre protéine régulant positivement le SOCE en facilitant le changement conformationnel de STIM1 et donc la formation de *puncta* [494,495].

D'autres protéines, comme SPPL3 (*signal peptide peptidase-like 3*) ou Unc93B1 pourrait faciliter l'interaction entre Orai1 et STIM1 [496,497]. Guéguinou *et al.* ont également décrit, dans les cellules cancéreuses, que le canal *small conductance calcium-activated potassium channel 3* (SK3) peut former un complexe avec Orai1 et TRPC1, provoquant l'augmentation du SOCE grâce à une boucle de rétroaction positive entre les deux canaux [498]. SK3 est également décrit comme pouvant participer à l'influx d'Orai1 indépendant des réserves calciques du RE (voir partie 3.2.3.1).

D'autres protéines ont également été décrites comme régulant négativement le SOCE. C'est le cas de la protéine Golli, codé par le gène *MBP* (*myelin basic protein*). Son rôle dans le SOCE a été mis en évidence dans les lymphocytes T de souris, où la déficience pour la protéine Golli entraîne une augmentation du SOCE [499]. Il a ensuite été confirmé que Golli interagit avec la partie C-terminale de STIM1 et que sa surexpression entraîne une diminution du SOCE dans les cellules cancéreuses HeLa [500]. La protéine SARAF (*SOCE-associated regulatory factor*) est une protéine de la membrane du RE. SARAF semble jouer un rôle dans l'inactivation du SOCE, sa sous-expression réduisant

la *Slow* CDI. Cela s'effectuerait par une association de SARAF avec le domaine CAD/SOAR de STIM1, en fonction de la  $[Ca^{2+}]$  du RE [501]. Elle peut également interagir avec Orai1 et TRPC1 en fonction de l'expression de STIM1 dans la cellule [502]. La calmoduline (CaM) est également connue pour pouvoir interagir avec STIM1 et Orai1. La CaM comporte quatre domaines EF-hand et chaque fixation de  $Ca^{2+}$  révèle un site d'interaction avec un motif hydrophobique retrouvé sur de nombreuses protéines [503]. Lorsque le  $Ca^{2+}$  est fixé à la CaM, elle peut agir avec la partie N-terminale d'Orai1, suggérant une implication dans la *Fast* CDI [504]. Cependant, certaines études ont mis en évidence qu'elle peut également interagir avec le domaine poly-basique de STIM1, suggérant également un rôle dans la *Slow* CDI [505]. La protéine Sigma1R (*sigma-1 receptor*) est capable d'interagir avec STIM1, en ralentissant sa translocation à la jonction entre la membrane plasmique et le RE et en diminuant le couplage STIM1-Orai1 [506]. Récemment, une étude a mis en évidence un lien entre Orai1, SK2 et SK3 et la protéine chaperonne du RE Sigma1R. Cette interaction est responsable d'une signature calcique particulière, avec des oscillations calciques durant 6 à 24h après traitement de cellules cancéreuses avec de la staurosporine, un inducteur d'apoptose [507]. D'autres protéines, comme la Calsequestrine 1, TMEM178, ERp57, SURF 4 (*Surfeit locus protein 4*), STC2 (*Stanniocalcin 2*) ou encore ORMDL3 (*orosomuroid like 3*) ont été décrites comme pouvant diminuer ou limiter le SOCE [492].

Par ailleurs, certaines protéines régulant l'acheminement des protéines ainsi que leur expression à la membrane ont un effet sur le SOCE. Par exemple, l'internalisation d'Orai1 est dépendante des protéines Rho comme Rab5 et CCT (*chaperonin-containing T-complex protein 1*). Il a été démontré que CCT peut se lier avec la boucle intracellulaire des sous-unités d'Orai1, l'inhibition de l'interaction favorisant l'expression d'Orai1 à la membrane [508]. De plus, le mouvement de STIM1 à travers la membrane du RE est lié aux microtubules. Cela est permis grâce à la protéine +TIP (*plus-end tracking protein*) et particulièrement à la EB1 (*end-binding protein*) qui interagit avec STIM1 [509]. Il a été mis en évidence que lors d'une déplétion des réserves calciques, ERK1/2 peut phosphoryler STIM1 induisant la dissociation d'EB1 avec STIM1 [510]. Quelques études ont également proposé un rôle pour RHBDL2 (*rhomoid-like protein 2*) dans la régulation du nombre de canaux Orai1 à la membrane ou encore des HSP (*Heat shock protein*) ou du système Ubiquitine-protéasome pour la stabilité et le nombre de protéines STIM1 [492,511].

D'autres protéines peuvent également avoir un rôle sur l'influx SOCE, notamment via

une régulation structurelle du RE, de la membrane plasmique et de leurs jonctions. Tout d'abord, il a été montré, que la sous-expression de la cavéoline-1, qui est impliquée dans la formation des cavéoles, par siARN ou shARN (*short hairpin* ARN) induit une diminution de l'influx SOCE [512,513]. En effet, Orai1 contient un domaine de liaison à Cavéoline-1 et sa liaison induit une augmentation du SOCE [514,515]. Cavéoline-1 peut également interagir avec les canaux TRPC et est impliqué dans l'activation de TRPC1 par STIM1 [516]. Le SOCE est également régulé par les Septines, des protéines liées au GTP. Notamment, il a été mis en évidence que la Septine 4 module le *clustering* d'Orai1 et STIM1 en modifiant le PIP<sub>2</sub> de la membrane plasmique au niveau des jonctions, son inhibition induisant une diminution de l'influx SOCE [503]. Les protéines de la famille junctophiline aident également à la formation du couplage STIM1-Orai1, avec notamment la junctophiline 1 qui s'assemble en puncta lors du SOCE. Bien que le mécanisme exact ne soit pas encore connu, particulièrement dans les cellules du lit vasculaire, la modification de la membrane plasmique par ces différentes protéines (Cavéoline-1, Septin, junctophiline) lors des déplétions en Ca<sup>2+</sup> est un élément important du SOCE.

Bien que le SOCE soit médié par les acteurs majeurs que sont STIM, Orai et TRPC, de plus en plus d'études démontrent l'implication de différents protagonistes. Cette régulation semble varier selon les types cellulaires, et de nombreuses études seront nécessaires pour comprendre l'impact de ces protéines sur l'influx en condition physiologique ou physiopathologique.

### 3.2.3 Store-Independant Ca<sup>2+</sup> Entry (SICE)

Ce groupe regroupe les canaux indépendants au voltage et indépendants des réserves de Ca<sup>2+</sup> du RE. Ils peuvent être mécanosensibles ou activés par d'autres stimuli. Les canaux Orai et TRPC, en plus de l'influx SOCE, sont également capables d'induire des influx indépendants des réserves du RE.

#### 3.2.3.1 Implication des canaux Orai dans le SICE

En plus du SOCE, les canaux Orai peuvent également être activés indépendamment du contenu calciques des stocks intracellulaires, produisant le SICE [517]. Dans ces conditions, les canaux Orai peuvent être activés par l'acide arachidonique (AA) et produire le courant I<sub>ARC</sub> (*arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup> current*, ARC) ou par le leucotriène C4 (LTC4) et produire le courant I<sub>LRC</sub> (*LTC4-regulated calcium current*, LRC) [518,519]. Ces canaux sont activés par l'AA ou le LTC4 provenant d'un apport exogène

ou généré par un agoniste comme certains facteurs de croissance [520]. Ils sont formés par 3 sous-unités Orai1 et 2 sous-unités Orai3 et peuvent être régulés par un *pool* de STIM1 situé à la membrane plasmique, notamment grâce à une interaction STIM1-Orai3 [521,522]. Ces canaux présentent de nombreuses caractéristiques communes, outre le mode d'activation, avec les canaux CRAC. Ils sont également connus pour pouvoir réguler la prolifération, la migration ou l'apoptose [523]. Dans les cellules cancéreuses, il a été reporté que l'augmentation d'Orai3 provoque, d'une part l'augmentation de l'influx ARC, d'autre part la diminution du SOCE dû au recrutement d'Orai1 pour l'assemblage des canaux ARC avec Orai3.

Orai1 a également été décrit comme pouvant être activé par la protéine SPCA2 (*secretory Pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase*). Cette protéine est une pompe connue pour transporter le Ca<sup>2+</sup> et le Mg<sup>2+</sup> dans le Golgi. L'activation d'Orai1 par la SPCA2 s'effectue indépendamment de l'activité de pompe de SPCA2 et indépendamment de la déplétion des réserves calciques et de STIM1 [524]. Cette activation s'effectue par une interaction entre la partie N-terminale d'Orai1 et SPCA2, à la membrane plasmique, puis une activation de l'influx calcique par l'extrémité C-terminale. Cet influx permet une entrée de Ca<sup>2+</sup> dans le Golgi [525].

De plus, il a également été démontré que la protéine SARAF, connue pour son rôle dans l'inactivation du SOCE, peut également interagir avec le canal ARC. En effet, l'expression de SARAF atténue le SICE induit par l'AA [526].

### 3.2.3.2 Implication des canaux TRPC dans le SICE

Il a été reconnu que STIM1 peut réguler directement ou indirectement tous les canaux TRPC, à l'exception de TRPC7 [74]. En effet, STIM1 peut se lier à TRPC1, -C4 et -C5 via des interactions électrostatiques qui existent entre deux lysines chargées positivement (<sup>684</sup>KK<sup>685</sup>) sur STIM1 et deux aspartates conservés chargés négativement (<sup>639</sup>DD<sup>640</sup>) sur TRPC1 [527–529]. Ces deux lysines sont retrouvées sur STIM2.1 et STIM2.2. De telles interactions électrostatiques se produisent également avec TRPC4 et TRPC5 [530]. Par ailleurs, STIM1 peut réguler indirectement TRPC3 et TRPC6 grâce à l'hétéromultimérisation de TRPC1 avec TRPC3 et de TRPC4 avec TRPC6 [528]. En outre, il a été démontré que l'entrée locale de Ca<sup>2+</sup> via les canaux Orai1 peut induire le recrutement de TRPC1 à la membrane plasmique [531]. Ce recrutement pourrait avoir lieu grâce à des vésicules sous membranaires contenant des canaux TRPC1 [532]. En effet, des vésicules peuvent être détectées à proximité immédiate de la jonction RE-membrane plasmique où Orai1 et STIM1 s'agrègent lors d'une déplétion en Ca<sup>2+</sup>.

Malgré ces études, les mécanismes moléculaires responsables de l'implication des canaux TRPC dans le SOCE ne sont pas encore totalement compris et sont surtout dépendants du type cellulaire.

En outre, les canaux TRPC peuvent être activés par des voies indépendantes du contenu calcique des réserves intracellulaires, formant ainsi le ROCE. Ils peuvent être activés par de nombreux stimuli en fonction des canaux, de l'homo/hétérotétramérisation et de la distribution tissulaire. Actuellement, tous les TRPC ont été décrits comme activés par une voie dépendante de la PLC, même si tous les mécanismes précis ne sont pas toujours élucidés [533]. Dans plusieurs études il est montré que les canaux TRPC3, 6 et 7 peuvent être activés par le DAG endogène, produit par l'activation de la PLC, ou par un apport exogène comme l'oleylacetyl glycerol (OAG) [459,534]. Les protéines G sont également capables de lier et activer les canaux TRPC 1/4/5, et la présence de PIP2 est nécessaire pour l'activation des canaux [535]. Ils peuvent également être régulés par phosphorylation par la PKC [456,536].

Par ailleurs, TRPC1, 3 et 6 ont été décrits comme pouvant être activés par des stimuli mécaniques comme un étirement de la membrane [453,537]. Cependant, les mécanismes moléculaires de cette activation ne sont pas encore clairs, certaines études proposant une activation directe, intrinsèque, tandis que d'autres concluent à une activation indirecte par le biais des RCPG [538].

### 3.2.3.3 Implication d'autres canaux dans le SICE

Les canaux TRP sont également responsables d'un influx SICE. À l'exception de TRPM4 et TRPM5, tous les canaux TRP sont des canaux cationiques perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  [467]. L'ARNm de TRPV1, 2, 3 et 4 a été détecté dans l'artère pulmonaire, et l'expression protéique de TRPV1 et 4 a été confirmée par western blot [539,540]. TRPV5 et 6 n'ont pas été détectés dans les AP humaines ou de rat. TRPV1 est surexprimé dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP, comparé à des patients contrôles, et sa sous-expression par siARN ou son inhibition pharmacologique atténue la migration excessive des CML-AP [541]. De plus, plusieurs études ont établi que le canal mécanosensible TRPV4 peut être une potentielle cible pour les traitements antihypertenseurs et sa délétion génétique diminue le développement de l'HTAP induit par l'hypoxie chronique dans un modèle de souris [542–544].

L'ARNm de TRPM2, 3, 4, 7 et 8 a aussi été détecté dans les AP. TRPM2 a un rôle dans la régulation de la perméabilité de la barrière endothéliale tandis que dans les artères

cérébrales, TRPM8 contribue à la dépolarisation membranaire et à la vasoconstriction associée à l'augmentation de la pression intra-luminale [545,546]. Par ailleurs, il a été retrouvé 3 SNP dans le gène *TRPM8* qui sont associés au risque de développement d'une HTAP au sein d'une cohorte de population chinoise Han atteinte de BPCO.

Les canaux Piezo (Piezo1 et 2) sont des canaux calciques non sélectifs, mécanosensibles, notamment exprimés dans les poumons [547]. Il a été mis en évidence une dérégulation de l'expression des Piezo avec une augmentation de Piezo1 dans les CML-AP et une diminution de Piezo2 dans les CE-AP de patients atteints d'HTAP [548,549]. De plus, une interaction entre Piezo1 et Orai1 a été montrée dans la circulation lymphatique. En effet, Choi *et al.* ont montré que Piezo1 agit comme mécanosenseur dans les CE lymphatiques, activant Orai1 et déclenchant ainsi une cascade de signalisation induite par l'influx calcique d'Orai1 et responsable de l'expansion lymphatique en réponse à un changement de débit fluidique [550]. La relation exacte entre Piezo1 et Orai1 n'est pas encore connue. Cela pourrait être fait par interaction physique, par déplétion des stocks  $Ca^{2+}$  du RE via l'activation du récepteur de l' $IP_3$  ou encore par déplétion des stocks  $Ca^{2+}$  du RE via une sortie du  $Ca^{2+}$  du RE directement effectué par Piezo1, qui est aussi localisé sur la membrane du RE. Cependant, des études sont encore nécessaires afin de comprendre le fonctionnement et l'implication de ces canaux dans la pathologie de l'HTAP.

Les ASIC (*acid sensing ion channel*) font partie d'une famille de canaux cationiques sensibles à l'amiloride principalement connu dans le système nerveux central et périphérique, mais également présent dans les CML-AP. Ce sont principalement des canaux  $Na^+$ , mais également perméant au  $Ca^{2+}$ . Dans un modèle de souris d'HTAP exposées à l'hypoxie chronique, l'expression protéique d'ASIC1 est augmentée et régule et contribue au SOCE excessif des CML-AP [551,552]. ASIC1 semble donc jouer un rôle sur la vasoconstriction et le remodelage vasculaire associé au développement de l'HTAP hypoxique dans les modèles précliniques [553].

Le  $Ca^{2+}$ -sensing receptor (CaSR) est un récepteur couplé aux protéines G sensibles au  $Ca^{2+}$ , la fixation du  $Ca^{2+}$  sur la partie extracellulaire induisant un changement de conformation et déclenchant la cascade de signalisation. Une augmentation de l'expression protéique de CaSR a été montrée dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP et son inhibition réduit le développement de l'HTAP expérimentale [554,555]. Par ailleurs, Tang *et al.* ont montré une interaction fonctionnelle de CaSR avec TRPC6, en partie responsable de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  des CML-AP.

Le récepteur N-méthyl-d-aspartate (NMDAR), sensible au voltage, est un canal très perméable au  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans l'HTAP, le NMDAR est surexprimé dans les CE-AP et CML-AP tandis que le glutamate, son ligand, s'accumule au sein des AP. Cette surexpression contribue au phénotype pathologique des cellules et son inhibition est bénéfique contre le développement de l'HTAP dans différents modèles expérimentaux [556,557].

Bien que ce ne soit pas un canal, le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est également régulé par les pompes *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase* (SERCA). Hadri *et al.* ont démontré une diminution de l'expression protéique de l'isoforme SERCA2a dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP ainsi que les rats exposés à la MCT [558]. De plus, la re-expression de SERCA2a grâce à un adénovirus diminue le phénotype pathologique des CML-AP et de réduire l'HTAP expérimentale.

### 3.3 Les canaux Orai et TRPC dans l'artère pulmonaire et l'HTAP

L'expression d'Orai1/2/3 et de STIM1/2 a été détectée dans les CE-AP, CML-AP et fibroblastes de souris, de rats et d'humains [559–562]. Seuls TRPC1/C3/C4/C6 sont exprimés, au niveau de l'ARNm et des protéines dans les cultures primaires de cellules d'AP humaines alors que les canaux TRPC1/C3/C4/C5/C6 sont exprimés dans les CE-AP, CML-AP et fibroblastes de rongeurs [563–565].

#### 3.3.1 Cellules endothéliales

L'endothélium pulmonaire est connu pour présenter de nombreux canaux calciques, y compris les canaux Orai, TRPC, et les protéines STIM.

Abdullaev *et al.* ont montré, dans les CE-AP humaines, que la sous-expression d'Orai1 par siARN diminuait très fortement l'influx SOC activé par la thrombine. De plus, Orai1 est également impliqué dans le SOCE des cellules HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) [566]. La sous-expression d'Orai1 par siARN a provoqué la diminution du SOCE, de la migration, et de la capacité à former des tubes de ces cellules [567]. Dans une lignée de cellules endothéliales dérivées des HUVEC, les EA.hy926, TRPC1/C4 et STIM sont impliqués dans l'angiogénèse *in vitro* tandis que l'inhibition d'Orai1 n'a pas d'influence [568]. Dans les CE pulmonaires de souris, Sundivakkam *et al.* ont mis en évidence l'importance de l'interaction entre STIM1 et TRPC1/C4 pour l'influx SOC et ainsi la régulation de la barrière endothéliale. Étonnement, ils n'ont pas trouvé d'implication d'Orai1 dans le SOCE. [569]. Cependant, une étude plus récente a également montré que l'inactivation par ARN interférent d'Orai1 ou SARAF, une

protéine régulatrice du SOCE, altère la capacité à former des tubes, à proliférer et à migrer des HUVEC [570].

Dans les CE-AP humaines, Fantozzi *et al.* ont trouvé que l'exposition *in vitro* à l'hypoxie induisait une augmentation du SOCE associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm de TRPC4 [571]. À l'inverse, le SOCE est décrit comme diminué dans les CE-AP isolées de rats exposés à l'hypoxie chronique [572]. Une étude récente a déterminé une diminution du cholestérol membranaire dans les CE-AP de rats exposés à l'hypoxie chronique, à l'origine d'une diminution de l'interaction STIM1-Orai1 et donc du SOCE [573]. Zhou *et al.* ont démontré que l'expression de TRPC4 dans les CE contribue à l'augmentation de la perméabilité endothéliale dans les poumons de rats exposés à un protocole Su/Hx [574].

**Il est encore nécessaire d'élucider la fonction de ces canaux dans les CE-AP des patients contrôles et atteints d'HTAP, leurs rôles pouvant varier en fonction des origines cellulaires.**

### 3.3.2 Cellules musculaires lisses

STIM1 contribue à la prolifération des CML primaires d'artères coronaires humaines [575]. En outre, la sous-expression de STIM1 ou d'Orai1 réduit la SOCE et la migration des CML de veines saphènes humaines. L'inhibition d'Orai1 par le Synta66 réduit la migration induite par le PDGF des CML vasculaires systémiques, sans modification de leur prolifération [576]. La migration des CML d'aortes de rat est aussi réduite consécutivement à la sous-expression d'Orai1 par siARN [577]. L'augmentation de la fonction d'Orai1 avec IA65, un activateur pharmacologique, entraîne une augmentation de la migration des CML d'aortes thoraciques de rat [578]. Dans les CML d'aortes de rat en culture, Orai1 et STIM1 sont surexprimés par rapport aux CML d'aortes fraîchement isolées, suggérant que ces deux protéines contribuent à leur changements phénotypiques vers le phénotype synthétique [579]. Même si cela n'a pas été encore étudié dans les CML-AP, plusieurs études ont montré le rôle d'Orai dans la régulation de l'apoptose dans d'autres types de cellulaires [580,581].

Dans le contexte pathologique de l'HTAP, de nombreuses études ont retrouvé un excès de  $[Ca^{2+}]_i$ . Ceci est souvent associé avec une augmentation du SOCE dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP [384,582]. He *et al.* ont trouvé une augmentation protéique d'Orai1/2, STIM1/2 et TRPC6 associée à une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CML-AP contrôles exposées *in vitro* à l'hypoxie (3 % O<sub>2</sub> pendant 72 h) [583]. Une étude menée

par le même laboratoire a également révélé une augmentation de l'expression protéique de STIM2 dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP, sans modification de l'expression de STIM1 [584]. La sous-expression de STIM2 par siARN réduit le SOCE et la prolifération des CML-AP HTAP tandis que cela n'a aucun effet sur les CML-AP contrôles [585]. Dans une autre étude, la transition des CML-AP de rat d'un phénotype contractile à un phénotype prolifératif est associée à une augmentation du SOCE due à une surexpression protéique d'Orai2, de STIM2 et de TRPC6 [561]. En outre, les auteurs ont mis en évidence que la nicotinamide phosphoribosyltransférase (une cytozyme régulant les niveaux intracellulaires de nicotinamide adénine dinucléotide) favorise le remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTAP et l'HTAP expérimentale en induisant la surexpression d'Orai2 et STIM2 et l'augmentation du SOCE. Cette action pourrait s'effectuer par l'augmentation des voies inflammatoires ou par une activation de NF- $\kappa$ B [586]. De plus, la sous-expression de HIF-1 $\alpha$  par siARN a réduit la surexpression d'Orai2 induite par l'exposition à l'hypoxie (*in vitro*, 4 % O<sub>2</sub>, 60 h) dans des CML-AP de rat. Ce résultat a été également obtenu *in vivo*, dans des souris (*hif-1 $\alpha$* <sup>-/-</sup>) exposées à l'hypoxie chronique (10 % O<sub>2</sub>, 21 jours) [560]. La surexpression d'HIF-1 $\alpha$  dans l'HTAP pourrait donc favoriser une augmentation du SOCE dans l'HTAP.

Le SOCE est augmenté dans les CML-AP distales isolées de rats exposés à une hypoxie aiguë (4 % d'O<sub>2</sub>) alors que ce n'est pas le cas dans les CML-AP proximales isolées de ces mêmes rats. Cette augmentation est corrélée à une augmentation d'expression de l'ARNm et des protéines STIM1 et TRPC1 [587]. Hou *et al.* ont également retrouvé une augmentation de l'expression de STIM au niveau des AP distales de rats exposés à l'hypoxie chronique (hypobare pendant 21 jours). Dans les CML-AP isolées de ces AP, les auteurs ont montré que la sous-expression de STIM1 par siARN réduisait la translocation nucléaire de NFAT et ainsi diminuait la prolifération de ces cellules [588]. Cependant, Wang *et al.* ont démontré que l'expression de STIM est inchangée dans les AP distales et CML-AP isolées de rat exposés à l'hypoxie chronique (10 % O<sub>2</sub> pendant 21 jours) [560]. Dans cette étude, les auteurs ont constaté une augmentation de l'expression d'Orai1/2, tandis qu'Orai3 restait stable. Il a également été observé une augmentation de l'interaction entre TRPC1, Orai1 et STIM1 associée avec une augmentation du SOCE dans les CML-AP de souris exposées à l'hypoxie aiguë [589].

L'expression et la fonction de STIM1 et Orai1 sont accrues dans les aortes de rats spontanément hypertendus [590]. Dans un modèle expérimental d'apnée obstructive du sommeil induit chez le rat par une hypoxie chronique intermittente (5 % d'O<sub>2</sub> inspiré

pendant 20 s, suivi de 280 s d'air ambiant, 12 fois par heure pendant 8 h par jour pendant 14 à 28 jours), Castillo-Galán *et al.* ont montré une augmentation de l'expression protéique d'Orai1, STIM1 et TRPC1, -C4, -C6 dans les poumons [591]. Le traitement de ces rats par le 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) a diminué la pression systolique du ventricule droit et le remodelage des vaisseaux pulmonaires induit par l'hypoxie chronique intermittente [592]. Le traitement au 2-APB a également permis de diminuer le remodelage vasculaire des agneaux hypoxémiques élevés en haute altitude [593]. Néanmoins, ces résultats sont à nuancer, le 2-APB étant un inhibiteur non sélectif du SOCE (interfère avec la pompe SERCA, les canaux K<sup>+</sup>, TRPV1, TRPV2 et TRPV3), avec une action bimodale, pouvant renforcer le SOCE à faible concentration ou l'inhiber à plus forte concentration [594].

Le traitement de CML-AP contrôles avec du PDGF a stimulé l'expression de STIM1 et Orai1 par la voie de signalisation Akt/mTOR, impliquant une augmentation du SOCE [196]. Le PDGF étant excessivement produit dans l'HTAP, cela pourrait être un lien entre l'augmentation du SOCE et l'HTAP.

Par ailleurs, certains acteurs du SOCE semblent également être impliqués dans la contraction vasculaire. L'inhibition pharmacologique du SOCE avec les composés non spécifiques 2-APB ou Gd<sup>3+</sup> prévient la contraction des artères coronaires de rat induite par l'urotensine-II [595]. Dans les aortes de souris, la sous-expression de STIM1 réduit fortement la réponse contractile induite par la phényléphrine [596]. La surexpression de TRPC1 augmente la réponse contractile des AP chez le rat [597]. De plus, les CE isolées de souris *trpc4*<sup>-/-</sup> ont une diminution importante de leur SOCE ainsi qu'une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium au niveau de l'aorte thoracique [598].

La recherche sur les canaux TRPC, elle, a été fortement impactée par les rongeurs génétiquement modifiés, avec des délétions uniques ou multiples de certains TRPC.

Les souris *trpc1*<sup>-/-</sup> + *trpc6*<sup>-/-</sup> sont protégées contre l'HTAP induite par l'hypoxie chronique grâce à une diminution du remodelage des vaisseaux pulmonaires [599]. Similairement, l'administration intratrachéale *in vivo* de siRNA dirigé contre TRPC1 atténue le remodelage artériel pulmonaire, réduit les pressions systoliques du VD, diminue l'expression de l'ARNm de marqueurs inflammatoires pulmonaires et de marqueurs apoptotiques du VD de souris exposées à l'hypoxie chronique (11 % d'O<sub>2</sub> pendant 28j) [600]. L'expression de TRPC1 et C6 est augmentée dans les AP de rats exposés à l'hypoxie chronique, en corrélation avec une augmentation du SOCE dans

les CML-AP, et l'inhibition non sélective par le  $\text{La}^{3+}$  ou le SKF-96365 diminue la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  des CML-AP et le tonus vasculaire [601]. Par ailleurs, Malczyk *et al.* ont trouvé une augmentation de l'ARNm de TRPC1 dans les CML-AP exposées à l'hypoxie *in vitro* (1 %  $\text{O}_2$  pendant 72h) isolées de souris [602]. Les souris *trpc1<sup>-/-</sup>* exposées à l'hypoxie chronique ont moins de remodelage vasculaire pulmonaire que les souris *trpc1<sup>+/+</sup>*, mais présentent une hypertrophie du VD similaire. Effectivement, la prolifération des CML-AP isolées de souris *trpc1<sup>-/-</sup>* est réduite comparée aux souris *trpc1<sup>+/+</sup>*. Ce résultat est retrouvé lors de la sous-expression de TRPC1 par siARN. Par ailleurs, une hausse de l'expression de TRPC1 et TRPC4 a également été décrite dans les AP de rats exposés à la MCT, en concordance avec une augmentation du SOCE et de la vasoconstriction des AP [603].

Yu *et al.* ont décrit une augmentation de l'expression de TRPC3 dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP pouvant partiellement expliquer l'exacerbation du SOCE [604]. En utilisant des rats *trpc4<sup>-/-</sup>* exposés au protocole Su/Hx, Alzoubi *et al.* ont constaté une réduction de l'occlusion des petits AP et des lésions plexiformes chez les rats *trpc4<sup>-/-</sup>* par rapport aux rats *trpc4<sup>+/+</sup>*, associé à une amélioration du débit cardiaque [605].

Des SNP ont été trouvés dans le promoteur du gène *TRPC6* chez quelques patients atteints d'HTAPi, facilitant l'expression de la protéine TRPC6 et responsable de l'augmentation de l'activité de TRPC6 [606,607]. La présence de ce SNP pourrait donc prédisposer les individus porteurs à développer une HTAP.

En outre, l'expression de TRPC6 est accrue dans les poumons et les CML-AP de patients atteints d'HTAP, et la sous-expression de TRPC6 par siARN réduit le phénotype hyperprolifératif de ces CML-AP [604]. L'expression de TRPC6, SERCA2 et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  1 (NCX1) sont également augmentés dans les CML-AP de rats hypertensifs (*Milan hypertensive strain*), un modèle d'hypertension systémique. Le potentiel thérapeutique d'inhiber TRPC6 a également été souligné par Jain *et al.* qui ont démontré que l'inhibition de TRPC6 par le BI-749237 permettait de réduire le développement de l'HTAP de souris exposées à l'hypoxie chronique [608].

Par ailleurs, BMP2, un ligand du récepteur BMPRII, protège contre l'HTAP expérimentale induite par l'hypoxie chronique chez la souris [609]. Zhang *et al.* ont montré que l'application de BMP2 sur les CML-AP distales de rat induit une diminution de l'expression (ARNm et protéines) de TRPC1, -C4 et -C6, et une réduction du SOCE, de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basale et de la prolifération et migration des CML-AP de rat. À l'inverse,

l'application de BMP4, qui contribue au développement de l'HTAP expérimentale, accroît l'expression de TRPC1, -C4 et -C6 tout en favorisant le SOCE, la prolifération, la migration et protège de l'apoptose les CML-AP de rats [610,611].

**Les recherches menées ces dernières années nous indiquent le rôle important que semble jouer la machinerie SOCE dans un environnement hypoxique. Néanmoins, il est nécessaire de déterminer l'identité moléculaire du SOCE et le rôle des différents canaux impliqués dans les CML-AP HTAP et le développement de l'HTAP.**

### 3.4 Les canaux Orai et TRPC et remodelage du ventricule droit

Les canaux SOC sont également exprimés dans le cœur et les cardiomyocytes, et pourrait directement avoir un rôle dans la défaillance cardiaque droite des patients atteints d'HTAP [612,613]. Cependant, il est reconnu que l'amplitude du SOCE est moins importante dans les cardiomyocytes adultes que dans les cardiomyocytes immatures [614]. Chez l'adulte, il est estimé que 20 à 70 % des cardiomyocytes produisent un influx SOC en condition physiologique. Néanmoins, ces études sont menées avec des protocoles de déplétion du RS différents, ne sollicitant pas toujours le récepteur de la ryanodine 2 (RYR2) en plus de l'IP<sub>3</sub>R. Durant l'insuffisance cardiaque gauche, ce constat est différent et semble démontrer une plus forte implication du SOCE. En effet, les études montrent que l'expression de STIM1 et Orai1 est majeure pendant le développement cardiaque, diminue chez l'adulte et augmente en cas d'insuffisance cardiaque gauche [615].

À ce jour, le rôle du SOCE dans le cœur hypertrophié ou insuffisant est plus étudié dans le ventricule gauche. Plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'expression des canaux SOC dans les modèles expérimentaux de remodelage/dysfonction du VG. Cependant, ces expressions varient en fonction de l'étude, du type d'animal et du modèle utilisé [614–616]. En effet, plusieurs études ont confirmé des augmentations d'expression des canaux Orai1 et TRPC, parfois associés avec une surexpression de STIM et une exacerbation du SOCE ou du SICE. Cette augmentation d'influx peut ainsi activer des voies de signalisation liées à NFAT ou la calmoduline kinase II et ainsi activer des voies de gènes prohypertrophiques [614]. En 2020, Bartoli *et al.* ont étudié le rôle d'Orai1 dans un modèle de souris adulte avec cerclage de l'aorte, induisant une dysfonction du VG avec augmentation de l'expression (protéique et ARNm) d'Orai1 et du SOCE [439]. Grâce à l'utilisation de souris transgéniques avec un mutant dominant

négatif Orai1 spécifique des cardiomyocytes, ils ont mis en évidence que le blocage du canal Orai1 préserve la fonction du VG et diminue l'hypertrophie entraînée par la surcharge de pression dû au cerclage de l'aorte. Cette amélioration est accompagnée d'une diminution de la fibrose interstitielle, suggérant un lien entre Orai1 et les fibroblastes ventriculaires. L'inhibition pharmacologique d'Orai1 par le JPIII dans ce modèle de dysfonction du VG a produit des résultats similaires, démontrant que l'inhibition sélective d'Orai1 est une thérapie potentielle pour traiter la dysfonction du VG suite à une surcharge de pression.

Les canaux SOC sont également exprimés dans les fibroblastes ventriculaires, et Ross *et al.* ont démontré une augmentation du SOCE et de l'expression d'Orai1, associée à une augmentation de la sécrétion en collagène, dans les fibroblastes humains d'un cœur défaillant [617].

À l'heure actuelle, peu d'études ont été menées sur le rôle physiologique et physiopathologique du SOCE dans le ventricule droit. Il a été démontré une diminution de l'ARNm de TRPC1 ainsi qu'une augmentation de l'ARNm de TRPC6 dans le VD défaillant induit par exposition à la MCT, chez le rat [618]. Une étude effectuée par mon équipe a mis en évidence une augmentation de l'expression protéique d'Orai1, TRPC1, TRPC4 et STIM1L ainsi qu'une diminution de STIM1 dans le ventricule droit hypertrophié de rats exposés à la MCT. Ces dérégulations d'expression sont associées à augmentation de l' $I_{SOC}$ , du  $[Ca^{2+}]$  sarcoplasmique et ainsi du raccourcissement des cardiomyocytes [619]. De plus, l'application de BTP2 sur les cardiomyocytes isolés de rats exposés à la MCT a diminué les transients calciques et le raccourcissement des cardiomyocytes.

Cependant, même si ces études supportent une dérégulation de l'homéostasie calcique dans le VD, elles ne permettent pas totalement de conclure sur un rôle du SOCE sur le VD dans l'insuffisance cardiaque droite. Des études additionnelles sont nécessaires pour infirmer ou confirmer un rôle cardioprotecteur des canaux SOC dans l'insuffisance ventriculaire droite.

### 3.5 Potentiel thérapeutique des SOC

À ce jour, les traitements thérapeutiques de l'HTAP restent limités. Les bloqueurs des CCDV-L constituent une voie de traitement ciblant les canaux ioniques, pour moins de 10 % des patients atteints d'HTAP, en agissant principalement sur la vasoconstriction des AP. Néanmoins, l'influx SOC représente une entrée de calcium importante des

cellules vasculaires pulmonaires et semble potentiellement impliqué dans le remodelage des AP. Cibler les canaux SOC pourrait donc représenter une nouvelle piste thérapeutique pour lutter contre le développement de l'HTAP. Par ailleurs, depuis l'identification des acteurs du SOCE en 2006, les outils pharmacologiques disponibles pour réguler l'activité de ces canaux sont en plein essor. Certains inhibiteurs sont actuellement inscrits dans des essais cliniques (pour d'autres pathologies que l'HTAP).

Par exemple, Auxora (ou CM2489) est un inhibiteur du canal Orai1 développé par CalciMedica, qui a été testé dans un essai clinique de phase 2 pour traiter le psoriasis en plaques modéré à sévère. Cependant, il n'a montré qu'un effet clinique limité, mais a été sans danger et bien toléré par les patients. Cette molécule a également été testée afin de traiter la pancréatite aiguë. Les essais précliniques ont été concluants chez la souris et les essais cliniques de phase I ont été positifs, permettant l'entrée en phase II avec un bon profil de sécurité et une amélioration des résultats pour les patients [620,621]. Une autre étude de phase 2 est en cours pour le traitement de la pancréatite aiguë et du syndrome de réponse inflammatoire systémique (NCT04681066).

De plus, une étude clinique, bien que limitée par sa conception, a été menée pour le traitement de la pneumonie COVID-19 sévère avec ce composé [622]. Cette étude clinique de phase 2 a démontré une distribution rapide d'Auxora dans les poumons, avec un profil de sécurité encourageant et une évolution clinique plus favorable, avec un rétablissement plus rapide que les patients recevant les soins habituels [623].

Un autre inhibiteur d'Orai1, développé par Rhizen Pharmaceuticals, le RP3128 a atteint le stade des essais cliniques (phase I/IIa) pour l'asthme [624]. Enfin, un dernier candidat, l'inhibiteur d'Orai1 PRCL-02 développé par PRCL Research Inc., a atteint un essai clinique de phase IIa pour le traitement du psoriasis en plaques chronique modéré à sévère. Il n'a été détecté aucun problème de sécurité ou de tolérabilité [625].

Concernant les canaux TRPC, peu d'études cliniques sont en cours dû au manque de sélectivité des inhibiteurs. Actuellement, l'inhibiteur du canal TRPC5 GFB887, développé par Goldfinch Bio, Inc., testé en phase I sur des volontaires sains, et maintenant en phase II sur des patients atteints de néphropathie diabétique ou de glomérulosclérose segmentaire focale [626]. De plus, une étude clinique de phase 2 est menée par Boehringer Ingelheim avec leur inhibiteur de TRPC4 et TRPC5 pour les patients souffrant de trouble dépressif majeur [627]. Cependant, la recherche sur les inhibiteurs de TRPC n'en est qu'à ses débuts, mais elle devrait être accélérée par la découverte récente de leurs structures par cryo-EM [628].

Ces études cliniques menées dans d'autres pathologies indiquent l'intérêt thérapeutique des canaux SOC, notamment avec une inhibition du canal Orai1 sans effet secondaire majeur déclaré au niveau immunitaire et cardiovasculaire.

# **CONTEXTE ET OBJECTIFS**

Depuis plusieurs dizaines d'années, la recherche préclinique et clinique a permis des avancées majeures dans la compréhension de la physiopathologie de l'HTAP et dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant, l'HTAP demeure une pathologie incurable avec un taux de mortalité élevé. Malgré les thérapies médicales optimisées, la transplantation pulmonaire reste encore un traitement primordial, illustrant la nécessité de trouver de nouvelles cibles pharmacologiques et de développer de nouveaux traitements. Depuis plusieurs années, il est également reconnu une dysfonction de la signalisation calcique au sein des cellules de l'artère pulmonaire des patients atteints d'HTAP. Effectivement, certains patients réactifs sont déjà traités avec des inhibiteurs des CCDV-L, démontrant le potentiel thérapeutique des canaux ioniques.

Depuis leur identification au début du XXI<sup>e</sup> siècle, quelques études ont émis l'hypothèse du potentiel de l'influx SOC comme cible thérapeutique de l'HTAP. Cet influx calcique, dépendant des réserves de Ca<sup>2+</sup> du RE/RS, est majoritairement porté par les protéines STIM, les canaux calciques Orai, et les canaux calciques non sélectifs TRPC. Bien qu'une compréhension détaillée de l'implication de ces canaux calciques ne soit pas encore acquise, les travaux réalisés, notamment sur les CML vasculaires systémiques, ont suggéré que ces canaux SOC pourraient être impliqués dans les atteintes fonctionnelles et structurelles du lit vasculaire pulmonaire.

**Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse ont été de déterminer le rôle et la contribution des canaux Orai et des différents canaux TRPC dans la pathogenèse de l'HTAP.**

**Dans ce but, par des expériences *in vitro* j'ai étudié l'expression et la fonction de ces différents canaux dans les CML-AP et CE-AP de patients atteints d'HTAP. J'ai également déterminé leurs implications dans les dysfonctionnements de ces cellules durant le développement de l'HTAP. Puis, *in vivo*, j'ai également étudié leurs implications dans différents modèles expérimentaux d'HTAP ainsi que leur intérêt thérapeutique.**

**Dans le manuscrit je présenterai essentiellement les résultats que j'ai obtenus sur les CML-AP contrôles et HTAP. Les résultats que j'ai obtenus sur le rôle de ces canaux SOC au niveau des CE-AP sont en cours d'analyse et seront présentés durant ma soutenance.**

# **MATERIELS ET METHODES**

# 1 MODELES ANIMAUX ET ETUDES *IN VIVO*

## 1.1 Modèles précliniques d'hypertension pulmonaire et traitements

Afin d'étudier le rôle pathophysiologique et appréhender l'effet de l'inhibition pharmacologique des canaux Orai et TRPC dans l'HTAP, différents modèles expérimentaux ont été utilisés. Ces différents modèles d'HTAP ont été réalisés sur des rats mâles Wistar, âgés de 4 semaines provenant de Janvier Labs. Les rats ont été aléatoirement répartis entre 3 groupes :

- Contrôle (aucune induction d'HTAP)
- HTAP témoin (induction de l'HTAP et traitement avec un solvant, le diméthylsulfoxyde (DMSO))
- HTAP traité (induction de l'HTAP et traitement avec l'inhibiteur pharmacologique dilué dans du DMSO)

Toutes les méthodes et analyses ont été réalisées en aveugle. Tous les rats ont reçu un numéro connu uniquement par l'expérimentateur qui a délivré le traitement.

### **Modèle d'HTAP induit par la MCT**

La MCT est préparée extemporanée en la dissolvant dans 1M d'acide chlorhydrique puis en tamponnant avec le même volume d'hydroxyde de sodium à 1M afin d'obtenir un pH de 7,4. L'injection de MCT est réalisée en sous-cutanée, à une concentration de 60 mg/kg, pour 500 µL. Une injection à volume équivalent, avec du sérum physiologique, est effectuée pour les rats contrôles.

Différents protocoles de traitements ont été effectués :

- Traitement curatif au N-[4-[3,5-Bis(trifluorométhyl)-1H-pyrazol-1-yl]phényl]-4-méthyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide (YM-58483 ou BTP2), par injection quotidienne de BTP2 (5 mg/kg/jour) en intra-péritonéal, du jour 14 au jour 21, soit 7 jours.
- Traitement curatif au 4-(2,5-diméthoxyphényl)-N-[(pyridin-4-yl)méthyl]aniline (JP111), par diffusion via des pompes Azlet (0.72 mg/kg/jour)(modèle 2002), du jour 7 au jour 21 soit 14 jours. Dû à la faible demi-vie du JP111 *in vivo*, des pompes osmotiques ALZET ont été utilisées afin de délivrer le JP111 ou le DMSO dans la circulation systémique à un débit continu et contrôlé pendant 2 semaines. Les pompes osmotiques ont été préparées en utilisant une solution de 30 mM (9,6 µg/µL) de JP111 dans du DMSO. Le volume total de JP111 ou DMSO administré par

animal a été de 200 µL, avec un débit de 0,5 µl/heure. Afin de mettre en place les pompes, les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane par inhalation (5 % pour l'induction, 2 % pour l'entretien) dans un mélange de 2 L/min d'O<sub>2</sub>. Une petite zone de poils a été rasée entre les omoplates et nettoyée avec Vetasept®. Une petite incision (inférieure à 1 cm) a été pratiquée et une poche a été créée dans le flanc gauche. La pompe activée a été insérée dans la poche avec le modérateur de flux orienté vers l'intérieur. Les pompes osmotiques ont été retirées à la fin de l'expérience et l'absence de précipitation autour de l'embout ainsi que l'absence de solution restant dans le réservoir a été vérifiée.

- Traitement curatif au N-[[[6-Hydroxy-1-naphthalenyl)amino]thioxomethyl]-2-furancarboxamide (5J4), par injection quotidienne de 5J4 (1 mg/kg/jour) en intra-péritonéal, du jour 14 au jour 21, soit 7 jours.
- Traitement curatif au Ethyl-1-(4-(2,3,3-trichloroacrylamide)phenyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (PYR3), par injection quotidienne de PYR3 (1 mg/kg/jour) en intra-péritonéal, du jour 14 au jour 21, soit 7 jours.

### **Modèle d'HTAP induit par l'hypoxie chronique**

Pour ce modèle, l'induction de l'HTAP a été effectuée en plaçant les rats en environnement hypoxique, dans des chambres à hypoxie normobare à 10 % d'O<sub>2</sub>, pendant 21 jours, tandis que les rats du groupe contrôle (normoxie) sont placés en dehors de cette chambre, exposés à l'air atmosphérique. Pour ce modèle, un traitement a été effectué :

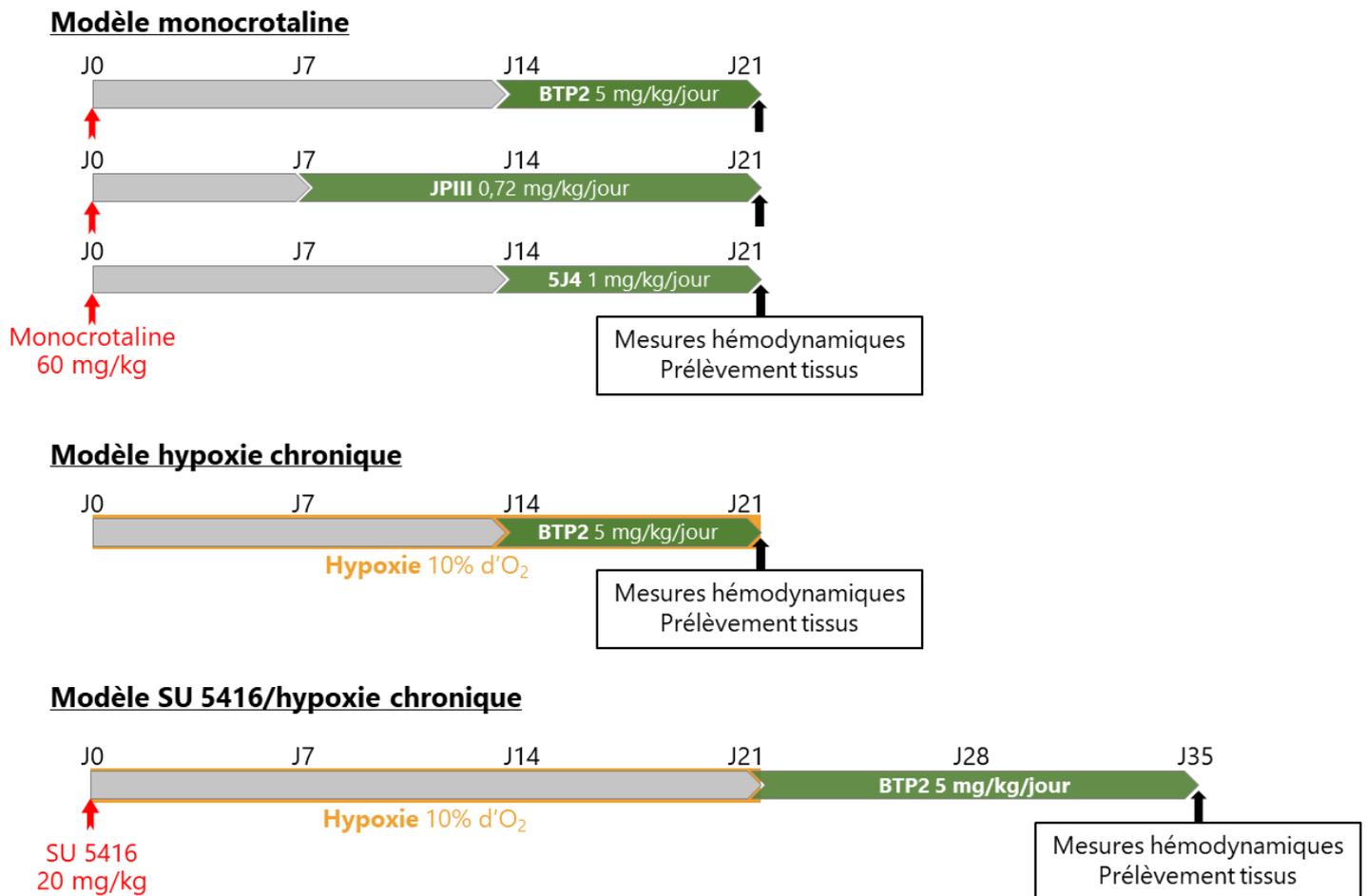
- Traitement curatif au BTP2, par injection quotidienne de BTP2 (5 mg/kg/jour) en intra-péritonéal, du jour 14 au jour 21, soit 7 jours.

### **Modèle d'HTAP induit par l'hypoxie chronique et le SU5416**

Les rats ont reçu une injection unique de SU5416 à 20 mg/kg, ont été placés en hypoxie normobare (10 % d'O<sub>2</sub>) pendant 21 jours puis en normoxie pendant 14 jours. Le groupe contrôle a eu une injection du solvant et a été placé en normoxie pendant 5 semaines. Un traitement a été effectué :

- Traitement curatif au BTP2, par injection quotidienne de BTP2 (5 mg/kg/jour) en intra-péritonéal, du jour 21 au jour 35, soit 14 jours.

À chaque fin de protocole, des échocardiographies sont réalisées, les mesures hémodynamiques et l'hypertrophie du ventricule droit sont évaluées puis les organes d'intérêts sont prélevés (Figure 24).



**Figure 24 :** Les différents protocoles de modèles expérimentaux

## 1.2 Échocardiographie

Afin d'évaluer l'impact des différents traitements sur les fonctions vasculaire et cardiaque dans le contexte pathophysiologique, nous avons réalisé des échocardiographies transthoraciques. Les échocardiographies ont été réalisées par le Dr Angèle Böet (cardiopédiatre à l'hôpital Marie Lannelongue) grâce à un transducteur à haute fréquence (12 S-D 4-12 MHz, GE Healthcare) couplé à l'échographe Vivid E9 (GE Healthcare). Pour ce faire, les rats sont anesthésiés grâce à un système d'anesthésie (Minerve) (5 % pour l'induction, 2 % pour l'entretien) dans un mélange à 2 L/min d'O<sub>2</sub>, puis rasés. Les rats sont en respiration spontanée et la température corporelle est

contrôlée. La technique d'échocardiographie est une technique indolore et non invasive s'effectue par l'usage d'ultrasons. Les ultrasons émis vont réfléchir sur les structures cardiaques et ainsi obtenir des images cardiaques en mouvement et ainsi mesurer différents paramètres morphométriques et du flux sanguin.

- Fréquence cardiaque (*Heart rate*, HR)
- *Stroke volume* (SV), représentant le volume de sang pompé par le VG pendant la contraction cardiaque, calculé grâce à la formule suivante :

$$SV = \text{Aire de la surface d'éjection} * VTI$$

avec la VTI correspondant à la Velocity Time Integral, représentant le flux sanguin passé par l'AP

### 1.3 Mesures hémodynamiques

Différentes mesures hémodynamiques sont réalisées par cathétérisme cardiaque droit. Pour cela, les rats sont anesthésiés avec de l'isoflurane par inhalation (5 % pour l'induction, 2 % pour l'entretien) dans un mélange à 2 L/min d'O<sub>2</sub> (Minerve). Suite à l'ouverture de la zone thoracique supérieure, l'artère carotide gauche et la veine jugulaire droite sont dégagées. Une sonde thermique est insérée dans la carotide puis un cathéter ombilical courbé est inséré dans le ventricule droit par la jugulaire, en passant par l'oreillette droite. Ce cathéter, relié à un capteur de pression, va permettre la mesure de la pression systolique du VD. Les débits cardiaques sont ensuite mesurés par thermodilution. 250 µl de sérum physiologique à 3°C sont injectés dans le VD, par la jugulaire. La sonde thermique préalablement installée dans la carotide permettra de mesurer l'évolution de la température du sang et ainsi obtenir une courbe de thermodilution. C'est l'aire sous la courbe qui permettra le calcul du débit cardiaque. Plus le débit cardiaque sera élevé, plus le retour à la température sanguine initial sera rapide, et inversement. Pour terminer, les pressions systémiques sont mesurées en insérant le cathéter à la place de la sonde thermique, dans la carotide gauche. Toutes ces mesures sont effectuées grâce au logiciel LabChart.

### 1.4 Prélèvements et préparation des organes

Une fois les mesures hémodynamiques effectuées, les rats sont passés en anesthésie profonde (5 % isoflurane) afin d'effectuer l'euthanasie par dislocation cervicale suivie d'une exsanguination. L'exsanguination va permettre d'assurer la qualité des coupes histologiques, en présentant des vaisseaux pulmonaires dépourvus de sang.

Après ouverture de la cage thoracique et observation macroscopique des organes, le cœur est prélevé et placé dans du sérum physiologique. Les oreillettes sont prélevées, pesées, puis congelées dans la carboglace afin d'effectuer des études d'expression génique et protéique. Le VD est séparé du VG et septum puis pesé. L'hypertrophie du VD peut être ainsi mesurée grâce à l'indice de Fulton :

$$\text{Indice de Fulton} = \frac{\text{Poids ventricule droit}}{\text{Poids ventricule gauche} + \text{Septum}}$$

Rapidement, une partie du VD et du VG est découpée et conservée dans le formaldéhyde à 4 % afin de fixer les tissus et assurer la conservation des structures. Cela est effectué en vue de l'inclusion en paraffine afin d'obtenir des coupes histologiques. L'autre partie est congelée.

Ensuite, le lobe gauche du poumon est récupéré, après ligature au niveau du hile pulmonaire, puis congelé. Le lobe inférieur droit est ensuite récupéré, après ligature, pesé, et mis à sécher. Le rapport du poumon frais sur poumon sec pourra nous indiquer la présence éventuelle d'œdème.

La trachée est ensuite dégagée pour y insérer une canule afin de gonfler les poumons avec un milieu d'enrobage dilué à 50 % avec du sérum physiologique. Le lobe inférieur gauche est ensuite séparé et déposé dans le formaldéhyde à 4 %. En dernier, le tibia droit du rat est prélevé et mesuré afin de pouvoir normaliser les poids cardiaques avec la longueur du tibia.

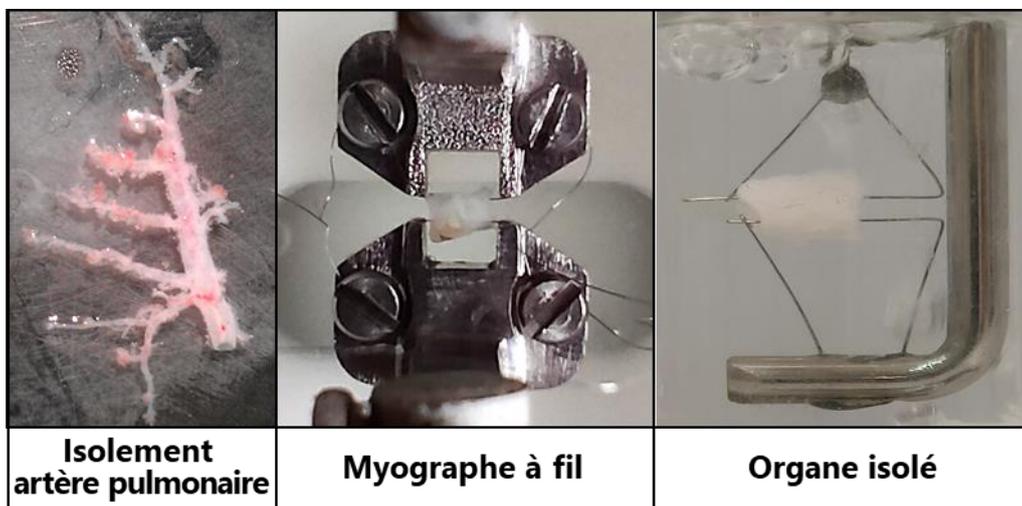
## **2 ÉTUDE DE LA CONTRACTILITE DE VAISSEAUX ISOLEES**

L'étude de la contractilité de vaisseaux isolés s'effectue *ex vivo* grâce un myographe (Emka technologies). Cela a été effectué sur des AP humaines et de rats.

Concernant les AP de rats, elles sont montées sur le myographe a fil. Pour cela, les rats sont anesthésiés par inhalation à 5 % d'isoflurane. Les rats sont euthanasiés par exsanguination. Le lobe droit est récupéré dans du sérum physiologique à 4°C puis disséqué dans une solution de Krebs (en mM : NaCl 119, KCl 4,7, CaCl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O) 2.5, MgSO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>7</sub> 1,17, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, NaHCO<sub>3</sub> 25 et glucose 11, pH de 7,4). L'AP intralobaire principale (diamètre de 0,5 à 2 mm) est isolée de la veine pulmonaire, de la bronche et du parenchyme pulmonaire (Figure 25). Des segments de 2 mm de long sont montés sur des fils de tungstène de 50 µm de diamètre, attachés à des mâchoires permettant

de contrôle l'écartement de celle-ci (et donc du vaisseau) et à un transducteur permettant la mesure de la tension isométrique (Figure 25). Tout cela s'effectue dans une cuve avec une solution de Krebs bullée avec du carbogène (95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>) à 37°C. Les AP sont prétendues à 0.3g.

Les mesures sur les AP humaines (diamètre de 5 à 10 mm) ont été réalisées dans les cuves à organes isolés. Après dissection de l'AP (provenant d'une lobectomie), un segment d'AP est monté entre deux crochets métalliques reliés à un capteur de force permettant l'enregistrement des tensions isométriques (Figure 25). Ce système est placé dans une cuve permettant d'immerger les vaisseaux dans une solution de Krebs, bullée avec du carbogène (95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>) à 37°C. Les artères sont ensuite prétendues à 0.6g.



**Figure 25** : Montage des artères sur le myographe

Une fois les AP prétendues, elles sont laissées 30 min dans les cuves afin de s'équilibrer. Une première stimulation est ensuite effectuée avec du KCl à 100 mM, permettant de tester la contractilité maximale des vaisseaux. Une fois le plateau de contraction obtenu, les artères sont rincées, afin de retourner à un état basal, puis des doses croissantes de KCl ou U466419 (analogue du thromboxane A<sub>2</sub>) sont effectuées sur des vaisseaux traités avec les inhibiteurs (BTP2, JPIII, PYR3, DMSO). Les résultats ainsi obtenus sont normalisés par rapport à la contraction maximale observée. La courbe de « dose-réponse » de contraction au KCl ou U466419 sera ainsi étudiée afin de voir si l'EC<sub>50</sub> est similaire entre les différentes conditions expérimentales.

## 3 HISTOLOGIE

### 3.1 Préparation et inclusion des tissus en paraffine

Afin de réaliser différents marquages, les prélèvements d'organes conservés dans le formaldéhyde 4 % sont inclus en paraffine. La paraffine étant hydrophobe, les prélèvements doivent être déshydratés, grâce à des bains d'alcool successifs, à concentrations croissantes, puis des bains de xylène. Les prélèvements sont ensuite immergés dans de la paraffine, rendue liquide par chauffage, puis coulés dans un moule et refroidis. Le bloc de paraffine, solide, est ensuite utilisé afin de réaliser des coupes de 4  $\mu$ M d'épaisseur grâce à un microtome. Les sections ainsi obtenues sont recueillies sur des lames de verres, en veillant à ne pas réaliser de bulle ou de pli de la coupe tissulaire.

### 3.2 Étude de l'occlusion des vaisseaux pulmonaires

L'occlusion des vaisseaux pulmonaires est visualisable grâce à une coloration Hématoxyline-Eosine-Safran réalisée sur les coupes de poumons. L'hématoxyline, colorant basique, va permettre de colorer les substances acides en bleu/violet, et donc se fixer aux acides nucléiques du noyau. L'éosine, colorant acide, va permettre de colorer le cytoplasme en rose, et les parois cellulaires, ou autres éléments basophiles. Le safran, via ses pigments lipophiles, va permettre de colorer en jaune orangé les fibres de collagène.

Pour réaliser cette coloration, les coupes sont déparaffinées dans des bains de xylène, et réhydratées dans des bains successifs à concentration décroissante d'éthanol, en finissant par une hydratation complète avec de l'eau. Elles sont ensuite placées successivement dans des bains d'hématoxyline et éosine, avec rinçage à l'eau entre chaque coloration. Enfin, les coupes sont déshydratées avec des bains d'éthanol, puis colorées au safran. Le montage est ensuite effectué et l'observation et l'analyse des lames est effectuée au microscope Nikon éclipse 60i. Grâce à ces colorations, les vaisseaux pulmonaires peuvent être visualisés et le pourcentage d'occlusion des vaisseaux mesurés, grâce au rapport entre le diamètre total et le diamètre de lumière du vaisseau.

### 3.3 Étude de la fibrose cardiaque

La fibrose cardiaque est visualisable grâce à une coloration au rouge sirius. En raison

de ses groupements d'acides sulfoniques, le rouge sirius va se lier aux groupements basiques et ainsi colorer en orange les fibres de collagène des coupes de ventricule cardiaque. Il va permettre de visualiser la fibrose cardiaque. Pour ce marquage, les coupes sont déparaffinées et réhydratées, puis la coloration au rouge sirius est effectuée. Suite au montage, des images de la coupe sont réalisées au microscope EVOS (Invitrogen) et l'analyse est effectuée, sur le logiciel ImageJ, en mesurant l'aire fibrosée par rapport à l'aire totale du tissu.

### 3.1 Étude de l'hypertrophie des cardiomyocytes

L'hypertrophie des cardiomyocytes est mesurée grâce à un marquage à l'agglutinine de germe de blé (WGA). Cette lectine, capable de se lier aux glycoprotéines, permet un marquage de la membrane cellulaire. Les coupes sont déparaffinées, réhydratées puis incubées avec du WGA-FITC (FL-1021-5, Eurobio) à 50 µg/ml. Après montage, les lames sont visualisées au microscope EVOS, au grossissement 40X et l'aire (en section transversale) est mesurée sur le logiciel ImageJ. Un total de 30 cellules (sur 3 champs différents) pour chaque ventricule d'un animal a été mesuré.

## 4 PRELEVEMENT ET CULTURE DES CELLULES PRIMAIRES

Afin de réaliser des études d'expression génique, protéique, des immunomarquages ou des études cellulaires, des prélèvements de poumon sont effectués sur des patients. Pour les sujets contrôles, il s'agit de patients atteints d'un cancer pulmonaire et ayant une lobectomie, pour lesquels un prélèvement est effectué à distance de la tumeur. Les poumons de patients atteints d'HTAP sont explantés lors d'une transplantation pulmonaire.

### 4.1 Isolement et culture des CML-AP

L'isolement des CML-AP s'effectue en disséquant les AP (diamètre de 3 à 10 mm) des prélèvements pulmonaires. Les AP sont coupées en morceaux de 3 à 5 mm de longueur, puis coupées longitudinalement afin d'exposer la lumière du vaisseau à la surface d'une plaque 6 puits. Le milieu de culture, appelé milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, avec 4,5 g/L de glucose, supplémenté avec 12,5 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 1X d'insuline-transferrine-sélénium (ITS), 100 U/ml de pénicilline-streptomycine (PS), 20 mM d'HEPES, 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique humain (EGF)) est ajouté. En quelques semaines, les CML-AP vont migrer et proliférer hors des AP. Ces cellules seront amplifiées puis cryoconservées en azote

liquide, en effectuant des ampoules de 1 ml (80 % milieu DMEM, 10 % SVF et 10 % DMSO) avec  $5 \times 10^5$  et  $1 \times 10^6$  cellules/ampoules.

## 4.2 Isolement et culture des CE-AP

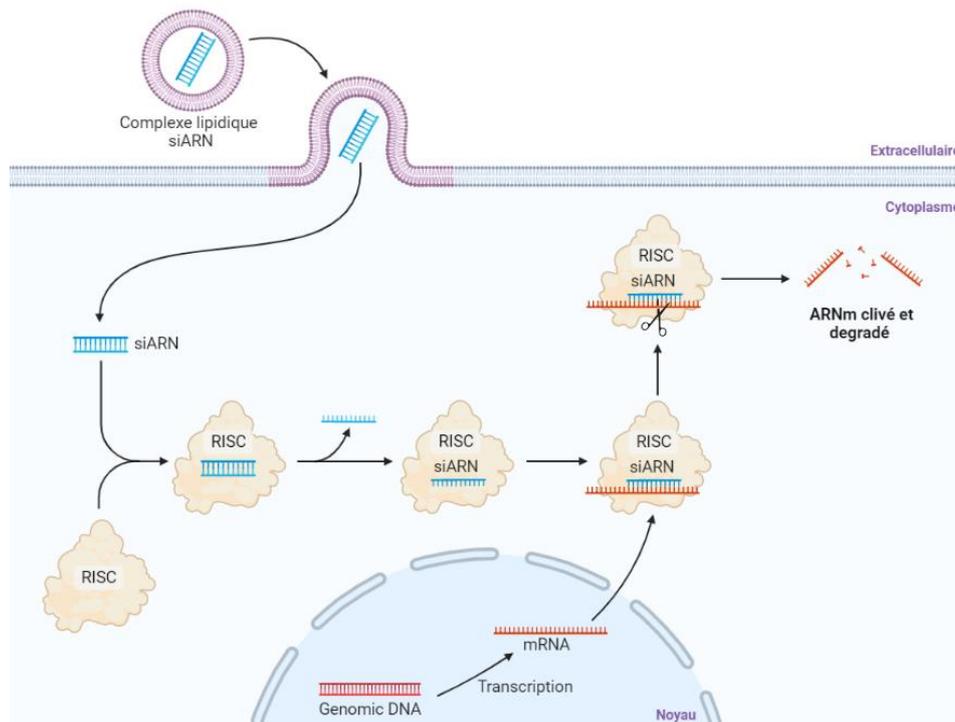
L'isolement des CE-AP s'effectue par digestion enzymatique. Une fois la plèvre retirée, le prélèvement pulmonaire est découpé et une digestion enzymatique à la dispase (1,7 U/mg) est effectuée. Les prélèvements sont agités à 37°C pendant 2h, filtrés avec un tamis cellulaire à mailles de 70  $\mu\text{m}$ , puis lavés avec de la solution saline équilibrée de Hank supplémentée avec 10 % SVF. Les hématies sont ensuite retirées grâce à plusieurs centrifugations et les cellules mises en culture dans des plaques 6 puits avec du milieu de culture MCDB (supplémenté avec 10 % SVF, 2 mM de L-glutamine, 25 mM d'HEPES, 100 U/ml de PS, 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de supplément de croissance de cellules endothéliales (ECGS), 1 ng/ml de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et 1 U/ml d'héparine). Les hématies et cellules non adhérentes sont retirées lors des changements de milieu. Une fois à 80-90 % de confluence, les CE sont sélectionnées grâce à une sélection positive au CD31. Pour cela, les CE sont incubées avec un anticorps anti-CD31 couplé à des billes ferromagnétiques (Dynabeads CD31 Endothelial Cell, Invitrogen pendant 20min à 4°C, puis isolées grâce à un aimant. Après amplification, les cellules sont cryoconservées dans le milieu de congélation (80 % MCDB complet, 10 % SVF et 10 % DMSO) avec entre  $5 \times 10^5$  et  $1 \times 10^6$  cellules/ampoules. Tous les plastiques utilisés pour ensemercer les CE sont préalablement recouverts avec de la gélatine à 0,1 %.

## 5 ÉTUDES CELLULAIRES

Les cellules sont étudiées entre le 2<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> passage. Les caractéristiques des patients contrôles et atteints d'une HTAP sont disponibles dans le matériel et méthodes de chaque étude.

### 5.1 Transfection des CML-AP et CE-AP

Afin de comprendre le rôle des protéines d'intérêt, les cellules ont été transfectées avec un siARN afin d'empêcher la traduction de l'ARN cible et donc sous-exprimer la protéine. Cela s'effectue grâce au complexe *RNA-induced silencing complex* (RISC) permettant de guider les ARN et régulant ainsi l'expression des gènes d'intérêts (Figure 26).



**Figure 26 :** Mode d'action des siARN

Tout d'abord, chaque siARN est préparé avec 1 ml d'OptiMEM (milieu essentiel minimal amélioré pour les réactifs de transfections), 6 µl de lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) et le siARN d'intérêt à 100 nM par rapport à la lipofectamine, durant 20 minutes. 200 µL de suspension cellulaire (environ  $5 \times 10^5$  cellules) sont ajoutés afin que les cellules soient transfectées. Après 20min d'incubation, les cellules sontensemencées avec du milieu complet adapté. Afin de retirer le transfectant, le milieu est changé 24h après la transfection. Les siARN utilisés (Tableau 7) ont une efficacité optimale 48h à 72h après transfection.

**Tableau 7 :** Description des siARN utilisés

Cible	Référence	Fournisseur
Orai1	s99509	Thermo Fisher scientific
STIM1	s13563	Thermo Fisher scientific
STIM2	s33457	Thermo Fisher scientific
KCNK3	s7785	Thermo Fisher scientific
BMPR2	s2045	Thermo Fisher scientific
TRPC1	S14411	Thermo Fisher scientific
TRPC3	S14413	Thermo Fisher scientific
TRPC4	S229618	Thermo Fisher scientific

TRPC6	S14421	Thermo Fisher scientific
contrôle	Silencer™ Select Negative Control	Thermo Fisher scientific

## 5.2 Test de prolifération par incorporation de bromodésoxyuridine

La prolifération est évaluée grâce au test de prolifération par incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU) DELFIA® (AD0200, PerkinElmer). Le BrdU est un analogue de la thymidine qui va s'incorporer aux nouveaux brins d'ADN synthétisés. Le BrdU ainsi incorporé est détecté par un anticorps monoclonal marqué à l'euporium, ayant comme excitation 340 nm et émettant à 615nm.

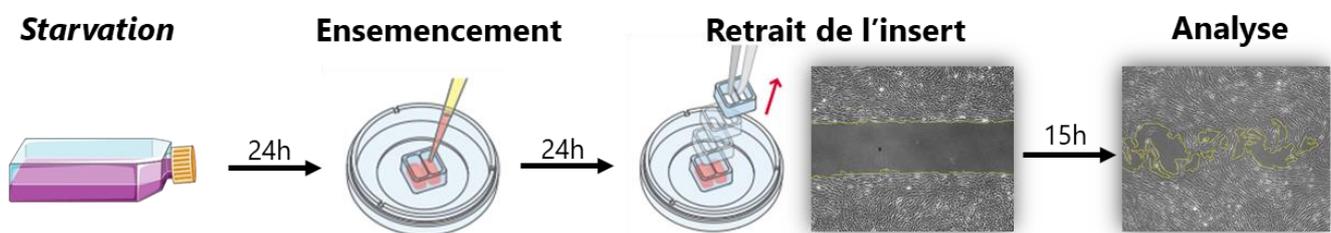
Après décollement et dissociation à la trypsine (TrypLE Express 1X, Life Technologies), les CML-AP sont comptées sur lame KOVA puisensemencées à  $5 \times 10^3$  cellules/puits, dans une plaque 96 puits. Afin de bloquer le cycle cellulaire et synchroniser les cellules, elles sont placées dans un milieu DMEM non supplémenté en SVF ou facteurs de croissance, durant 48h. La moitié des puitsensemencés est ensuite conservée dans ce DMEM non supplémenté, tandis que l'autre moitié est mise en DMEM supplémenté afin d'induire la prolifération cellulaire. Lors de l'analyse, cela permet de s'affranchir de l'inexactitude du nombre de cellulesensemencées grâce à une normalisation des cellules proliférantes (DMEM supplémenté) par rapport aux cellules non proliférantes (DMEM non supplémenté).

Lors de ce changement de milieu, les cellules peuvent également être traitées avec les inhibiteurs et sont traitées avec le BrdU, à 1X pendant 24h, avant la révélation. La révélation s'effectue selon le protocole du fournisseur, en fixant et dénaturant les cellules, puis en les incubant avec un anticorps anti-BrdU lié à l'euporium. La plaque 96 puits est lue grâce au lecteur de plaque FlexStation 3 (Molecular Devices).

## 5.3 Test de migration par cicatrisation

La migration des CML-AP est évaluée par un test de cicatrisation (*wound healing*). Pour cela, nous utilisons des inserts en silicone (80209, Ibidi®) à deux puits, permettant de créer un espace homogène entre deux tapis cellulaires.

Tout d'abord, les cellules sont synchronisées dans un milieu DMEM non supplémenté en SVF ou facteurs de croissance. Une fois les inserts collés au plastique, les cellules sontensemencées à  $1,2 \times 10^4$  cellules/puits d'insert, dans du DMEM non supplémenté en SVF ou facteurs de croissance et contenant  $1 \mu\text{M}$  de cytosine arabinose, afin de bloquer la prolifération cellulaire. Après 24h, les inserts sont délicatement retirés, et les inhibiteurs ajoutés avec un milieu de culture frais (Figure 27). Des images sont alors réalisées au microscope EVOS (à  $t_0$ ), puis une seconde image est réalisée après 15h ( $t_{15}$ ) et l'analyse est effectuée sur ImageJ en rapportant la taille de la blessure à  $t_{15}$  par rapport à  $t_0$  afin d'obtenir le pourcentage d'aire recouverte.



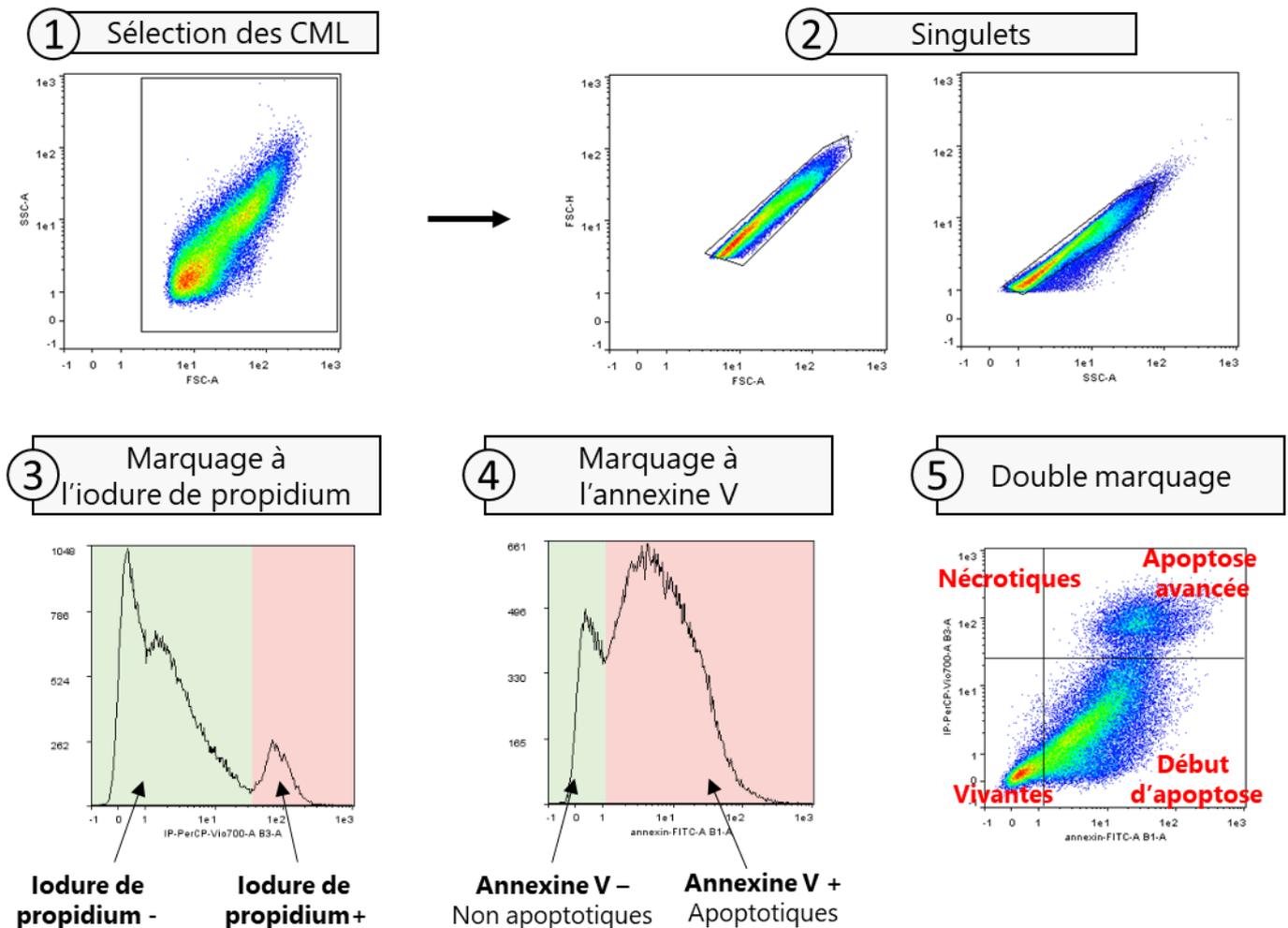
**Figure 27** : Protocole expérimental du test de migration

#### 5.4 Test de résistance à l'apoptose induite par la staurosporine

Afin d'induire l'apoptose, les CML-AP, préalablementensemencées à 70 % de confluence, sont traitées avec de la staurosporine (inhibiteur non spécifique des protéines kinases induisant l'apoptose cellulaire) à  $1 \mu\text{M}$  pendant 20 min ou  $50 \text{ nM}$  pendant 15h.

Les cellules sont rincées avec un tampon de marquage (420201, BioLegend) et détachées doucement avec de la trypsine et un grattoir à cellules. Après centrifugation ( $400 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min), le surnageant a été retiré et les cellules sont marquées avec un kit de détection de l'apoptose à l'annexine V (640914, BioLegend). Ce marquage va permettre de visualiser l'apoptose grâce au marquage à l'annexine V (lié à l'isothiocyanate de fluorescéine), qui va se fixer à la phosphatidylsérine. En effet, lorsque la cellule n'est pas en apoptose, ce phospholipide de la membrane plasmique n'est exposé qu'au milieu intracellulaire, tandis que lors de l'apoptose, il est exposé au milieu extracellulaire (appelé « flip-flop »). L'iodure de propidium, un agent intercalant des acides nucléiques est également ajouté comme marqueur de nécrose. Le marquage est détecté par cytométrie en flux, au MACSQuant (Myltenyi Biotec), en prenant en compte  $7,5 \times 10^4$  cellules par condition. Les analyses sont ensuite effectuées

grâce au logiciel Flowlogic (Inivai Technologies) (Figure 28)



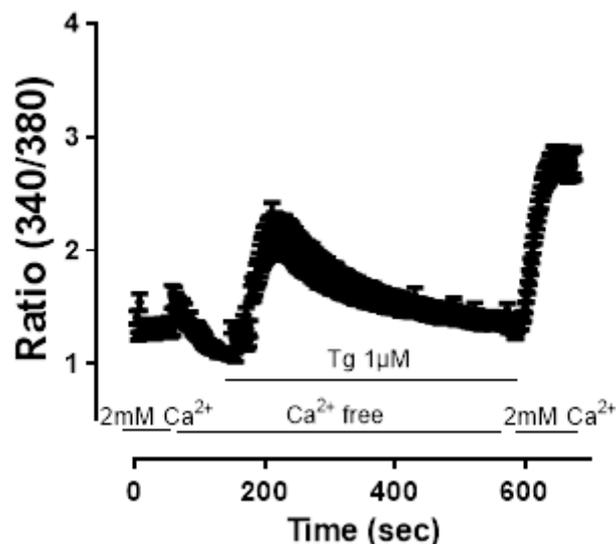
**Figure 28 :** Analyse des cellules musculaires lisses humaines par marquage à l'annexine V et au iodure de propidium

### 5.5 Mesure du calcium intracellulaire

La mesure du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire a été effectuée grâce à la sonde Fura-2-acetoxyméthyle ester (AM) (F1221, Invitrogen), un indicateur du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ratiométrique, émettant à 510 nm, mais étant excité à 380 nm pour la forme libre, et 340 nm pour la forme liée au  $\text{Ca}^{2+}$ . Les cellules sontensemencées sur des boîtes à fond de verre de 18 mm, à environ 70 % de confluence. Les cellules sont chargées avec 2  $\mu\text{M}$  de Fura-2-AM préalablement dissous dans du DMSO plus 20 % d'acide pluronique F-127 (P3000MP, Life Technologies), puis incubées à 37 °C pendant 30 minutes dans l'obscurité dans une solution de Krebs (en mM : 135 NaCl, 5,9 KCl, 2  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 10 D-glucose)

et Fura-2-AM, à pH 7,4. Elles sont ensuite lavées deux fois avec cette solution. L'utilisation du système LED Sutter Fluo Lambda 421 (Sutter Instrument Company), qui permet un changement rapide des longueurs d'onde d'excitation (340 et 380 nm) nécessaire à la visualisation des modifications cytosoliques de  $[Ca^{2+}]$  à l'aide d'un microscope (Olympus IX71).

Afin de mesurer l'influx SOC, les cellules sont placées dans une solution sans calcium ( $Ca^{2+}$  free, contenant 1 mM d'EGTA au lieu de 2 mM de  $CaCl_2$ , 5  $\mu$ M de nifédipine (inhibiteur du canal  $Ca^{2+}$  de type L) et de KB-R7943 (inhibiteur de l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$ )). Les stocks de  $Ca^{2+}$  du RE/RS sont vidés grâce à l'ajout de 1  $\mu$ M de thapsigargine, un inhibiteur de la pompe SERCA, pendant 8 min. L'entrée de  $Ca^{2+}$  SOC est ensuite induite par l'ajout de de 2 mM de  $CaCl_2$  extracellulaire grâce au remplacement de la solution sans calcium par la solution calcique (Figure 29). L'acquisition des images et l'analyse du  $Ca^{2+}$  cytosolique ont été effectuées avec le logiciel d'imagerie MetaFluor® 7.8 (Molecular Devices).



**Figure 29** : Protocole d'induction de l'influx SOC

La visualisation des variations du  $Ca^{2+}$  mitochondrial a été réalisée grâce à la sonde fluorescente calcique mitochondriale, Rhod-2-AM (FluoProbes), qui augmente sa fluorescence lors de la liaison avec le  $Ca^{2+}$ . Les CML-AP ont été chargées avec la sonde Rhod-2-AM (1,5  $\mu$ M) pendant 15min à 37°C. Le Rhod-2-AM a ensuite été excité à 514 nm et l'émission à 525 nm.

## 5.6 Mesure du potentiel de membrane des mitochondries

La mesure du potentiel de membrane s'effectue grâce au colorant

tétraméthylrhodamine, ester éthylique, perchlorate (TMRE, #T669, Invitrogen), colorant rouge-orange capable de s'accumuler dans les mitochondries actives en raison de leur charge négative. Le marquage des mitochondries est donc un indicateur du potentiel de membrane de ces mitochondries, car plus une mitochondrie est dépolarisée, moins elle retient le TMRE. Pour cela, les cellules sontensemencées sur des boîtes à fond de verre de 18 mm, à environ 70 % de confluence, et mises en présence de TMRE à 10 nM pendant 1 min dans une solution de Krebs. Une fois les cellules rincées, la fluorescence est analysée au microscope confocal (LSM700, Carl Zeiss), le TMRE ayant une excitation à 552 nm et une émission à 574 nm. L'analyse des mitochondries est ensuite effectuée sur le logiciel ImageJ.

## 6 IMMUNOMARQUAGE FLUORESCENT

Afin d'observer l'expression et la localisation de protéines cibles, différents marquages ont été réalisés sur coupe de poumon humain ou provenant de rat. Les poumons d'Homme et de rats sont inclus en paraffine, déparaffinés puis déshydratés. Les coupes sont ensuite saturées avec une solution de PBS contenant 10 % de sérum humain ou de rat, 0.1 % BSA et 0.2 % triton, pendant 1h à température ambiante. L'incubation avec les anticorps primaires (Tableau 8) est ensuite réalisée dans un mélange de PBS + BSA 0.1 % pendant toute la nuit, à 4°C. Après lavage au PBS, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires (anticorps anti-souris Alexa Fluor 488 et anti-lapin Alexa Fluor 594) à 1/200 et du DAPI, marquant le noyau, à 1/1x10<sup>4</sup>. Après montage, les lames sont visualisées en microscopie confocale (LSM700, Carl Zeiss).

**Tableau 8 :** Caractéristiques des anticorps primaires pour l'immunofluorescence

Anticorps	Espèce	Dilution	Fournisseur	Référence
α-SMA-FITC	Souris	1/200	Sigma-Aldrich	F3777
Orai1	Lapin	1/100	Sigma-Aldrich	O8264
STIM1	Lapin	1/100	Sigma-Aldrich	S6072
STIM2	Lapin	1/100	Sigma-Aldrich	PRS4123
TRPC1	Lapin	1/100	Alomone	ACC-010
TRPC3	Lapin	1/100	Alomone	ACC-016
TRPC4	Lapin	1/100	Alomone	ACC-018
TRPC6	Lapin	1/100	Alomone	ACC-017

## 7 BIOLOGIE MOLECULAIRE

### 7.1 Étude de l'expression génique

L'étude de l'expression génique est effectuée en quantifiant la quantité d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc), séquence d'ADN issu de l'ARN messager. Pour cela, il est nécessaire d'extraire les acides ribonucléiques (ARN), de synthétiser l'ADNc par transcription inverse puis de l'amplifier et le quantifier par réaction de polymérase en chaîne quantitative (qPCR).

#### 7.1.1 Extraction des ARN

Les ARN sont extraits à partir des poumons, VD ou de cellules. Les poumons ou les VD sont broyés à 4°C, dans des tubes gentleMACS à l'aide du gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotechnologies) avec 1ml de TRIzol (15596018, Invitrogen), permettant l'isolement de l'ARN tout en dissolvant les composants cellulaires. Après centrifugation, le surnageant est récupéré. À partir de cellules, l'extraction s'effectue en décollant les cellules avec un grattoir de cellules en présence d'1 ml de TRIzol. L'ajout de 200µl de chloroforme provoque la séparation des ADN et protéines (phase organique) et des ARN (phase aqueuse). Une fois la phase aqueuse récupérée, les ARN sont précipités grâce à l'ajout à volume (500µl) d'isopropanol puis centrifugés 10 min à 9000g à 4°C. Le surnageant est enlevé puis le culot d'ARN est lavé 3 fois à l'éthanol 75 %. Une fois le culot bien séché à l'air libre, il est resuspendu dans de l'eau sans ribonucléase (ARNase) puis peut être stocké à -80°C. Le dosage des ARN s'effectue ensuite à 4°C, par spectrophotométrie grâce au NanodropD30 (Eppendorf), avec une lecture des absorbances entre 230 et 280 nm. La pureté de l'échantillon est vérifiée par les rapports d'absorbance :

- $A_{260}/A_{280}$  indique une contamination aux protéines, il doit être supérieur à 1,7
- $A_{260}/A_{270}$  indique une contamination par du phénol, il doit être supérieur à 1,2.
- $A_{260}/A_{230}$  indique une contamination par des sels ou composés organiques, il doit être supérieur à 1,7.

#### 7.1.2 Transcription inverse

La transcription inverse est réalisée grâce au kit QuantiTect Reverse Transcription (205311, Qiagen). Tout d'abord, l'ADN génomique est éliminé grâce à une solution

contenant des gDNAases, chauffée 2min à 42°C. L'ARN est ensuite synthétisé en ADNc par incubation à 42°C pendant 15min dans une solution contenant un mélange optimisé d'oligo-dT, d'amorces aléatoires et la transcriptase inverse. L'action de la transcriptase inverse est ensuite arrêtée en chauffant la solution 3min à 95°C. Le produit obtenu peut ensuite être congelé à -20°C.

### 7.1.3 Réaction de polymérase en chaîne quantitative

La qPCR consiste en l'amplification des ADNc grâce à un cycle de 3 étapes : la dénaturation de l'ADN (15 sec à 95°C) afin de séparer les doubles brins, l'hybridation des amorces spécifiques au gène cible (Tableau 9), puis l'élongation de ces amorces par l'ADN polymérase (1 min à 60°C). La détection de la quantité d'ADNc s'effectue grâce à la technique Taqman, qui va permettre d'obtenir une fluorescence proportionnelle à la quantité de copies synthétisées. Ces sondes Taqman, composées d'un fluorophore et d'un *quencher* chargé de bloquer la fluorescence, vont se fixer au brin d'ADN lors de l'hybridation. Lors de l'élongation, la sonde Taqman est alors dégradée, séparant le fluorophore du quencher, lui permettant donc d'émettre de la fluorescence mesurée par le système de PCR en temps réel StepOnePlus (Applied Biosystems). L'analyse des résultats est ensuite effectuée à partir des cycles de seuil (Ct), représentant le nombre de cycles pour lequel la fluorescence générée a dépassé un seuil défini précédemment pour tous les gènes. Chaque expérience est normalisée au Ct d'un gène de référence, ici l'ARN ribosomique 18S, nous permettant donc d'obtenir la quantité relative des ARNm dans chaque échantillon.

**Tableau 9** : Caractéristiques des amorces utilisées

Primer	Référence	Fournisseur
Orai1 humain	Hs03046013_m1	Thermo Fisher scientific
β-Actin humain	Hs01060665_g1	Thermo Fisher scientific
KCNK3 humain	Hs00605529_m1	Thermo Fisher scientific
BMP2 humain	Hs00176148_m1	Thermo Fisher scientific
TRPC1 humain	NM_001251845.1	qPCR array, AnyGenes
TRPC3 humain	NM_001130698.2	qPCR array, AnyGenes
TRPC4 humain	NM_016179.4	qPCR array, AnyGenes
TRPC6 humain	NM_004621.6	qPCR array, AnyGenes
STIM1 humain	NM_001277961.3	qPCR array, AnyGenes
Orai1 Rat	Rn02397170_m1	Thermo Fisher scientific

$\beta$ -Actin Rat	Rn00667869_m1	Thermo Fisher scientific
NPPB Rat	Rn00580641_m1	Thermo Fisher scientific
NPPA Rat	Rn00664637_g1	Thermo Fisher scientific
Acta1 Rat	Rn01426628_g1	Thermo Fisher scientific
Actn2 Rat	Rn01470228_m1	Thermo Fisher scientific

## 7.2 Étude de l'expression génique

### 7.2.1 Extraction protéique

Les protéines sont extraites à partir de poumons, ventricule cardiaque, ou artère pulmonaire, ou cellules. Les organes sont broyés à 4°C, dans des tubes gentleMACS à l'aide du gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotechnologies) avec du tampon de lyse protéique contenant 1 % d'Igepal, 20 mM de Tris HCl, 137 mM de NaCl, 10 % de glycérol, 2 nM d'EDTA, , leupeptine à 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , aprotinine 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , des inhibiteurs de protéases (Complete Ultra tablets, Protease Inhibitor Cocktail, Roche) et des inhibiteurs de phosphatase (PhosSTOP, Roche). Les lysats cellulaires sont réalisés à une confluence d'environ 80 %. Les cellules sont lavées au PBS, puis décollées à l'aide d'un grattoir cellulaire, en présence de tampon de lyse protéique. Les lysats (tissulaires ou cellulaires) sont ensuite agités pendant 1h à 4°C puis centrifugé 10 min à 9000g afin de récupérer uniquement le surnageant contenant les protéines.

Une fois les protéines extraites, le dosage est effectué grâce à la méthode colorimétrique à l'acide bicinchoninique (BCA, Interchim). Cette méthode permet de mesurer la concentration protéique grâce à la fixation de l'ion Cu(I), réduit par les protéines, sur l'acide bicinchoninique, et ainsi former un complexe pourpre pouvant être mesuré à 562nm. Enfin, les protéines sont dénaturées par dilution au 1/2 avec une solution de bleu de Laemmli 2X et 5 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol et chauffées 3min à 95°C.

### 7.2.2 Western-blot

La technique d'immunoblot (Western-blot) est utilisée afin d'évaluer l'expression des protéines cibles. Pour cela, les protéines sont déposées (entre 10 et 40 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$  de protéines), avec un marqueur de taille, sur des gels de polyacrylamide précoulés (5671085, BioRad) avec un gradient de concentration croissant de 4 à 15 %. La migration des protéines par électrophorèse s'effectue dans un tampon de migration (10 % TrisGlycine 1X, 1 % SDS à 10 % et H<sub>2</sub>O Miliq) pendant 40min à 200V. Le transfert des protéines est effectué sur membrane de nitrocellulose, pendant 60 min à 100V

dans du tampon de transfert (10 % TrisGlycine 1X, 20 % Ethanol et H<sub>2</sub>O Miliq). Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués par saturation grâce à l'alcool polyvinylique (PVA) 1X, un agent non protéique se fixant aux parties hydrophobiques de la membrane en les rendant hydrophiles et résistants aux liaisons. La membrane est ensuite lavée avec une solution saline tamponnée au tris et Tween (TBS-T contenant TBS 1X et 0.1 % Tween-20). Enfin, elle est incubée avec les anticorps primaires (Tableau 10), dilués dans le TBS-T supplémenté avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 5 %, toute la nuit à 4°C. Après lavage au TBS-T, un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*) et reconnaissant l'espèce de l'anticorps primaire est incubé pendant 1h à température ambiante.

La révélation des protéines est effectuée grâce au réactif de chimiluminescence renforcée (ECL, 10308449, Amersham), qui va permettre de révéler le substrat de la peroxydase de raifort le luminol, émettant ainsi un signal de chimiluminescence détecté au ChemiDoc (Bio-Rad). L'intensité de la bande, ainsi révélée, est proportionnelle à la quantité de cette protéine dans le lysat. La  $\beta$ -actine est utilisée comme témoin de charge afin de normaliser la quantité de protéines déposée par puits.

**Tableau 10 :** Caractéristiques des anticorps primaires pour les immunoblots

Anticorps	Espèce	Dilution	Fournisseur	Référence
Survivin	Souris	1/1000	Cell Signaling Technology	2808
pP42/P44	Lapin	1/3000	Cell Signaling Technology	4376
P42/P44	Lapin	1/3000	Cell Signaling Technology	9102
pP38	Lapin	1/ 2000	Cell Signaling Technology	9211S
P38	Lapin	1/2000	Cell Signaling Technology	7972
p-Akt (Thr308)	Lapin	1/1000	Cell Signaling Technology	9275
Akt	Lapin	1/2000	Cell Signaling Technology	2938
P21	Lapin	1/2000	Cell Signaling Technology	610266
Caspase 9	Lapin	1/2000	Cell Signaling Technology	9508
$\beta$ -Actin	Souris	1/5000	Sigma-Aldrich	A1978
Orai1	Lapin	1/1000	Sigma-Aldrich	O8264
STIM1	Lapin	1/1000	Sigma-Aldrich	S6072
STIM2	Lapin	1/1000	Sigma-Aldrich	PRS4123
Pan-Calcineurin A	Lapin	1/1000	Cell Signaling Technology	2614
TRPC1	Lapin	1/2000	Alomone	ACC-010
TRPC3	Lapin	1/2000	Alomone	ACC-016

TRPC4	Lapin	1/1000	Alomone	ACC-018
TRPC5	Souris	1/200	NeuroMab	75-104
TRPC6	Lapin	1/2000	Alomone	ACC-017

## 8 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad, version 9.0). Tout d'abord, lorsque le nombre d'échantillons était suffisant ( $n \geq 6$ ), la distribution normale de nos échantillons a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Si l'hypothèse de normalité est acceptée, les différences entre deux groupes ont été évaluées à l'aide d'un t-test paramétrique non apparié ou pairé. En cas de petit nombre d'échantillon, ou d'hypothèse de normalité rejetée, un test de Mann-Whitney a été utilisé.

En cas de comparaison entre plus de deux groupes, la distribution ainsi que le nombre d'échantillons ont également été vérifiés. En cas d'hypothèse de normalité vérifiée, une ANOVA à sens unique a été réalisée, suivie, pour la correction du test de comparaison multiple, d'un test de Tukey. En cas de petit nombre d'échantillon, ou d'hypothèse de normalité rejetée, un test de Kruskal-Wallis suivi d'une correction de Dunn's a été réalisé. Afin de prendre en compte également la variabilité entre les différentes cellules d'un même patient, des tests *Nested* ont été effectués pour les résultats de comparaison d'influx SOC. Ils ont suivi la même logique que les tests précédemment expliqués.

Toutes les valeurs sont rapportées en tant que moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Pour toutes les expériences, une valeur  $P < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative, avec  $P \leq 0.05$  (\*),  $P \leq 0.01$  (\*\*),  $P \leq 0.001$  (\*\*\*) et  $P \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

# **EXPOSE DES TRAVAUX**

Ma thèse, axée sur la compréhension du rôle des canaux Orai et TRPC dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire, a été décomposée en deux projets : le premier, concernant le canal calcique Orai1, et un second axé sur les canaux TRPC dans les CML-AP.

## **1<sup>ER</sup> PROJET : ORAI1 INHIBITORS AS POTENTIAL TREATMENTS FOR PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION**

**Auteurs:** **Bastien Masson**, Hélène Le Ribeuz, Jessica Sabourin, Loann Laubry, Emily Woodhouse, Richard Foster, Yann Ruchon, Mary Dutheil, Angèle Boët, Maria-Rosa Ghigna, Vincent Thomas De Montpreville, Olaf Mercier, David J. Beech, Jean-Pierre Benitah, Marc A. Bailey, Marc Humbert, David Montani, Véronique Capuano et Fabrice Antigny

**Publié** le 27/09/2022, Circulation Research

**Doi:** 10.1161/CIRCRESAHA.122.321041

### **1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE**

Les dysfonctions des CML-AP jouent un rôle majeur dans la pathophysiologie de l'HTAP. Ces dysfonctions sont caractérisées par une dérégulation de l'équilibre prolifération/apoptose (prolifération excessive et résistance à l'apoptose), une migration exacerbée et une vasoconstriction. Un des facteurs importants de ces dysfonctions est la perturbation de l'homéostasie calcique qui est reconnue, dans les CML-AP, pour être en partie régulée par le SOCE. Le SOCE est activé en réponse à la déplétion calcique du RE/RS, par deux acteurs majeurs : les protéines STIM, senseur de calcium du RE/RS, et le canal calcique Orai1. Cependant le rôle de ces protéines dans le développement de l'HTAP n'était pas connu au début de ma thèse.

J'ai tout d'abord analysé l'expression et la fonction d'Orai1 dans les CML-AP des patients atteints d'HTAP. *In vitro* et *ex vivo*, j'ai évalué sa participation aux dysfonctions des CML-AP de patient HTAP avec la prolifération, l'apoptose et la migration, ainsi que son rôle dans la régulation de la contraction des AP humaines. J'ai également étudié *in vivo* la contribution d'Orai1 dans le développement de l'hypertension pulmonaire expérimentale à travers trois modèles murins : hypoxie chronique, MCT et sugen-hypoxie.

Tout d'abord, j'ai démontré une augmentation du SOCE, associée à une augmentation de l'expression d'Orai1 (sans modification d'expression de STIM1/2, Orai2 et une

diminution d'Orai3) dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP. Cette augmentation du SOCE n'a pas été retrouvée dans les CE-AP. J'ai ensuite mis en exergue que l'inhibition ou sous-expression d'Orai1 (par siARN ou pharmacologie sélective) a réduit l'hyperprolifération et la migration excessive des CML-AP HTAP.

De plus, j'ai montré que l'inhibition pharmacologique ou par siARN d'Orai1, dont l'expression est augmentée dans les CML-AP HTAP par rapport aux CML-AP contrôles, réduit d'environ 50 % l'activité de la calcineurine dans les CML-AP isolées de patients atteints d'HTAP. J'ai également montré que l'inhibition d'Orai1 augmente l'apoptose induite par un traitement de 15h à la staurosporine, en partie grâce à une action via la caspase9, P38, Akt et la survivine. En association avec l'augmentation du SOCE dans les CML-AP HTAP, l'entrée de  $Ca^{2+}$  mitochondriale lors du SOCE est fortement augmentée dans CML-AP de patients atteints d'HTAP, et la sous-expression d'Orai1 par siARN réduit ce phénomène, suggérant un rôle d'Orai1 dans la dérégulation des fonctions mitochondriales au cours de l'HTAP.

Lors de cette étude, nous nous sommes aussi intéressés aux mécanismes provoquant la surexpression d'Orai1 en condition pathophysiologique. Mes résultats suggèrent une implication au niveau traductionnel/post-traductionnel des MAPK1/2 (augmentés dans l'HTAP) et des facteurs de transcription pléiotropes NFAT et de NFκB. Nous avons également montré que la diminution d'expression de KCNK3 (dont l'expression est diminuée dans l'HTAP) dans les CML-AP contrôles provoquait l'augmentation de l'expression protéique d'Orai1, via MAPK1/2, NFAT et NFκB.

Enfin, *in vivo*, nous avons mis en évidence que l'expression protéique d'Orai1 est augmentée dans les AP de rat en hypoxie chronique. Le traitement curatif par le BTP2 a diminué l'obstruction des vaisseaux pulmonaires et la fibrose du VD, associé à une nette amélioration de l'hypertrophie du VD et des pressions systoliques du VD.

L'étude effectuée sur le modèle MCT a également montré une augmentation de l'expression protéique d'Orai1 dans les AP et CML-AP isolées de rats exposés à la MCT. L'analyse du SOCE dans ces CML-AP a confirmé une augmentation de la fonction associée à l'augmentation d'expression d'Orai1, comme dans les CML-AP humaines isolées de patients atteints d'HTAP. L'ARNm d'Orai1 est également augmenté dans le VD des rats exposés à la MCT, associé à une dérégulation de la localisation d'Orai1. De nouveau, le traitement curatif par le BTP2 a fortement amélioré la condition des rats exposés à la MCT (remodelage vasculaire pulmonaire, hypertrophie du VD, pression systolique du VD, débit cardiaque, résistances pulmonaires totales et fibrose du VD).

Les résultats ont été similaires avec deux autres inhibiteurs spécifiques d'Orai1, le JPIII et le 5J4. Finalement, j'ai aussi confirmé le bénéfice de l'inhibition d'Orai1 par le BTP2 sur un troisième modèle d'HTAP, le modèle Sugén/hypoxie. Ces résultats *in vivo* démontrent l'implication d'Orai1 dans 3 modèles différents d'HTAP ainsi que le bénéfice de l'inhibition d'Orai1 sur le développement de l'HTAP.

À travers des expériences *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, cette étude a permis de démontrer la contribution essentielle du canal calcique Orai1 au développement de l'HTAP.

En outre, les différents essais cliniques en cours sur des inhibiteurs du canal Orai1 (psoriasis en plaques sévère, l'asthme, la pancréatite aiguë et la pneumonie COVID-19) montrent la « *safety* » des inhibiteurs d'Orai1 chez l'Homme. En clinique, les bloqueurs des canaux  $Ca^{2+}$  dépendants du voltage de type L, qui permettent principalement de réguler la vasoconstriction de l'AP, sont efficaces uniquement pour moins de 10 % des patients atteints d'HTAP. En outre, les thérapies actuelles de l'HTAP ne ciblent que la dysfonction endothéliale, et inhiber le canal Orai1 offrirait une alternative anti-remodelage crédible.

Considérant ces éléments et nos résultats, nous pensons que l'inhibition pharmacologique d'Orai1 pourrait permettre une réduction du remodelage vasculaire pulmonaire et cardiaque et ainsi une amélioration de la qualité de vie de patients atteints d'HTAP.

## 2 PUBLICATION



# Orai1 Inhibitors as Potential Treatments for Pulmonary Arterial Hypertension

Bastien Masson<sup>1</sup>, Hélène Le Ribez, Jessica Sabourin<sup>1</sup>, Loann Laubry<sup>1</sup>, Emily Woodhouse, Richard Foster, Yann Ruchon<sup>1</sup>, Mary Dutheil, Angèle Bo et, Maria-Rosa Ghigna, Vincent Thomas De Montpreville<sup>1</sup>, Olaf Mercier, David J. Beech, Jean-Pierre Benitah<sup>1</sup>, Marc A. Bailey<sup>1</sup>, Marc Humbert<sup>1</sup>, David Montani<sup>1</sup>, Véronique Capuano, Fabrice Antigny<sup>1</sup>

**BACKGROUND:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by progressive distal pulmonary artery (PA) obstruction, leading to right ventricular hypertrophy and failure. Exacerbated intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>) signaling contributes to abnormalities in PA smooth muscle cells (PASCs), including aberrant proliferation, apoptosis resistance, exacerbated migration, and arterial contractility. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in PASCs, but its properties in PAH are unclear.

**METHODS:** Using a combination of Ca<sup>2+</sup> imaging, molecular biology, in vitro, ex vivo, and in vivo approaches, we investigated the roles of the Orai1 SOC channel in PA remodeling in PAH and determined the consequences of pharmacological Orai1 inhibition in vivo using experimental models of pulmonary hypertension (PH).

**RESULTS:** Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and Orai1 mRNA and protein were increased in human PASCs (hPASCs) from patients with PAH (PAH-hPASCs). We found that MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase 1/2), NFAT (nuclear factor of activated T cells), and NF B (nuclear factor-kappa B) contribute to the upregulation of Orai1 expression in PAH-hPASCs. Using small interfering RNA (siRNA) and Orai1 inhibitors, we found that Orai1 inhibition reduced store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake, aberrant proliferation, apoptosis resistance, migration, and excessive calcineurin activity in PAH-hPASCs. Orai1 inhibitors reduced agonist-evoked constriction in human PAs. In experimental rat models of PH evoked by chronic hypoxia, monocrotaline, or Sugen/hypoxia, administration of Orai1 inhibitors (N-[4-[3,5-bis(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide [BTP2], 4-(2,5-dimethoxyphenyl)-N-(pyridin-4-yl)methyl]aniline [JPIII], or 5J4) protected against PH.

**CONCLUSIONS:** In human PAH and experimental PH, Orai1 expression and activity are increased. Orai1 inhibition normalizes the PAH-hPASCs phenotype and attenuates PH in rat models. These results suggest that Orai1 should be considered as a relevant therapeutic target for PAH.

**GRAPHIC ABSTRACT:** A graphic abstract is available for this article.

**Key Words:** apoptosis ■ cell movement ■ cell proliferation ■ hypertension, pulmonary ■ mitochondria ■ Orai1 Protein ■ pulmonary artery

In This Issue, see p 725 | Meet the First Author, see p 726 | Editorial, see p 728

**P**ulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive and devastating disease that arises as a consequence of advanced distal pulmonary artery (PA) obstruction (<500  m in diameter), which leads to high pulmonary vascular resistance, right ventricular (RV) hypertrophy, and ultimately right-sided heart failure and death.<sup>1</sup> PAH is defined as a mean PA pressure of >20 mmHg, a pulmonary vascular resistance of >2 Wood units, and a PA wedge pressure of  15 mmHg at rest.<sup>2</sup>

The pathophysiology of PAH is multifactorial, involving PA smooth muscle cell (PASC) dysfunction characterized by hyperproliferation, excessive migration, apoptosis resistance, and vasoconstriction.<sup>1</sup> Current therapeutic strategies for PAH are not curative and focus mainly on controlling endothelial-dependent pulmonary vasomotor tone by targeting 3 major signaling pathways: the prostacyclin, endothelin-1, and nitric oxide pathways.<sup>3</sup> Despite therapeutic improvements, lung transplantation remains

Correspondence to: Fabrice Antigny, PhD, INSERM UMR\_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France.

Email: [fabrice.antigny@inserm.fr](mailto:fabrice.antigny@inserm.fr)

Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/CIRCRESAHA.122.321041>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page e118.

  2022 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at [www.ahajournals.org/journal/res](http://www.ahajournals.org/journal/res)

## Novelty and Significance

### What Is Known?

- Pulmonary arterial (PA) hypertension (PAH) is characterized by exacerbated intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signaling contributing to abnormalities in PA smooth muscle cells.
- Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is involved in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in PA smooth muscle cells, but remains underinvestigated in PAH.

### What New Information Does This Article Contribute?

- Orai1 is increased in human and experimental models of PAH is responsible for the excessive  $\text{Ca}^{2+}$  that contributes to human pulmonary arterial smooth muscle

cell proliferation, migration, apoptosis resistance, mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, and pulmonary vasoconstriction.

- Upregulation of Orai1 is under the control of a MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase 1/2)-NFAT (nuclear factor of activated T cells)-NF $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) signaling axis.
- Pharmacological inhibition of Orai1 in vivo improves pulmonary vascular remodeling, right ventricular fibrosis, and hypertrophy and reduces the development of experimental PAH.

Our study demonstrates that Orai1 is strongly involved in PAH pathogenesis and provides the proof of concept that Orai1 inhibitors could be considered as potential innovative treatments for PAH.

## Nonstandard Abbreviations and Acronyms

<b>Acta1</b>	actin alpha 1
<b>Actn2</b>	actinin Alpha 2
<b>CH</b>	chronic hypoxia
<b>CSA</b>	cardiomyocytes cross-section area
<b>hPASCs</b>	human pulmonary arterial smooth muscle cells
<b>NFAT</b>	nuclear factor of activated T cells
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	nuclear factor-kappa B
<b>PAECs</b>	pulmonary arterial endothelial cells
<b>PAH</b>	pulmonary arterial hypertension
<b>RV</b>	right ventricle
<b>RVSP</b>	right ventricular systolic pressure
<b>SOCE</b>	store-operated $\text{Ca}^{2+}$ entry
<b>STIM</b>	stromal Interaction Molecule
<b>Su/Hx</b>	Sugen/Hypoxia

has been described.<sup>5</sup> Currently, Orai1 is considered as a potential target for several pathological processes, including asthma and psoriasis.<sup>8</sup> However, the role of Orai1 in pulmonary vascular remodeling remains elusive.

In the present study, we investigated the expression and function of Orai1 in human PASCs (hPASCs) isolated from patients with PAH (PAH-hPASCs). We evaluated in vivo the contribution of Orai1 in the development of experimental pulmonary hypertension (PH) caused by chronic hypoxia (CH), monocrotaline, and Sugen/Hypoxia (Su/Hx) exposure in rats.

Overall, we show that Orai1 contributes to pathological phenotype in PAH-hPASCs. These abnormalities contribute to PA remodeling; therefore, pharmacological inhibition of Orai1 could be a relevant new therapeutic approach to treat PAH.

## METHODS

### Data Availability

The authors declare that all supporting data are available within the article and its Supplemental Material.

A detailed description of the Materials and Methods is presented in the Supplemental Material. Detailed descriptions of all materials and methods used in this study, including chemicals, animals and surgical procedures, pulmonary vascular cell culture, Orai1 knockdown, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction with specific primers (Table S1), Western blot with used antibodies (Table S2), immunostaining, immunohistochemistry, histological analysis, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  measurement, Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay, apoptosis measurement, cell proliferation, and cell migration assay, isometric tension measurement echocardiography, Hemodynamic measurements, tissue collection, and statistical analyses are presented in the Supplemental Material.

Variations in the number of animals used in these in vivo experiments have only one reason: hemodynamic measurement is very invasive. Hemodynamic data can be missing because we

the destination therapy for eligible patients. Thus, identifying novel targets is needed to alleviate pulmonary vascular remodeling in PAH.

Cellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) mishandling is a significant cause of PASC dysfunction in PAH.<sup>4,5</sup> Although the role of Orai1 in nonexcitable cells is well established, the role of Orai1-mediated store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  (SOC) entry (SOCE) in excitable cells, such as PASCs, remains unclear. Two major SOC components have been identified: the STIM (stromal interaction molecule family; STIM1 and STIM2) and the Orai1  $\text{Ca}^{2+}$  channel (also called Calcium Release-Activated Calcium Channel Protein 1) (CRACM1 [calcium release-activated calcium modulator 1]).<sup>6,7</sup> The contribution of Orai1-mediated SOCE to the proliferation and migration of systemic endothelial and vascular smooth muscle cells (SMCs)

failed to get them at the time of right heart catheterization or because animals died during the procedures. There is no mortality rate because all missing animals died during right heart catheterization.

## RESULTS

### Enhanced Orai1 Expression and Function in PAH-Lung Tissue and PAH-hPASCs

We first assessed the expression and localization of Orai1 in lung tissues by immunohistochemistry or immunofluorescent staining in paraffin-embedded lung sections from control and patients with PAH. We found Orai1 staining in PASCs and pulmonary arterial endothelial cells (PAECs), with an increased Orai1 staining intensity in remodeled PA from patients with PAH (Figure 1A and 1B). Immunoblots demonstrated higher Orai1 expression in the lungs of patients with PAH compared with control subjects (Figure 1C).

The measure of SOCE was performed in control and PAH-human PAECs (hPAECs) after  $\text{Ca}^{2+}$  store-depletion for 10 minutes with 1  $\mu\text{mol/L}$  thapsigargin in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$ . Then SOCE was elicited by adding 2  $\text{mmol/L}$  extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  medium. We found that SOCE, sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$  content, and Orai1 protein were unchanged in PAH-hPAECs (Figure 1D and 1E).

In opposite, the measure of SOCE in PAH-hPASCs showed an increase in SOCE amplitude with no significant change in SR  $\text{Ca}^{2+}$  content compared to control (Figure 1F). In association with increased SOCE, Orai1 protein expression was increased in PAH-hPASCs (Figure 1G), whereas the expression of Orai2 protein was unchanged, and the expression of Orai3 protein was reduced in PAH-hPASCs (Figure S1).

Because SOCE and Orai1 expression were unchanged in PAH-hPAECs compared to control hPAECs, we have focused the study on the role of Orai1 in PAH-hPASCs.

### Orai1 Knockdown or Orai1 Pharmacological Inhibition Reduces Excessive SOCE in PAH-hPASCs

The use of small interfering RNA (siRNA) against Orai1 (siOrai1) strongly reduced Orai1 mRNA, Orai1 protein, and SOCE (Figure 2A through 2C). Moreover, Orai1 blockers, N-{4-[3,5-bis(Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl}-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide (BTP2) (1  $\mu\text{mol/L}$ , also known as YM58483), which is an established and well-known Orai1 channel blocker,<sup>9</sup> and 4-(2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(pyridin-4-yl)methyl]aniline (JPIII) (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ), a new selective Orai1 blocker,<sup>10</sup> reduce SOCE in PAH-hPASCs and demonstrates the particular importance of Orai1 in SOCE in PAH-hPASCs (Figure 2D). Similarly, in PAH-hPAECs, siOrai1, BTP2, or JPIII reduced SOCE (Figure S2). These

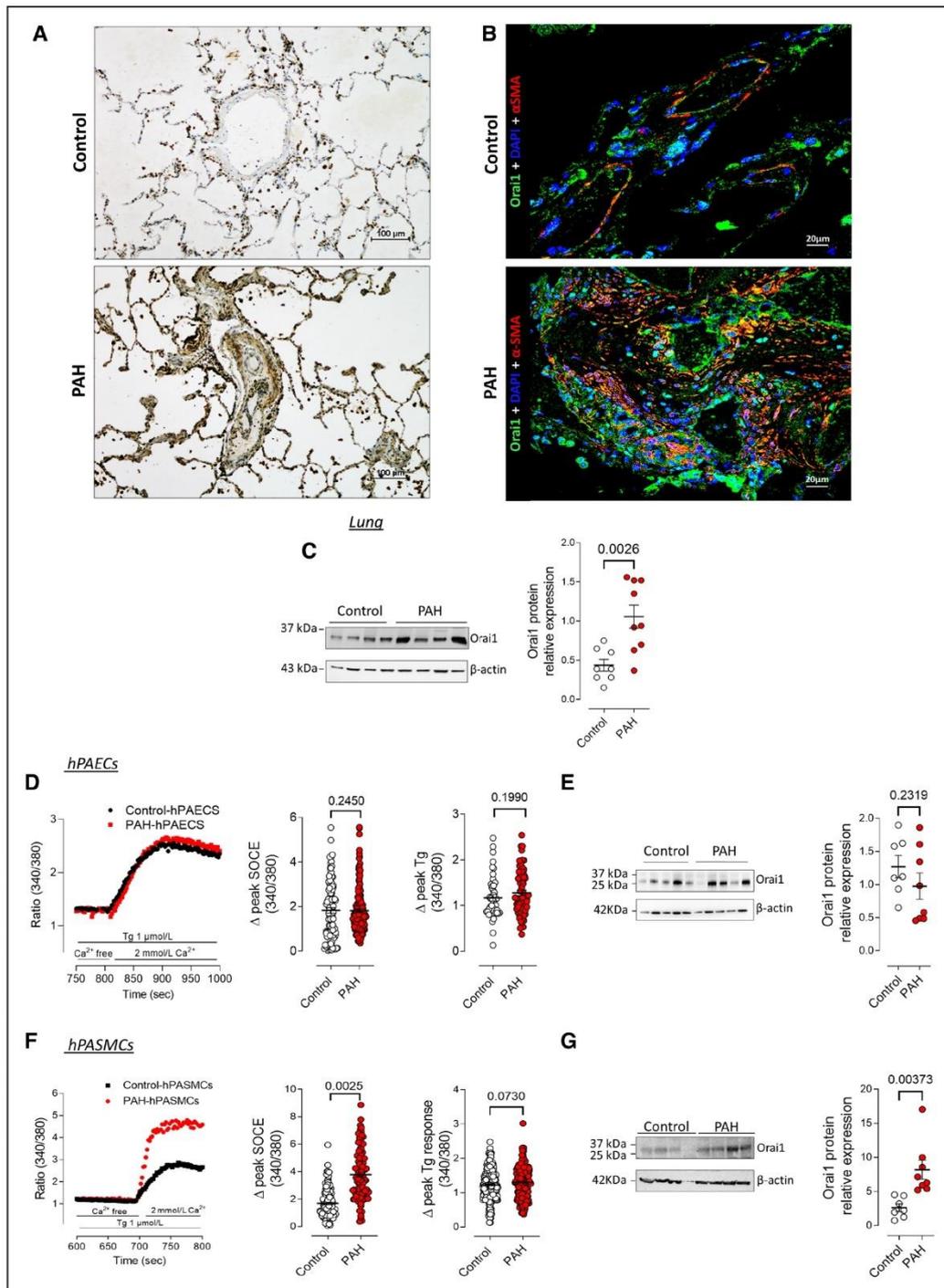
results strongly suggest that the increase in SOCE in PAH-hPASCs resulted from an upregulation in Orai1 expression.

Since STIM1 is the primary activator of Orai1, we analyzed whether STIM1 could act on Orai1-mediated SOCE in PAH-hPASCs. Immunofluorescence and immunoblot analysis confirmed that STIM1 was expressed in PASCs with an unchanged expression in PAH-hPASCs compared with control hPASC (Figure S3A and S3B). Coimmunoprecipitation showed that Orai1 and STIM1 interacted in PAH-hPASCs. This interaction was further enhanced after SR  $\text{Ca}^{2+}$  depletion with thapsigargin (Figure S3C). In addition, the knockdown of STIM1 reduced SOCE in PAH-hPASCs (Figure S3D through S3F). Of note, the expression of STIM2, another isoform of the STIM family that also regulates SOCE,<sup>11</sup> was unchanged in the lungs of patients with PAH (Figure S4A and S4B). The knockdown of STIM2 (Figure S4C) reduced SOCE in PAH-hPASCs by only 20% without impacting the proliferation of PAH-hPASCs (Figure S4D and S4E).

### Orai1 Inhibition Reduced Proliferation, Migratory Capacity, and Antiapoptotic Phenotype of PAH-hPASCs

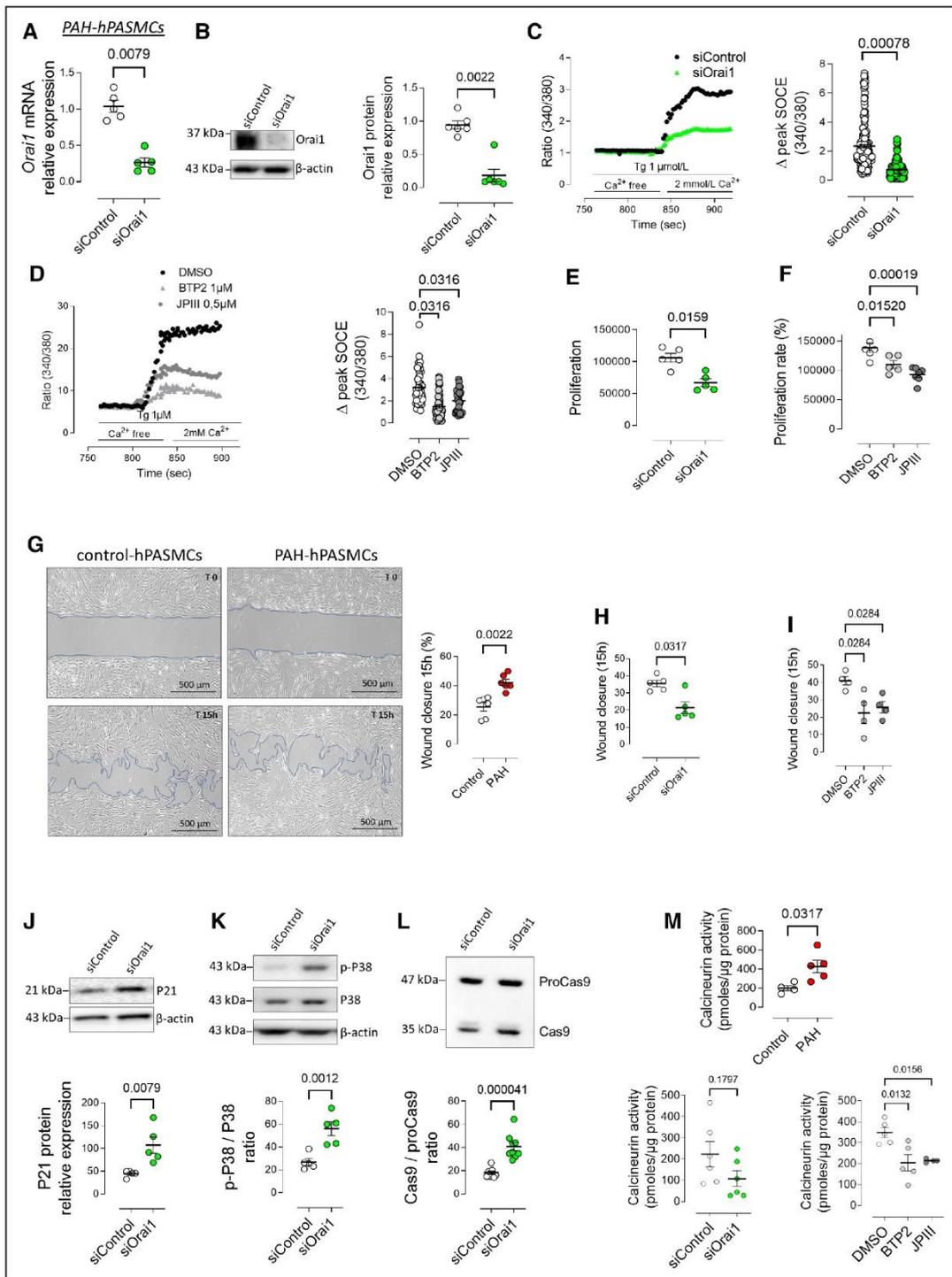
The contribution of increased Orai1-mediated SOCE in the pathological phenotypes of PAH-hPASCs was then investigated. In vitro bromodeoxyuridine (BrdU) assay showed that the PAH-hPASC presented a hyperproliferative phenotype (Figure S5A), as previously described.<sup>12</sup> Inhibition of Orai1 by siRNA or pharmacological inhibition of Orai1 (by BTP2 or JPIII) reduced the proliferation of PAH-hPASCs by 25% to 30% (Figure 2E and 2F). Moreover, PAH-hPASCs showed enhanced migration compared to control hPASCs (Figure 2G), and both siOrai1 and pharmacological Orai1 inhibition reduced aberrant migration of PAH-hPASCs (Figure 2H and 2I and Figure S5B).

In correlation with the reduced proliferation in the siOrai1-treated PAH-hPASC, we found that siOrai1 increased the expression of the cell cycle inhibitor protein, P21<sup>CIP1/Waf1</sup> (P21; Figure 2J), which we previously reported being repressed in PAH-hPASCs.<sup>12</sup> Since PAH-hPASCs exhibit MAPK (mitogen-activated protein kinase) activation, Akt (protein kinase B) activation, and reduced caspase 9 expression, which favors cell proliferation, migration, cell apoptosis, and cell survival pathways,<sup>12</sup> we analyzed the activation status of P42/44, caspase 9, Akt, and P38 (P38 mitogen-activated protein kinases). The knockdown of Orai1 increased the phosphorylation status of P38 (Figure 2K) without any significant changes in total P38 protein level (Figure S5C), in increased caspase 9 cleavage (active form; Figure 2L), or in procaspase 9 level (data not shown). However, knockdown of Orai1 did not affect the expression or activation (assessed by phosphorylation status) of P42/44



**Figure 1. Increased expression of Orai1 and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) in pulmonary arterial hypertension (PAH)-human pulmonary arterial smooth muscle cells (hPASMCs).**

**A**, Expression and localization of Orai1 by immunohistochemistry in paraffin-embedded lung sections from control and patients with PAH. Bar graph=100 μm. **B**, Expression and localization of Orai1 by immunofluorescence staining on paraffin-embedded lung sections from control and patients with PAH. Orai1 staining (green), alpha smooth muscle actin (αSMA) staining (Red) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). Bar graph=20 μm. **C**, Immunoblot of Orai1 expression and quantification in lungs from control and patients with PAH (n=7 for control and 8 for PAH). **D**, SOCE in control human PAECs (hPAECs) and PAH-hPAECs. Quantification of SOCE amplitude and quantification of thapsigargin (Tg)-induced Ca<sup>2+</sup> release (N=9 patients; n=129 control cells and 101 PAH cells). **E**, Immunoblot and quantification of Orai1 expression in PAH-hPAECs (n=7 for control and 8 for PAH). **F**, SOCE in control hPASMCs and PAH-hPASMCs. Quantification of SOCE amplitude and quantification of Tg-induced Ca<sup>2+</sup> release (N=9 patients; n=107 control cells and 153 PAH cells). **G**, Immunoblot and quantification of Orai1 expression in PAH-hPASMCs (N=7 for control and 8 for PAH). Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.



**Figure 2.** Increase in Orai1 expression in pulmonary arterial hypertension (PAH)-human pulmonary arterial smooth muscle cells (hPASMCs) is associated with an exaggerated store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE), proliferation, migration, higher apoptosis resistance, and calcineurin activity.

PAH-hPASMCs were transfected with small interfering RNA (siRNA) against Orai1, and (A) knockdown efficiency was assessed by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) (n=5 for each condition) and (B) by immunoblot (n=6 for each condition). C, Consequence of Orai1 knockdown in PAH-hPASMCs on SOCE amplitude (N=7 patients; n=174 siControl cells and 121 siRNA against Orai1 [siOrai1] cells). D, Consequence of Orai1 inhibition using 1  $\mu$ mol/L N-[4-[3,5-bis-(Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide (BTP2) or 0.5  $\mu$ mol/L 4-(2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(pyridin-4-yl)methyl]aniline (JPIII) on SOCE amplitude (N=5 different patients; dimethyl sulfoxide (DMSO) 45 cells, BTP2 61 cells, and JPIII 32 cells). E, Consequence of Orai1 knockdown on the proliferation rate (bromodeoxyuridine [BrdU] assay) of PAH-hPASMCs (n=5 patients). F, Consequence of pharmacological (Continued)

or p308Akt (Figure S5D and S5E). We have verified that the transfection agent did not affect Orai1, Akt1, Cas9, P38, or P21 expression (Figure S6A and S6B).

These data suggest that increased Orai1 expression in PAH-hPASCs contributes to the pathological phenotype by decreasing P21 expression, P38 signaling, and caspase 9 activity.

An important  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent molecule controlling many cell functions is the serine/threonine phosphatase calcineurin.<sup>13</sup> While the amount of calcineurin protein was unchanged in PAH-hPASCs compared to control hPASCs (Figure S6C), a 2-fold increase in calcineurin activity was found in PAH-hPASCs compared to control hPASCs. Moreover, Orai1 knockdown or Orai1 pharmacological inhibition (by BTP2 or JPIII) reduced calcineurin activity by 50% (Figure 2M). Thereby, enhanced Orai1 function in PAH-hPASCs contributes to over-activity of calcineurin, to higher proliferative rate and migratory capacity.

### Orai1 Channels Contributed to PA Contraction

The role of PASCs is to contract and thereby constrict the PA. The PA from patients with PAH is characterized by vasoconstriction.<sup>14</sup> Thus, we assessed the role of Orai1 in human PA tone. BTP2 or JPIII did not affect contraction evoked by increasing doses of KCl (10–90 mmol/L; Figure 3A through 3C), while BTP2 or JPIII induced a shift to the right of the dose-response curve for U46619, a thromboxane A2 receptor agonist (0.1–3  $\mu\text{mol/L}$ ), indicating that the Orai1 channel contributes to PA constriction induced by thromboxane A2 mimetics (Figure 3B through 3D).

### Orai1-Mediated SOCE Contributes to Mitochondrial $\text{Ca}^{2+}$ Homeostasis

As mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis can modulate cell survival,<sup>15</sup> we measured the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake during SOCE using the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Rhod2-AM. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was increased in PAH-hPASCs compared with control hPASCs (Figure 4A). In PAH-hPASCs, the siOrai1 reduced mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake (Figure 4B) without consequences on mitochondrial membrane potential, mitochondrial shape, and mitochondrial ATP production (Figure S7). These results suggest that Orai1 could partially enhance the survival of PAH-hPASCs by modulating mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake.

### Orai1 Knockdown Aggravates Staurosporine-Induced Apoptosis in PAH-hPASCs

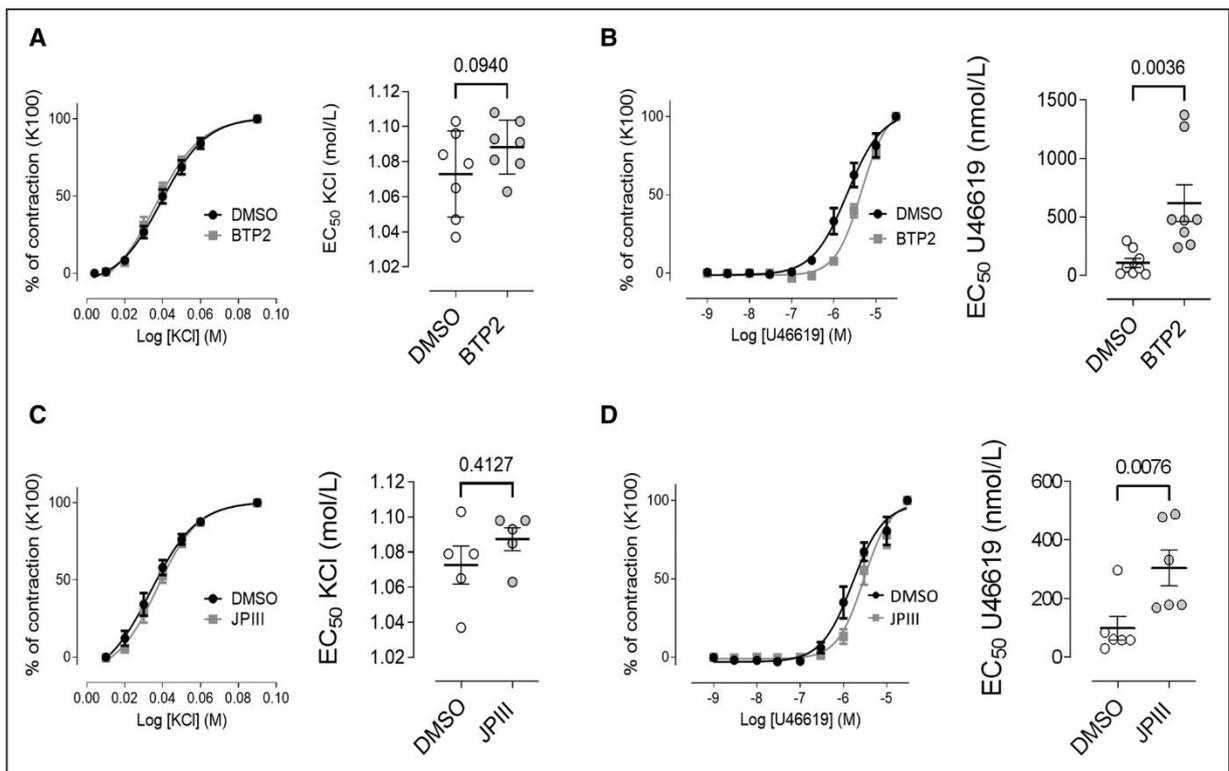
To further evaluate the putative role of Orai1 in the apoptosis resistance of PAH-hPASCs, we exposed cells to staurosporine (apoptosis inducer) at 1  $\mu\text{mol/L}$  for 20 minutes or 50 nmol/L overnight. During 20 minutes of staurosporine exposure, Orai1 knockdown did not influence the apoptotic status of PAH-hPASCs (Figure S8). In contrast, for longer-term exposure to staurosporine (overnight), the knockdown of Orai1 increased the number of Annexin V-positive PAH-hPASCs, which suggested more apoptotic cells as well as a concomitant decrease in the number of live PASCs (Figure 4C and 4D). An increase in Annexin V-positive cells was also found after BTP2 treatment (Figure 4E and 4F).

Moreover, the staurosporine overnight exposure of siOrai1-transfected PAH-hPASCs increased the caspase 9/procaspase 9 ratio and the pP38/P38 ratio (Figure 4G and 4H), whereas Akt expression/activation and survivin expression were decreased (Figure 4I through 4K). There was no significant difference between siControl and the transfection agent (Figure S9). These results indicate that low expression of Orai1 makes PAH-hPASCs more sensitive to apoptosis by overactivation of caspase 9 and P38 and reduced Akt/survivin signaling axis. Therefore, overexpression of Orai1 in PAH-hPASCs contributes to apoptosis resistance of PAH-hPASCs, and its knockdown or inhibition of Orai1 counteracts this pathological phenotype.

### MEK1/2 Signaling, Nuclear Factor of Activated T Cells, and Nuclear Factor-Kappa B Regulate Orai1 Expression or Function in hPASCs

As PAH-hPASCs are characterized by overactivation of MAPK (Mitogen-activated protein kinases) (P42/44, P38) and prosurvival pathways (Akt, calcineurin), we investigated the contribution of these signaling pathways in the increased expression or function of Orai1. We found that the amount of Orai1 protein was reduced in PAH-hPASCs treated with MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase 1/2) inhibitor (UO126), whereas treatment with P38 and Akt inhibitors (SB203580 and MEK2206, respectively) had no consequence on the amount of Orai1 protein (Figure 5A). At the mRNA level, we found that UO126 treatment did not change significantly the Orai1 mRNA expression in PAH-hPASCs

**Figure 2 Continued.** inhibition of Orai1 on the proliferation rate of PAH-hPASCs treated for 24 h with DMSO or BTP2 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) or JPIII (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ; n=5 patients for DMSO and BTP2 and 7 patients for JPIII). **G**, Wound closure images (15 h after initiation) and percentage wound closure in control hPASCs and PAH-hPASCs (n=6 patients for each condition). **H**, Consequence of Orai1 knockdown on PAH-hPASC motility/invasion (n=5 patients). **I**, Consequence of Orai1 inhibition on PAH-hPASC mobility/invasion (n=4 for each condition). **J–L**, Immunoblots and quantification of P21<sup>CIP1/Waf1</sup> (P21) (n=5 patients), p-P38 (phospho-P38 mitogen-activated protein kinases) and P38 (n=5 patients), proCas9 (procaspase 9) and cleaved Caspase 9 (n=9 patients) in PAH-hPASCs transfected with siControl or siOrai1. **M**, Quantification of calcineurin activity in control hPASCs and PAH-hPASCs (n=6 patients). Consequence of Orai1 knockdown (n=6 for control and patients with PAH) or inhibition (n=5 patients) in PAH-hPASCs on calcineurin activity. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.



**Figure 3. The Orai1 channel contributes to pulmonary artery (PA) contraction.**

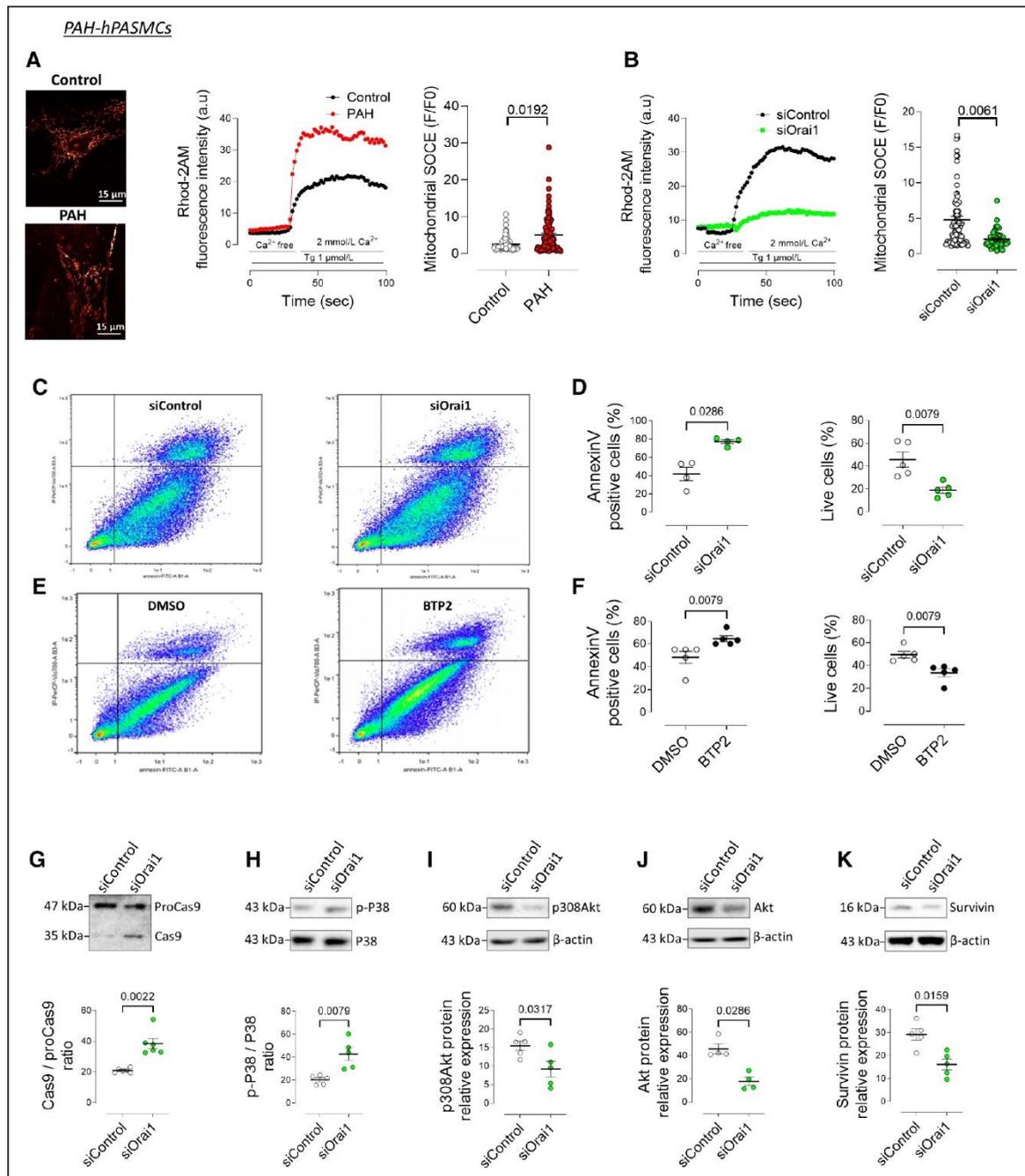
**A, left**, A dose-response curve (normalized to K100) was established by applying increasing concentrations of KCl to isolated human PAs from control subjects in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO) or 1  $\mu\text{mol/L}$  N-[4-[3,5-bis(Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide (BTP2). **A, right**, Corresponding quantification of  $\text{EC}_{50}$  ( $n=7$  patients). **B, left**, A dose-response curve (normalized to K100) was established by applying increasing concentrations of U46619 (a thromboxane A2 mimetic) on isolated human PAs from control subjects in the presence of DMSO or 1  $\mu\text{mol/L}$  BTP2. **B, right**, Corresponding quantification of  $\text{EC}_{50}$  values ( $n=8$  patients). **C, left**, A dose-response curve (normalized to K100) was established by applying increasing concentrations of KCl to isolated human PAs from control subjects in the presence of DMSO or 1  $\mu\text{mol/L}$  4-(2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(pyridin-4-yl)methyl]aniline (JP111). **C, right**, Corresponding quantification of  $\text{EC}_{50}$  ( $n=5$  patients). **D, left**, A dose-response curve (normalized to K100) was established by applying increasing concentrations of U46619 on isolated human PAs from control subjects in the presence of DMSO or 1  $\mu\text{mol/L}$  JP111. **D, right**, Corresponding quantification of  $\text{EC}_{50}$  values ( $n=6$  patients). Statistical tests and exact  $P$  values are provided in Table S5.

(Figure 5B), suggesting that MEK1/2 regulates Orai1 expression by translational/post-translational regulation. In accordance with the decreased Orai1 expression in UO126-treated cells, SOCE amplitude was reduced following this treatment (Figure S10A).

We also evaluated the contribution of two major transcription factors, NFAT (nuclear factor of activated T cells) and NF $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), in regulating Orai1 expression. The protein expression of Orai1 and SOCE amplitude were decreased in PAH-hPASMCs, treated with NFAT inhibitor (MCV1 [Maleimido-conjugated VIVIT 1]) or NF $\kappa$ B inhibitor Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) (Figure 5C, Figure S10B), without any significant change in Orai1 mRNA level (Figure 5D). These results suggest that the calcineurin/NFAT axis and NF $\kappa$ B regulate the amount of stable Orai1 protein by a translational/post-translational mechanism.

Since decreased KCNK3 (potassium channel subfamily K member 3) and BMPR2 (bone morphogenetic protein receptor type 2) are a hallmark of different forms of PAH, we used siRNA against BMPR2 or KCNK3 in

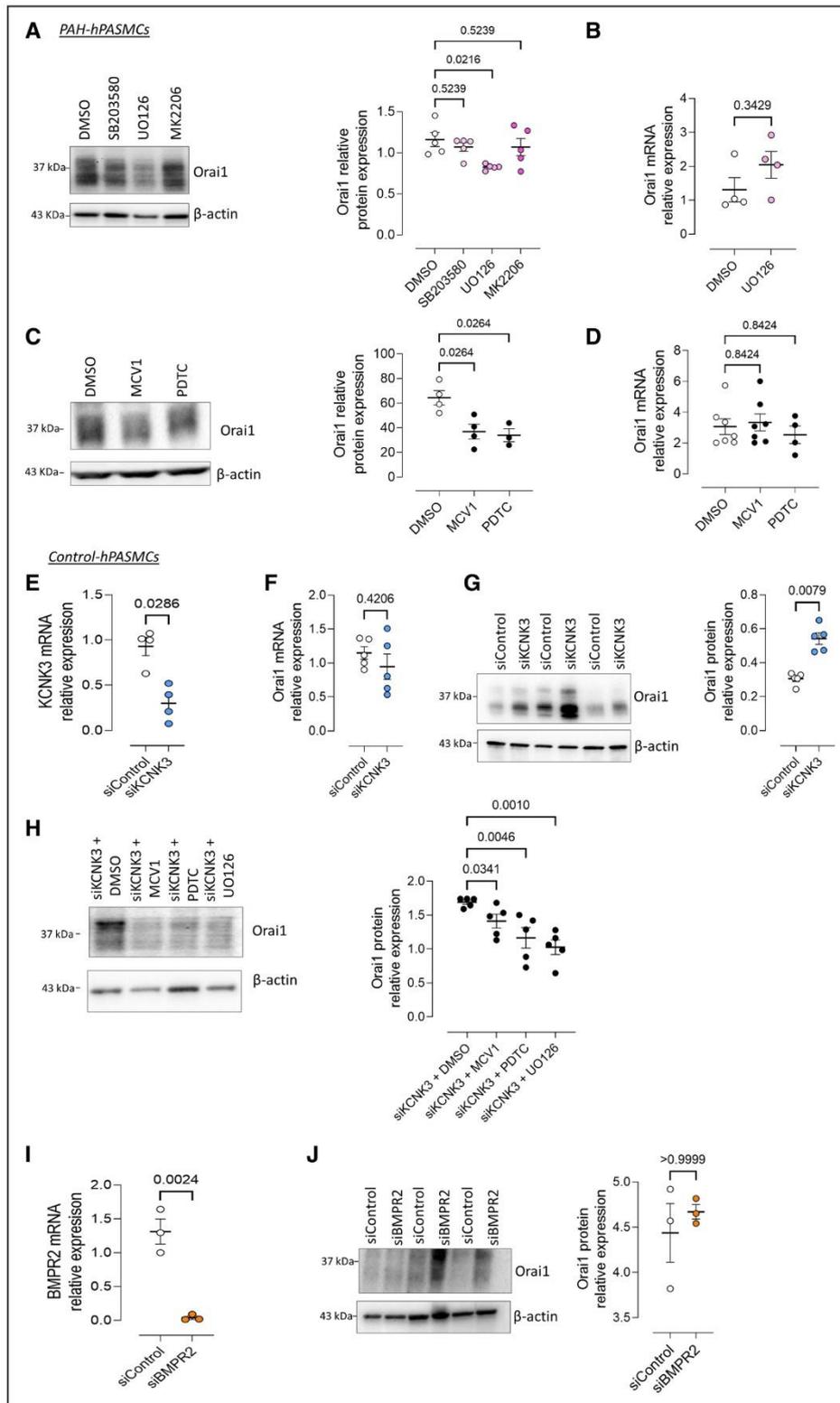
control hPASMCs to determine whether reduced KCNK3 or BMPR2 expression acts on the Orai1 expression. After validating our siRNA by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) (Figure S5E), we found that siRNA against KCNK3 (siKCNK3) had no effect significant consequences on Orai1 mRNA expression but increased Orai1 protein expression (Figure 5F and 5G), suggesting translational/post-translational control. This appears, at least in part, to be mediated by MEK1/2, NFAT, and NF $\kappa$ B pathways since the treatment with UO126, MCV1 or PDTC reduced the increase of Orai1 protein amount induced by KCNK3 knockdown (Figure 5H). Contrary to KCNK3, the knockdown of BMPR2 in control hPASMCs (Figure 5I) did not change significantly the amount of Orai1 protein (Figure 5J). This result indicates that the loss of BMPR2 signaling is not related to Orai1 expression in PAH-hPASMCs. Moreover, we did not find a significant change in Orai1 expression in control hPASMCs exposed to endothelin-1 or PDGF (platelet-derived growth factor; Figure S10C). These results indicated that increased MEK1/2, NFAT, NF $\kappa$ B activities, and decreased KCNK3 expression could



**Figure 4. Knockdown of Orai1 reduces mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake and enhances apoptosis in pulmonary arterial hypertension (PAH)-human pulmonary arterial smooth muscle cells (hPASCs) exposed to staurosporine.**

**A**, Measurement of mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake using Rhod-2-AM fluorescent  $Ca^{2+}$  probes and quantification of mitochondrial  $Ca^{2+}$  entry during store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE) in control and PAH-hPASCs (N=8 patients; n=88 mitochondria for control and 98 for PAH). **B**, Consequence of the Orai1 knockdown on mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake during SOCE in PAH-hPASCs (N=5 patients; n=70 mitochondria for control and 50 for PAH)). **C**, Dot plots of Annexin V+PI dual-labeling in small interfering (siRNA) control (siControl) or siRNA against Orai1 (siOrai1)-transfected PAH-hPASCs exposed to 50 nmol/L staurosporine overnight. **D**, Percentage of Annexin V-positive and live PAH-hPASCs transfected with siControl or siOrai1 (n=5 patients). **E**, Dot plots of Annexin V and PI dual-labeling of PAH-hPASCs exposed overnight to 50 nmol/L staurosporine with dimethyl sulfoxide (DMSO) or N-[4-[3,5-bis(Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide (BTP2). **F**, Percentage of Annexin V-positive or live PAH-hPASCs treated with DMSO or BTP2 (n=5 patients). **G–K**, Immunoblots and quantification of Cas9 (caspase 9)/proCas9 (procaspase 9; n=6 patients), p-P38/P38 (n=5 patients), p308Akt (n=5 patients), Akt (protein kinase B) (n=4 patients), and survivin (n=4 patients) in PAH-hPASCs transfected with siControl or siOrai1 and exposed overnight to 50 nmol/L staurosporine. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5. MCT indicates monocrotaline; and RV, right ventricular.

Downloaded from <http://ahajournals.org> by on February 13, 2023



**Figure 5. MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase 1/2), NFAT (nuclear factor of activated T cells), and NFκB (nuclear factor-kappa B) upregulate Orai1 expression or function in human pulmonary arterial smooth muscle cells (hPASCs).** **A**, Immunoblots and quantification of Orai1 in pulmonary arterial hypertension (PAH)-hPASCs treated 48h with dimethyl sulfoxide (DMSO; n=5 patients), P38 inhibitor (SB203580 1 μmol/L, n=5 patients), MEK1/2 inhibitor (UO126, 1 μmol/L, n=5 patients), (Continued)

mediate increased Orai1 expression and function by translational/post-translational regulations in PAH.

### In Vivo Pharmacological Orai1 Inhibition Reduces the Development of CH-Induced PH in Rats

Since Orai1 overexpression/function contributes to aberrant PAH-hPASMCs phenotypes, we next assessed the consequences of in vivo pharmacological inhibition of Orai1 in experimental PH rats models. Like in human lung tissue, immunofluorescent staining showed the expression of Orai1 in PASMCs from normoxic and CH rats with a higher fluorescence intensity in CH lung tissue (Figure 6A). Immunoblot showed an increase in Orai1 protein amount in CH lung tissue (Figure 6B). We then administered BTP2 in vivo from week 2 to week 3 to CH rats (Figure 6C). In the CH+BTP2 group, we found an improvement in RV hypertrophy (Fulton index, Figure 6D) and in RV systolic pressure (RVSP, Figure 6E) compared with the CH+dimethyl sulfoxide (DMSO) group. Cardiac output and heart rate were similar in all experimental groups (Figure 6F and Table S3). Total pulmonary resistance was significantly reduced in the CH+BTP2 group compared with the CH+DMSO group (Figure 6G). The BTP2 treatment corrected aberrant pulmonary vascular remodeling induced by CH in rats (Figure 6H and 6I). While BTP2 treatment reduced the p-P38/P38 ratio in remodeling lungs from CH rats, no significant change in P42/44, Akt1 activation, or twist1 signaling pathway was observed (Figure S11A and S11B).

Since Orai1 may also contribute to the left ventricular (LV) remodeling,<sup>10</sup> we investigated the putative role of Orai1 on RV remodeling. We found unchanged RV Orai1 mRNA levels in CH rats compared with control rats (Figure 6J) and similar localization of Orai1 (Figure 6K). However, in association with the reduction of RV blood pressure and pulmonary vascular remodeling, we measured a decrease in CH-induced RV fibrosis and a decrease in cardiomyocyte cross-section area (CSA) in CH+BTP2 animals (Figure 6L and 6M). This RV dysfunction may result from a defect in cardiomyocyte apoptosis since Caspase9 protein expression was reduced in CH+BTP2 animals (Figure S11C) but was unrelated to Akt1 signaling (Figure S11D). Associated with the reduction of RV hypertrophy in CH+BTP2 animals, we found a reduction in mRNA expression of cardiac hypertrophic markers *NPPB* (BNP [brain natriuretic peptide]), *Acta1*

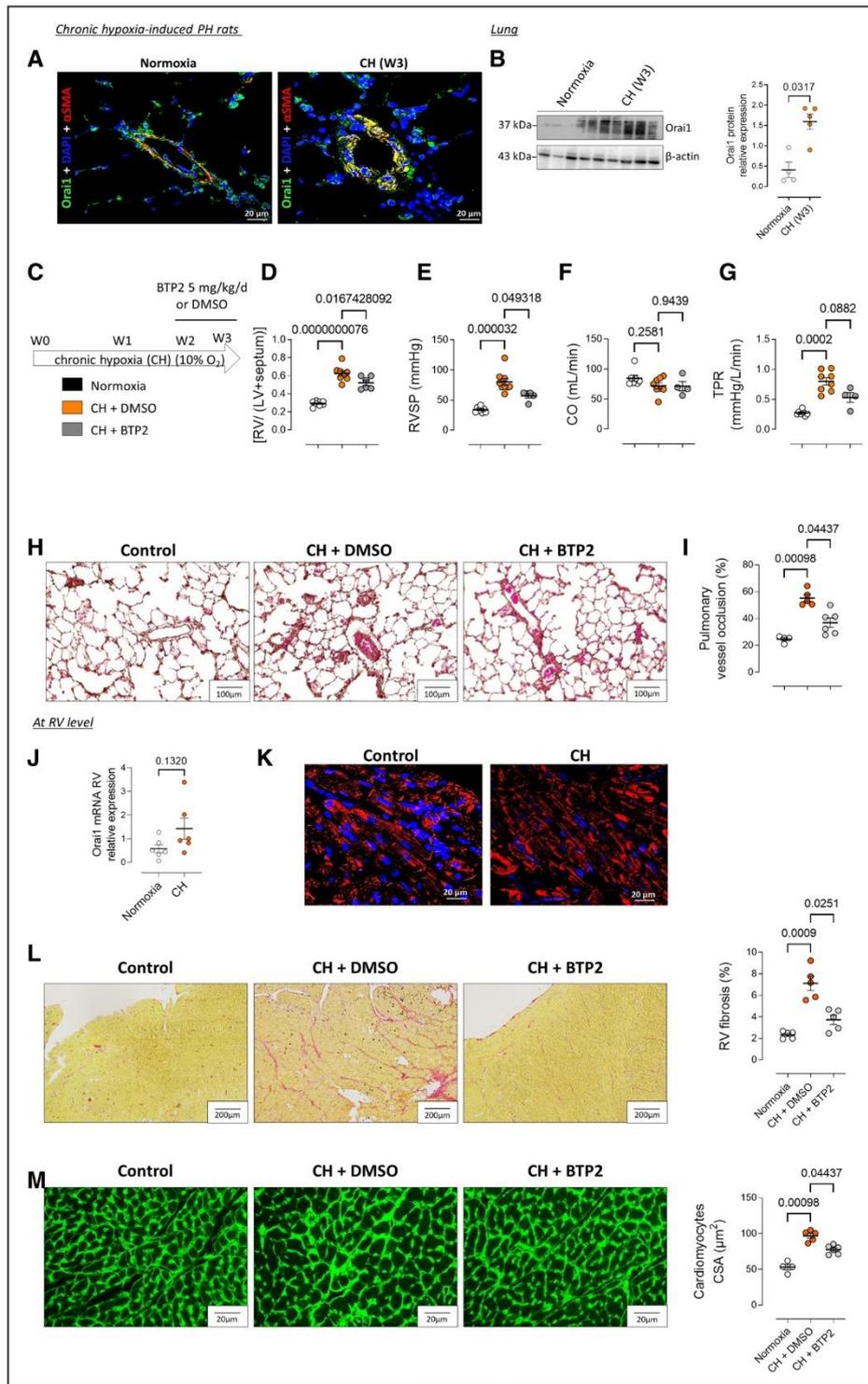
(actin alpha 1), and *Actn2* (actin alpha 2; Figure S11E). Together, these results indicate that pharmacological blockade of Orai1 reduces CH-induced PH in rats.

### In Vivo Pharmacological Orai1 Inhibition Reduces the Development of Monocrotaline-Induced PH in Rats

Orai1 immunostaining in lungs from control and monocrotaline (3 weeks) rats revealed an expression in PASMCs (Figure 7A). Moreover, Orai1 mRNA and protein expression were increased in PAs isolated from monocrotaline rats compared with control rats (Figure 7B and 7C). We also found an increase in Orai1 expression in monocrotaline-PASMCs associated with an increased SOCE (Figure 7D and 7E). The use of BTP2 or JPIII reduced monocrotaline-enhanced SOCE (Figure 7F), confirming that these inhibitors are also effective in inhibiting Orai1 from rats. The in vivo pharmacological inhibition of Orai1 (Figure 7G) improved RV hypertrophy (Figure 7H), RVSP (Figure 7I), cardiac output (Figure 7J), and total pulmonary resistance (Figure 7K) compared to monocrotaline+DMSO group. BTP2 treatment comprehensively corrected aberrant pulmonary vascular remodeling (Figure 7L and 7M). This remodeling was unrelated to MAPK (p42-44, P38) activation (Figure S12A and S12B). However, the effect of BTP2 in monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling may result from dysregulation of Akt and twist signaling that were increased and decreased, respectively (Figure S12A and S12B).

In RV from monocrotaline-PH rats, mRNA Orai1 level was increased and associated with altered localization of Orai1 (more localized at cardiomyocyte junctions, Figure 7N and 7O), suggesting dysregulation of Orai1 in RV cardiomyocytes from monocrotaline-PH as we previously suspected.<sup>16</sup> Additionally, we found that BTP2 reduces the monocrotaline-induced RV fibrosis and RV cardiomyocytes CSA (Figure 7P). As BTP2 effect in CH rat model, monocrotaline-induced PH Orai1 inhibition by BTP2 reduced mRNA expression of *NPPB*, *NPPA* (atrial natriuretic peptide), *Acta1*, *Actn2*, and caspase 9 protein expression without significant change in Akt expression and activation (Figure 7Q and Figure S12C and S12E). No significant change in heart rate and stroke volume were observed between monocrotaline+DMSO and monocrotaline+BTP2 groups (Table S3). These results demonstrate that pharmacological inhibition of Orai1 reduces PH development in rats exposed to monocrotaline.

**Figure 5 Continued.** and AKT inhibitor (MK2206 1  $\mu\text{mol/L}$ , n=5 patients). **B**, Quantification of Orai1 mRNA expression in PAH-hPASMCs treated with DMSO or UO126 (n=4 for each condition). **C**, Immunoblots and quantification of Orai1 in PAH-hPASMCs treated 48h with DMSO (n=4), NFAT inhibitor (MCV1 [Maleimido-conjugated VIVIT 1] 1  $\mu\text{mol/L}$ , n= 4) and NF $\kappa$ B inhibitor (Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate [PDTC], 1  $\mu\text{mol/L}$ ; n=3). **D**, Quantification of Orai1 mRNA expression in PAH-hPASMCs treated with DMSO, MCV1, or PDTC (n=7 for DMSO and MCV1 and 4 for PDTC). Consequence of the KCNK3 knockdown on KCNK3 (potassium channel subfamily K member 3) expression (n=4 patients); **E**, Consequence of KCNK3 knockdown on Orai1 mRNA expression (n=5 patients); **F**, Orai1 protein expression (**G**; n=5 patients) in control hPASMCs. **H**, Quantification of Orai1 protein expression in control hPASMCs transfected with siRNA against KCNK3 (siKCNK3) in the presence of DMSO, MCV1, PDTC, and UO126 (n=5 patients). **I**, Validation and consequence of the BMPR2 (bone morphogenetic protein receptor type 2) knockdown on BMPR2 (n=3 patients). **J**, The consequence of BMPR2 knockdown on Orai1 protein expression (n=3 patients). Statistical tests and exact *P* values are provided in Table S5. siControl indicates small interfering RNA control.



**Figure 6. In vivo pharmacological inhibition of Orai1 with BTP2 reduces the development of chronic hypoxia (CH)-induced pulmonary hypertension (PH) at pulmonary and right ventricular (RV) levels.**

**A**, Localization of Orai1 expression by immunofluorescence staining of paraffin-embedded lung sections from control and CH rats after 3 wk (W3) hypoxia. In PAs from control rats, Orai1 staining (green) was localized to pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs; red). Bar graph=20 µm. **B**, Immunoblot images and quantification of Orai1 expression in lung tissue from control and CH rats (n=4 for the normoxia group and 5 for the CH group). **C**, In vivo experimental design. Rats were maintained in CH for 3 wk, and N-[4-[3,5-bis(Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide (BTP2) (5 mg/kg per day) or dimethyl sulfoxide (DMSO) was administered during the 7 days between week 2 (W2) and W3 by intraperitoneal injection. (Continued)

## In Vivo Pharmacological Orai1 Inhibition Reduces the Development of Su/Hx-Induced PH in Rats

Finally, in Su/Hx-induced PH in rats, we also found a benefit in Orai1 inhibition by BTP2 (Figure 8A). In the Su/Hx+BTP2 group, RV hypertrophy (Figure 8B), RVSP (Figure 8C), cardiac output (Figure 8D), and total pulmonary resistance (Figure 8E) were improved compared to Su/Hx+DMSO group. We also found that BTP2 treatment in Su/Hx animals reduced pulmonary vascular remodeling, RV fibrosis, and RV CSA (Figure 8F and 8H) in association with a reduced mRNA expression of *NPPB*, *NPPA* and *Actn2* (Figure S13). No significant change in heart rate and stroke volume were observed between Su/Hx+DMSO and Su/Hx+BTP2 group (Table S3). Therefore, in vivo Orai1 inhibition reduces PH in Su/Hx rats.

To confirm the potential therapeutic benefit of Orai1 inhibition in PH, we administered JPIII to monocrotaline rats. Due to the short in vivo half-life of JPIII,<sup>10</sup> we assigned continuous delivery of vehicle (DMSO) or JPIII by osmotic mini-pump from week 1 to week 3 (Figure S14A). In the monocrotaline+JPIII group, RV hypertrophy, RVSP, total pulmonary resistance, pulmonary vascular remodeling, RV fibrosis, and RV cardiomyocytes CSA were reduced (Figure S14B through S14I). No significant change in heart rate and stroke volume was observed between monocrotaline+DMSO and monocrotaline+JPIII groups (Table S3). We also confirmed the benefit of Orai1 inhibition in monocrotaline rats by administering a third Orai1 inhibitor (N-[[[6-Hydroxy-1-naphthalenyl]amino]thioxomethyl]-2-furan-carboxamide, herein referred as 5J4).<sup>17</sup> We administered 5J4 from W2 to W3 (Figure S15A). 5J4 treatment attenuated the development of PH (RV blood pressure, RV hypertrophy, pulmonary vascular remodeling, RV fibrosis, RV cardiomyocytes CSA, and no significant change in heart rate (Figure S15B through S15I, Table S3).

## DISCUSSION

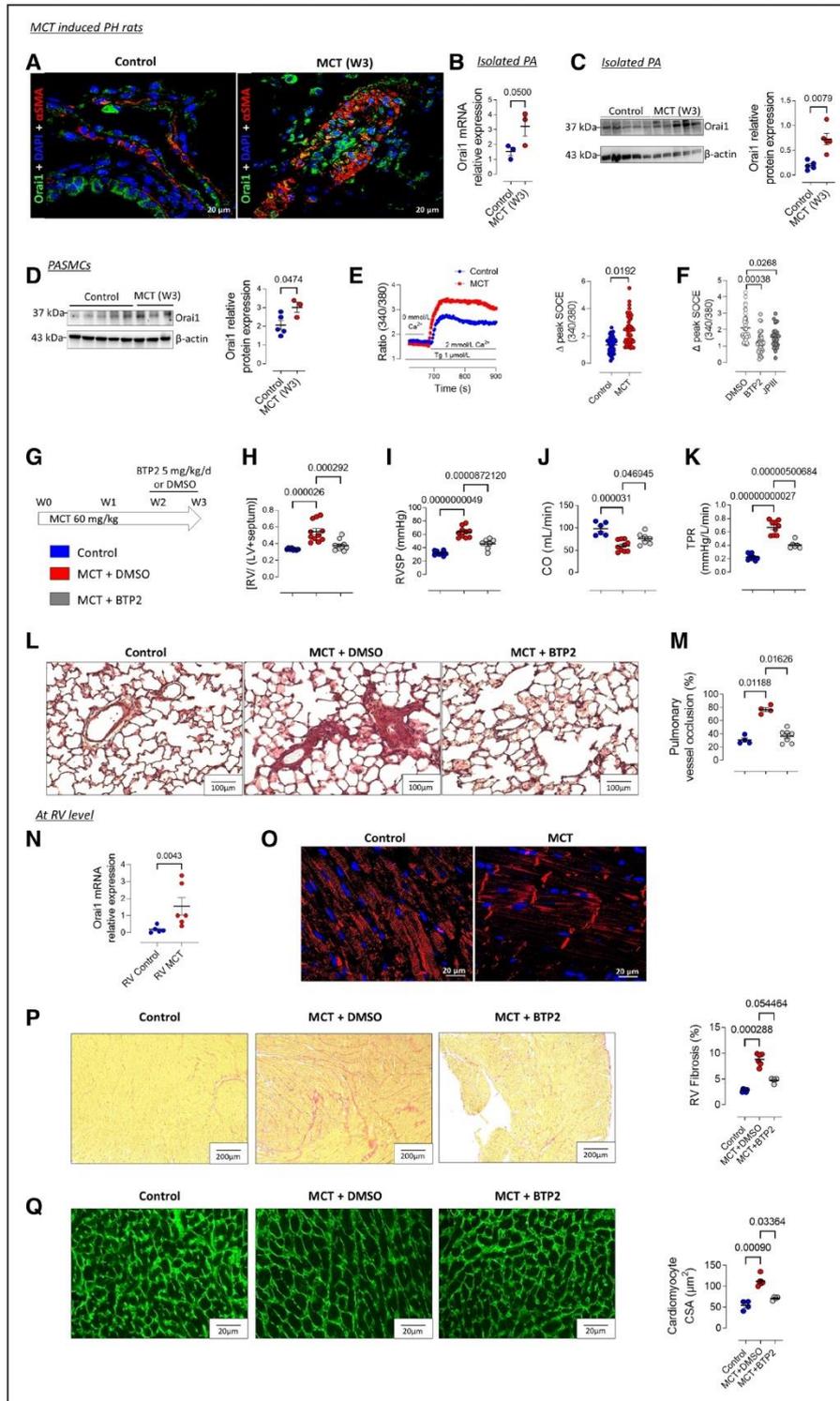
Using a combination of Ca<sup>2+</sup> imaging, molecular biology, in vitro, ex vivo, and in vivo approaches, we found

evidence of an essential contribution of the Orai1 Ca<sup>2+</sup> channel in the development of PAH. First, we found that increased Orai1 expression/function contributes to increased hPAMSCs proliferation, migration, apoptosis resistance, and pulmonary vasoconstriction. Second, we showed that Orai1 overactivation highly contributes to increasing calcineurin activity in PAH-hPAMSCs. Third, our study uncovered that Orai1 overexpression and overactivity could be partly attributed to MAPKinase signaling pathways, NFAT, and NFκB activity. Fourth, we showed in PAH-hPAMSCs that Orai1 over-activity mediated the elevation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. Fifth, we highlighted that in vivo pharmacological Orai1 inhibition using 3 inhibitors (BTP2, JPIII, and 5J4) attenuates the development of PH in 3 different experimental models. Finally, in vivo Orai1 inhibition improves RV fibrosis and hypertrophy in experimental PAH animals.

## Orai1 Expression and Regulation in PAMSCs

Several studies have shown the presence of Orai1 in human, mouse, and rat PAMSCs, and found that SOCE amplitude is increased in hPAMSCs and rat PAMSCs after exposure to hypoxia.<sup>5</sup> In this study, we show that Orai1 expression is increased in PAH-hPAMSCs and that pharmacological inhibition or knockdown of Orai1 reduces Orai1-induced increase in SOCE amplitude. Also, in proliferative rat aortic SMCs, Orai1 expression is higher than in contractile rat aortic SMCs.<sup>18</sup> Wang et al. demonstrated that HIF1α (hypoxia-inducible factor 1 alpha) upregulated the expression of Orai1 in lung cancer cells.<sup>19</sup> We have previously shown an upregulation of HIF1α in patients with PAH<sup>20</sup> and in KCNK3 knock-down condition,<sup>20</sup> which may contribute to Orai1 overexpression in PAH-hPAMSCs. Moreover, PDGF, which is also increased in PAH, enhances Orai1 expression and function in hPAMSCs via overactivation of the Akt/mTOR pathway.<sup>21</sup> In PAH-hPAMSCs, our pharmacological approach showed that MEK1/2, NFAT, and NFκB (nuclear factor-kappa B) signaling regulate the Orai1 protein expression at the translational/post-translational level unrelated to P38 and Akt signaling. In control hPAMSCs, we discovered that KCNK3 partly controls translational/post-translational Orai1 expression and not

**Figure 6 Continued.** **D**, Fulton index (RV+[left ventricular (LV)+septum]; n=8 for the normoxia, n= 10 for CH+DMSO group and 5 for the CH+BTP2 group). **E**, RV systolic pressure (RVSP) in mmHg (n=8 for the normoxia group, 10 for the CH+DMSO group, and 5 for the CH+BTP2 group). **F**, Cardiac output (CO) in mL/min (n=7 for the normoxia group, 5 for the CH+DMSO group, and 4 for the CH+BTP2 group). **G**, Total pulmonary resistance (TPR; n=7 for the Normoxia group, 5 for the CH+DMSO group, and 4 for the CH+BTP2 group). **H**, Hematoxylin/eosin/Safran staining of paraffin-embedded lung sections from the control, CH+DMSO, and CH+BTP2 groups. **I**, Pulmonary vessel occlusion (%; n=4 for the normoxia group, 5 for the CH+DMSO group, and 6 for the CH+BTP2 group). **J**, Quantification of Orai1 mRNA expression in RV tissues from control and CH rats (n=6 for each condition). **K**, Localization of Orai1 expression by immunofluorescence staining of paraffin-embedded RV sections from control and CH rats. Orai1 staining (red) and nucleus (4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI] in blue). **L**, Interstitial fibrosis was identified with Sirius red staining in the RV compartment from control, CH+DMSO, and CH+BTP2 rats (at W3). Quantification of the percentage of fibrosis in RV tissue (n=10 images per rat from 5 different rats for the Normoxia and CH+DMSO group and 6 different rats for the CH+BTP2 group). **M**, Immunofluorescence images of RV sections stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated WGA (wheat germ agglutinin, 50 μg/mL, green). Scale bar, 20 μm. Quantification of cardiomyocytes cross-section area (CSA, n=30 cardiomyocytes measurement per rat from 4 different rats for the Normoxia and 5N for CH+DMSO group and 6 different rats for the CH+BTP2 group). Statistical tests and exact *P* values are provided in Table S5.



**Figure 7.** In vivo pharmacological inhibition of Orai1 with BTP2 reduces store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) in monocrotaline (MCT)-pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) and the development of MCT-induced pulmonary hypertension (PH) at pulmonary and right ventricular (RV) levels.

**A,** Localization of Orai1 expression by immunofluorescence staining of paraffin-embedded lung sections from control and (Continued)

PDGF or endothelin-1 signaling. Further studies will be necessary to fully understand the mechanisms responsible for Orai1 overexpression in PAH.

The role of Orai1 in cell proliferation is described in proliferative systemic SMCs.<sup>18</sup> This study shows that Orai1 contributed to the hyperproliferative phenotype of PAH-hPASCs. This did not affect the regulation of the pro-oncogenic P42/44 pathway, but it did result from the downregulation of the cell cycle inhibitor, P21.

### Role of Orai1 in Regulating Cell Apoptosis

One of the deleterious phenotypes of PAH is the apoptotic resistance of PASCs. Our study demonstrated that Orai1 knockdown or pharmacological inhibition promotes PAH-hPASC apoptosis, suggesting that Orai1 overexpression promotes apoptosis resistance. In prostate cancer cells, downregulation of Orai1 protects cells from staurosporine-induced apoptosis.<sup>22</sup> *In vivo* silencing of Orai1 in mice protects macrophages against apoptosis.<sup>23</sup> Conversely, pharmacological inhibition or silencing of Orai1 in human B lymphoma cell lines leads to an enhancement in apoptosis via activation of the caspase pathway.<sup>24</sup> In the LV pressure overload model, the heart from *orai1*<sup>+/-</sup> mice had more apoptotic cells than wild-type mice.<sup>25</sup> Here, we found that Orai1 knockdown in PAH-hPASCs induced overactivation of the caspase 9 cascade and P38 signaling pathway, both known to promote or facilitate apoptosis in several cell types.<sup>26</sup> In addition to the caspase cascade, P38 plays a crucial role in balancing cell survival and death.<sup>27</sup>

Moreover, the P38 signaling cascade could regulate apoptosis by regulating the caspase cascade.<sup>26</sup> In contrast to P38, we found that Akt activation was unchanged in siOrai1 PAH-hPASCs without staurosporine treatment. Nevertheless, in staurosporine-induced apoptosis, knockdown of Orai1 increased P38 activation and reduced Akt signaling, resulting in a decrease in survivin expression.

### Role of Orai1 in Regulating Calcineurin Activity

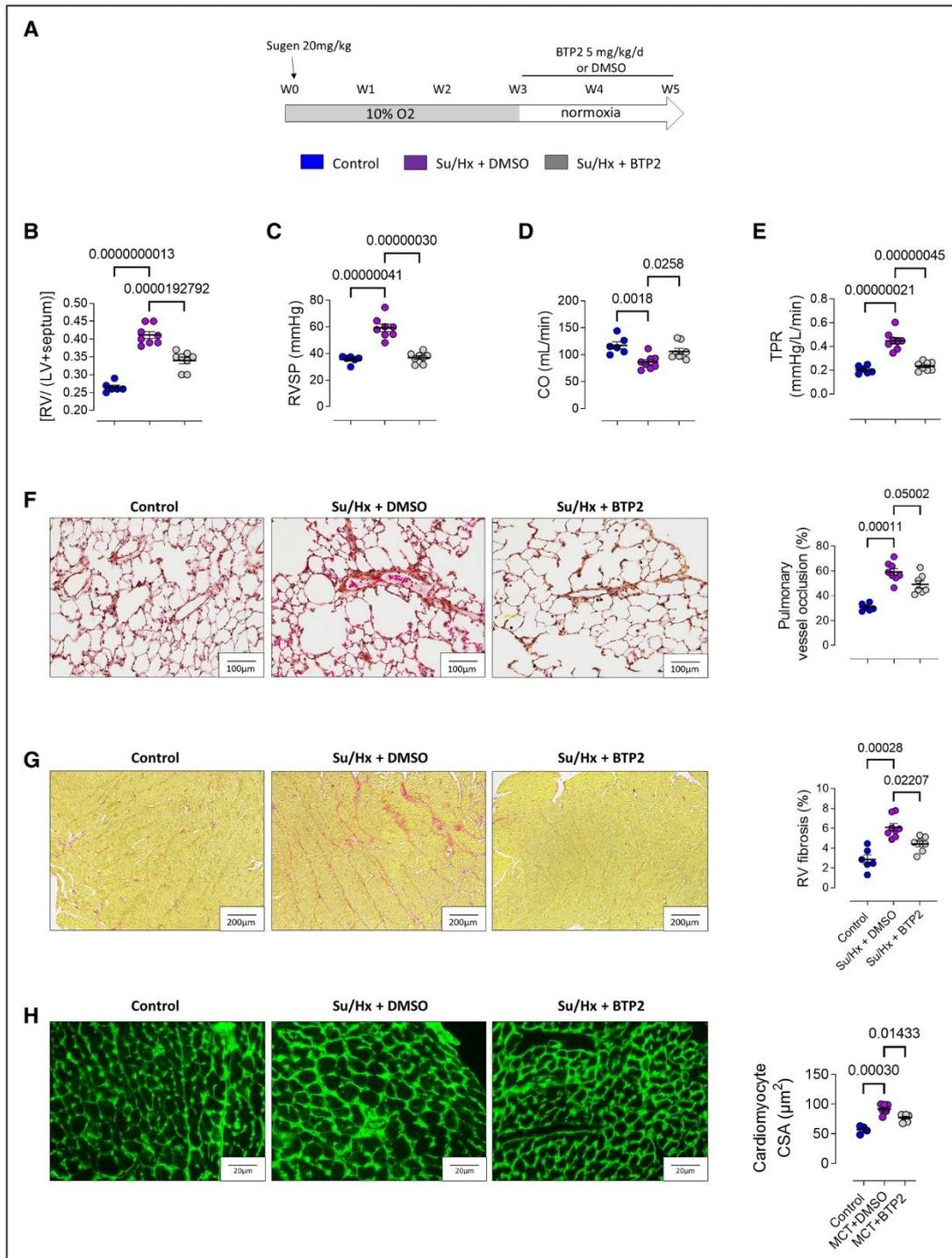
One of the main proteins regulating intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration is calcineurin, a protein phosphatase that activates the transcriptional factor NFAT. The calcineurin/NFAT axis plays a crucial role in many cellular functions, including proliferation, migration, and apoptosis.<sup>28,29</sup> A loss-of-function mutation in Orai1 prevented calcineurin/NFAT activation in T cells.<sup>30</sup> Recently, Kar et al<sup>31</sup> demonstrated that the N terminus of Orai1 couples to AKAP79 (A-kinase anchoring protein 79) to drive calcineurin/NFAT activation by Ca<sup>2+</sup> entry nanodomains. We found here that calcineurin activity was strongly increased in PAH-hPASCs, and the knockdown of Orai1 strongly reduced this activity. Previous work on the monocrotaline-induced PH model indicated that the calcineurin/NFAT axis is over-activated, modulating PASCs proliferation and apoptosis.<sup>32</sup>

Moreover, the calcineurin/NFAT axis is a significant regulator of cell migration.<sup>13</sup> In this study, we found an increase in PAH-hPASCs motility, which was reversed in siOrai1-transfected PAH-hPASCs. Moreover, we found that Orai1 upregulation in PAH-hPASCs increases calcineurin activity, which regulates Orai1 expression.

### Role of Cardiac Orai1 in Improving RV Function

We recently demonstrated that Orai1 expression and function were enhanced in hypertrophied RV cardiomyocytes from monocrotaline rats.<sup>16</sup> Also, Orai1 overexpression/function is described in hypertrophied LV cardiomyocytes from LV pressure-overloaded mice,<sup>10</sup> and genetic inactivation or pharmacological inhibition of Orai1 improves LV systolic function and Ca<sup>2+</sup> handling.<sup>10</sup> Moreover, *in vitro*, in hypertrophied RV cardiomyocytes from monocrotaline rats, pharmacological inhibition of Orai1 normalized Ca<sup>2+</sup> handling and cardiomyocyte contractility to control levels.<sup>16</sup> In the present study, we found that *in vivo* inhibition of Orai1 by BTP2, JP111, or 5J4 administration improved RV

**Figure 7 Continued.** MCT rats at 3 wk (W3). In pulmonary arteries (PAs) from control rats, Orai1 staining (green) was localized in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASCs; red). Bar graph=20  $\mu$ m. **B**, Quantification of Orai1 mRNA expression in isolated PAs from control and MCT rats (n=4 rats for each condition). **C**, Immunoblot images and quantification of Orai1 in PAs from control and MCT rats (n=4 rats per condition). **D**, Immunoblot images and quantification of Orai1 in PASCs from control and MCT rats (n=5 Control and 3 MCT rats). **E**, SOCE and SOCE amplitude in PASCs from control and MCT rats (n=5 Control and 3 MCT rats; n=51 cells for the control condition and 47 for the MCT condition). **F**, Consequence of Orai1 inhibition (N-[4-[3,5-bis(Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide [BTP2] or 4-(2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(pyridin-4-yl)methyl]aniline [JP111]) on SOCE in PASCs from MCT rats (N=3 rats for each condition; n=38 cells for the dimethyl sulfoxide (DMSO) condition, 34 for the BTP2 condition and 27 for the JP111 condition). **G**, *In vivo* experimental design. Rats have treated with one MCT subcutaneous injection at week 0 (W0; 60 mg/kg). BTP2 (5 mg/kg per day) or DMSO was administered 7 days from week 2 (W2) to W3 by intraperitoneal injection. **H**, Fulton index (n=8 for the control group, 12 for the MCT+DMSO group and 10 for the MCT+BTP2 group), **I** RV systolic pressure (RVSP; n=8 for the control group, 10 for the MCT+DMSO group and 7 for the MCT+BTP2 group), **J** cardiac output (CO; n=7 for the control group, 10 for the MCT+DMSO group and 7 for the MCT+BTP2 group) and **K** total pulmonary resistance (TPR; n=7 for the Control group, 10 for the MCT+DMSO group and 7 for the MCT+BTP2 group). **L**, Hematoxylin/eosin/Safran staining of paraffin-embedded lung sections from the control, MCT+DMSO, and MCT+BTP2 groups. **M**, Pulmonary vessel occlusion (%; n=4 for the Control group, 4 for the MCT+DMSO group, and 7 for the MCT+BTP2 group). **N**, Quantification of Orai1 mRNA expression in RV tissues from control and MCT rats (n=5 for the Control group and 6 for the MCT+DMSO group). **O**, Localization of Orai1 expression by immunofluorescence staining of paraffin-embedded RV sections from control rats and MCT-PH rats. Orai1 staining (red) and nucleus (4',6-diamidino-2-phénylindole [DAPI] in blue). **P**, Interstitial fibrosis identified with Sirius red staining in RV compartment (at W3) and quantification of the percentage of fibrosis in RV tissue (n=6 for the control group, 6 for the MCT+DMSO group, and 4 for the MCT+BTP2 group). **Q**, Immunofluorescence images of RV sections stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated wheat germ agglutinin (WGA, 50  $\mu$ g/mL, green). Scale bar, 20  $\mu$ m. Quantification of cardiomyocytes cross-section area (CSA, n=30 cardiomyocytes measurement per rat from 4 rats for the control group, 6 for the MCT+DMSO group, and 4 for the MCT+BTP2 group). Statistical tests and exact *P* values are provided in Table S5. LV indicates left ventricular.



**Figure 8.** In vivo pharmacological inhibition of Orai1 with BTP2 reduces the development of Sugeng/Hypoxia (Su/Hx)-induced PH at pulmonary and right ventricular (RV) levels.

**A**, In vivo experimental design. Rats were maintained in Su/Hx for 3 wk following 2 additional weeks in normoxic condition, and N-[4-[3,5-bis(Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide (BTP2) (5 mg/kg/day) or dimethyl sulfoxide (DMSO) was administered between week 3 (W3) and week 5 (W5) by intraperitoneal injection. **B**, Fulton index (n=6 for the control group, 8 for the Su/Hx+DMSO group, and 8 for the Su/Hx+BTP2 group). **C**, RV systolic pressure (RVSP) in mmHg (n=6 for the control group, 8 for the Su/Hx+DMSO group, and 8 for the Su/Hx+BTP2 group). **D**, cardiac output (CO) in mL/min (n=6 for the Control group, 8 for the Su/Hx+DMSO group, and 8 for the Su/Hx+BTP2 group). **E**, total pulmonary resistance (TPR; n=6 for the Control group, 8 for the Su/Hx+DMSO group, and 8 for the Su/Hx+BTP2 group). **F**, Hematoxylin/eosin/Safran staining of paraffin-embedded lung (*Continued*)

Downloaded from <http://ahajournals.org> by on February 13, 2023

hypertrophy and RVSP in CH-, monocrotaline- and Su/Hx rat models, which could be explained by an improvement in pulmonary vascular remodeling and by the direct action of Orai1 blockade on RV cardiomyocyte function.

### Pharmacological Inhibition of Orai1 as a Therapeutic Option in PAH

Using siRNA or pharmacological Orai1 inhibition, we found that Orai1 inhibition reduced several pathological phenotypes of PAH-hPASMCs, including aberrant proliferation, exacerbated migration, and apoptosis resistance. This supports Orai1 as a relevant therapeutic target in PAH. Since the  $IC_{50}$  of BTP2 is between 100 and 590 nmol/L in several cell types,<sup>33</sup> we used BTP2 at 1  $\mu$ mol/L to avoid or minimize side effects. Indeed, at a higher concentration, BTP2 inhibits TRPC3 (transient receptor potential [TRP] canonical 3)-mediated  $Ca^{2+}$  entry in TRPC3-expressing Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells with an  $IC_{50}$  of 4  $\mu$ mol/L.<sup>33</sup> In lymphocytes, BTP2 also dose-dependently enhances the function of TRP melastatin 4, which induces lymphocyte depolarization.<sup>34</sup> Also, in T lymphocytes, BTP2 inhibits TRPC5 channels.<sup>35</sup> Our study did not detect TRPC5 expression in lung tissue or hPASMCs (data not shown), eliminating the possibility of potential side effects of BTP2 on TRPC5. Moreover, at 10  $\mu$ mol/L, BTP2 was recently shown to reduce the function of Orai1, Orai2, and Orai3.<sup>36</sup> We found that 1  $\mu$ mol/L BTP2 has similar effects on PAH-hPASMCs (SOCE amplitude, proliferation, apoptosis, and migration) than siOrai1 in transfected PAH-hPASMCs. Therefore, we conclude that 1  $\mu$ mol/L BTP2 is an efficient dose for selective blockade of Orai1 in PAH-hPASMCs. Additionally, we used another selective Orai1 blocker, JPIII, based on the scaffold of the potent and selective blocker, Synta66.<sup>10</sup> JPIII did not modify the function of Orai3, TRPC5, TRPC6, TRPC4/C1, or TRPC5/C1 in HEK293 cells.<sup>10</sup> JPIII (0.5  $\mu$ mol/L) recapitulates results obtained in *in vitro* experiments with siOrai1 or after 1  $\mu$ mol/L BTP2 application. Finally, we obtained similar *in vivo* results with 5J4 application in monocrotaline rats, for which no side effects have been reported on other  $Ca^{2+}$  channels until now<sup>17</sup> to those obtained with BTP2 and JPIII application. These data prove that targeting the Orai1  $Ca^{2+}$  channel function could be a promising strategy for treating PAH.

### Orai1 Inhibitors in Clinical Trials: a Chance for the PAH Community?

Since the discovery of SOCE by Putney in 1986<sup>37</sup> and the following identification of Orai1 as the archetype of

SOCE in 2006,<sup>6</sup> Orai1 is considered as a plausible target in several pathological processes. Now, in addition to BTP2, JPIII, and 5J4 used in this study, the arsenal of pharmacological inhibitors of Orai1 has increased, including GSK-7975A, Synta66, PRCL02, RP3128, a monoclonal antibody (mAB) against Orai1 (mAB 2C1.1), and Auxora.<sup>8,10</sup> Some compounds have reached clinical trials (phase I/IIa) for severe plaque psoriasis, acute pancreatitis, and COVID-19 pneumonia.<sup>38,39</sup> Currently, the above-listed molecules seem to be well-tolerated in patients.<sup>8</sup> RP3128 has reached clinical trials (phase I/IIa) for asthma.<sup>40</sup> Finally, PRCL02 entered into clinical trials for the treatment of plaque psoriasis.<sup>41</sup> Since we demonstrated that Orai1 contributes to PAH development, it would be interesting to test the different Orai1 inhibitors in PAH, especially since good safety in humans has been already demonstrated in several phase I and II clinical trials. Using Orai1 inhibitors, we demonstrated that we might act on different PAH pathogenesises, including exacerbated proliferation, migration, apoptosis resistance, and PA constriction.

However, intracellular  $Ca^{2+}$  overload could be due to plasma membrane channels, including voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels and non-voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. In the clinic PAH, L-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel blockers, acting mainly on excessive PA vasoconstriction, are only effective for <10% of patients with PAH.<sup>5</sup> As the archetype of SOC, the Orai1 channel appears to be a novel alternative to counteract intracellular  $Ca^{2+}$  overload in PAH by regulating cell function. Another essential advantage to inhibiting Orai1 is that most molecules tested in the preclinical models and clinical studies act on downstream proteins or at the end of cell signaling. Like Sotatercept therapy (which acts at the start of the transforming growth factor  $\beta$  signaling cascade),<sup>42,43</sup> Orai1 inhibition also acts at the beginning of the  $Ca^{2+}$  signaling. For all these reasons, and due to the existence of a safe Orai1 inhibitor, Orai1 blockade therapy should be tested in patients with PAH.

In conclusion, our findings prove that Orai1 contributes to PAH development by regulating the aberrant PASMC phenotype, including hyperproliferation, apoptosis resistance, excessive migration, and contraction. Our data suggest that pharmacological inhibition of Orai1 could be a relevant strategy to reduce pulmonary vascular remodeling in PAH once the safety of Orai1 inhibition is confirmed.

### ARTICLE INFORMATION

Received March 9, 2022; revision received September 1, 2022; accepted September 12, 2022.

**Figure 8 Continued.** sections from the control, Su/Hx+DMSO, and Su/Hx+BTP2 groups, and percentage of pulmonary vessel occlusion (%; n=5 for the Control group, 8 for the Su/Hx+DMSO group and 7 for the Su/Hx+BTP2 group). **G.** Sirius red staining of paraffin-embedded RV sections from the control, Su/Hx+DMSO, and Su/Hx+BTP2 groups and percentage of RV fibrosis (n=5 for the control group, 8 for the Su/Hx+DMSO group and 7 for the Su/Hx+BTP2 group). **H.** Immunofluorescence images of RV sections stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated wheat germ agglutinin (WGA, 50  $\mu$ g/mL, green). Scale bar, 20  $\mu$ m. Quantification of cardiomyocytes cross-section area (CSA, n=30 cardiomyocytes measurement per rat from 4 rats for the Control group, 8 for the Su/Hx+DMSO group, and 7 for the Su/Hx+BTP2 group). Statistical tests and exact *P* values are provided in Table S5.

### Affiliations

Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France (B.M., H.L.R., L.L., Y.R., M.D., A.B., M.-R.G., M.H., D.M., V.C., F.A.). INSERM UMR\_S 999 « Hypertension pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique », Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France. B.M., H.L.R., L.L., Y.R., M.D., A.B., M.-R.G., M.H., D.M., V.C., F.A.). Inserm, UMR-S 1180, Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France (J.S., J.-P.B.). Leeds Institute of Cardiovascular and Metabolic Medicine, School of Medicine, University of Leeds, United Kingdom (E.W., R.F., L.C., D.J.B., M.A.B.). Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis Robinson, France (Y.R., M.D., A.B., V.C.). Department of Pathology, Groupe Hospitalier-Marie Lannelongue, 92350 Le Plessis-Robinson, France (V.T.D.M.). Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Transplantation Cardio-Pulmonaire, Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Le Plessis Robinson, France (O.M.). Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France (M.H., D.M.).

### Acknowledgments

The authors thank Yvonne Duteilh from Institute for Health and Medical Research (INSERM) U999, Hôpital Marie Lannelongue for all her help.

### Sources of Funding

This study was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), the Université Paris-Saclay, the Marie Lannelongue Hospital, and the French National Agency for Research (ANR; grant no. ANR-18-CE14-0023 [KAPAH] and the British Heart Foundation [grant no. FS/16/42/32308 for E. Woodhouse and FS/18/12/33270 for M.A. Bailey]). B. Masson is supported by the Therapeutic Innovation Doctoral School (ED569). ANR-18-CE14-0023 supports H. Le Ribez.

### Disclosures

M. Humbert and D. Montani have relationships with drug companies, including Actelion, Bayer, GSK, Novartis, and Pfizer. In addition to being investigators in trials involving these companies, other relationships include consultancy services and memberships to scientific advisory boards. The other authors report no conflicts.

### Supplemental Materials

Uncut Gel Blots  
Major Resources Table  
ARRIVE Guidelines  
Table S1–S5  
Figure S1–S15  
References 44–53

### REFERENCES

- Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmueller P, Klinger JR, Nicolls MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J*. 2019;53:1801887. doi: 10.1183/13993003.01887-2018
- Humbert M, Kovacs G, Hoepfer MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, Carlsen J, Coats AJS, Escobedo-Subias P, Ferrari P, et al. ESC/ERS Scientific Document Group. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [published online August 27, 2022]. *Eur Respir J*. doi: 10.1093/eurheartj/ehac237. <https://academic.oup.com/eurheartj/advance-article/doi/10.1093/eurheartj/ehac237/6673929>
- Lau EMT, Giannoulatos E, Celermajer DS, Humbert M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14:603–614. doi: 10.1038/nrcardio.2017.84
- Berna-Erro A, Jardín I, Smani T, Rosado JA. Regulation of Platelet Function by Orai, STIM and TRP. *Adv Exp Med Biol*. 2016;898:157–181. doi: 10.1007/978-3-319-26974-0\_8
- Masson B, Montani D, Humbert M, Capuano V, Antigny F. Role of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in the pulmonary vascular remodeling occurring in pulmonary arterial hypertension. *Biomolecules*. 2021;11:1781. doi: 10.3390/biom11121781
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koosma DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, et al. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science*. 2006;312:1220–1223. doi: 10.1126/science.1127883
- Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*. 2006;443:226–229. doi: 10.1038/nature05108
- Stauderman KA. CRAC channels as targets for drug discovery and development. *Cell Calcium*. 2018;74:147–159. doi: 10.1016/j.ceca.2018.07.005
- Sweeney ZK, Minatti A, Button DC, Patrick S. Small-molecule inhibitors of store-operated calcium entry. *ChemMedChem*. 2009;4:706–718. doi: 10.1002/cmdc.200800452
- Bartoli F, Bailey MA, Rode B, Mateo P, Antigny F, Bedouet K, Gerbaud P, Gosain R, Plante J, Norman K, et al. Orai1 channel inhibition preserves left ventricular systolic function and normal Ca<sup>2+</sup> handling after pressure overload. *Circulation*. 2020;141:199–216. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038891
- Wang X, Wang Y, Zhou Y, Hendron E, Mancarella S, Andrade MD, Rothberg BS, Soboloff J, Gill DL. Distinct Orai-coupling domains in STIM1 and STIM2 define the Orai-activating site. *Nat Commun*. 2014;5:3183. doi: 10.1038/ncomms4183
- Sankhe S, Manousakidi S, Antigny F, Arthur Ataaam J, Bentebbal S, Ruchon Y, Lecerf F, Sabourin J, Price L, Fadel E, et al. T-type Ca<sup>2+</sup>-channels elicit proliferative and anti-apoptotic responses through impaired PP2A/Akt1 signaling in PSMCs from patients with pulmonary arterial hypertension. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1864:1631–1641. doi: 10.1016/j.bbamer.2017.06.018
- Villalobo A, Berchtold MW. The role of calmodulin in tumor cell migration, invasiveness, and metastasis. *Int J Mol Sci*. 2020;21:765. doi: 10.3390/ijms21030765
- Le Ribez H, To L, Ghigna M-R, Martin C, Nagaraj C, Dreano E, Rucker-Martin C, Girerd B, Bouliguan J, Pechoux C, et al. Involvement of CFTR in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2021;58:2000653. doi: 10.1183/13993003.00653-2020
- Rimessi A, Patergnani S, Bonora M, Wiekowski MR, Pinton P. Mitochondrial Ca(2+) remodeling is a prime factor in oncogenic behavior. *Front Oncol*. 2015;5:143. doi: 10.3389/fonc.2015.00143
- Sabourin J, Boet A, Rucker-Martin C, Lambert M, Gomez A-M, Benitah J-P, Perros F, Humbert M, Antigny F. Ca<sup>2+</sup> handling remodeling and STIM1L/Orai1/TRPC1/TRPC4 upregulation in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;118:208–224. doi: 10.1016/j.jmcc.2018.04.003
- Kim K-D, Srikanth S, Tan Y-V, Yee M-K, Jew M, Damoiseaux R, Jung ME, Shimizu S, An DS, Ribalet B, et al. Calcium signaling via orai1 is essential for induction of the nuclear orphan receptor pathway to drive Th17 differentiation. *J Immunol*. 2014;192:110–122. doi: 10.4049/jimmunol.1302586
- Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Abdullaev IF, Bisailon JM, Singer HA, Trebak M. Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRCAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2009;23:2425–2437. doi: 10.1096/fj.09-131128
- Wang Y, He J, Jiang H, Zhang Q, Yang H, Xu X, Zhang C, Xu C, Wang J, Lu W. Nicotine enhances store-operated calcium entry by upregulating HIF-1 $\alpha$  and SOCC components in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2018;40:2097–2104. doi: 10.3892/or.2018.6580
- Lambert M, Capuano V, Boet A, Tesson L, Bertero T, Nakhleh MK, Remy S, Anegón I, Pechoux C, Hautefort A, et al. Characterization of Kcnk3-mutated rat, a novel model of pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2019;125:678–695. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314793
- Ogawa A, Firth AL, Smith KA, Maliakal MV, Yuan JX-J. PDGF enhances store-operated Ca<sup>2+</sup> entry by upregulating STIM1/Orai1 via activation of Akt/mTOR in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302:C405–C411. doi: 10.1152/ajpcell.00337.2011
- Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphaël M, Vandenberghe M, Abeele FV, Roudbaraki M, Lepage G, Mauroy B, Romanin C, et al. Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis*. 2010;1:e75. doi: 10.1038/cddis.2010.52
- Liang S-J, Zeng D-Y, Mai X-Y, Shang J-Y, Wu Q-Q, Yuan J-N, Yu B-X, Zhou P, Zhang F-R, Liu Y-Y, et al. Inhibition of Orai1 store-operated calcium channel prevents foam cell formation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:618–628. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307344
- Vacher P, Vacher A-M, Pineau R, Latour S, Soubeyran I, Pangault C, Tarte K, Soubeyran P, Ducret T, Bresson-Bepoldin L. Localized store-operated calcium influx represses CD95-dependent apoptotic effects of rituximab in non-hodgkin B lymphomas. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015;195:2207–2215. doi: 10.4049/jimmunol.1402942
- Horton JS, Buckley CL, Alvarez EM, Schorlemmer A, Stokes AJ. The calcium release-activated calcium channel Orai1 represents a crucial component in hypertrophic compensation and the development of dilated cardiomyopathy. *Channels Austin Tex*. 2014;8:35–48. doi: 10.4161/chan.26581

26. Yue J, López JM. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21:2346. doi: 10.3390/ijms21072346
27. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:537–549. doi: 10.1038/nrc2694
28. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:707–747. doi: 10.1146/annurevimmunol.15.1.707
29. Gallo EM, Canté-Barrett K, Crabtree GR. Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat Immunol*. 2006;7:25–32. doi: 10.1038/ni1295
30. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S-H, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. 2006;441:179–185. doi: 10.1038/nature04702
31. Kar P, Lin Y-P, Bhardwaj R, Tucker CJ, Bird GS, Hediger MA, Monico C, Amin N, Parekh AB. The N terminus of Orai1 couples to the AKAP79 signaling complex to drive NFAT1 activation by local Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118:e2012908118. doi: 10.1073/pnas.2012908118
32. He R-L, Wu Z-J, Liu X-R, Gui L-X, Wang R-X, Lin M-J. Calcineurin/NFAT signaling modulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, migration and apoptosis in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rats. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2018;49:172–189. doi: 10.1159/000492852
33. He L-P, Hewavitharana T, Soboloff J, Spassova MA, Gill DL. A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2. *J Biol Chem*. 2005;280:10997–11006. doi: 10.1074/jbc.M411797200
34. Takezawa R, Cheng H, Beck A, Ishikawa J, Launay P, Kubota H, Kinet J-P, Fleig A, Yamada T, Penner R. A pyrazole derivative potently inhibits lymphocyte Ca<sup>2+</sup> influx and cytokine production by facilitating transient receptor potential melastatin 4 channel activity. *Mol Pharmacol*. 2006;69:1413–1420. doi: 10.1124/mol.105.021154
35. Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, Hoth M. Potent inhibition of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem*. 2004;279:12427–12437. doi: 10.1074/jbc.M309297200
36. Zhang X, Xin P, Yeast RE, Emrich SM, Johnson MT, Pathak T, Benson JC, Azimi I, Gill DL, Monteith GR. et al. Distinct pharmacological profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 channels. *Cell Calcium*. 2020;91:102281. doi: 10.1016/j.ceca.2020.102281
37. Putney JA. Model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. 1986;7:1–12. doi: 10.1016/0143-4160(86)90026-6
38. CalciMedica, Inc. An Open-Label, Dose-Response Study of CM4620 Injectable Emulsion (CM4620-IE) in patients with acute pancreatitis and accompanying systemic inflammatory response syndrome (SIRS) [Internet]. [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03401190](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03401190). 2019. Accessed April 25, 2021.
39. Miller J, Bruen C, Schnaus M, Zhang J, Ali S, Lind A, Stoecker Z, Stauderman K, Hebbar S. Auxora versus standard of care for the treatment of severe or critical COVID-19 pneumonia: results from a randomized controlled trial. *Crit Care Lond Engl*. 2020;24:502. doi: 10.1186/s13054-020-03220-x
40. Rhizen Pharmaceuticals SA. A Phase I/IIa, Randomized, Double-blind, Placebo Controlled Study to Evaluate the Safety, and Pharmacokinetics of Single and Multiple Ascending Dose of RP3128 in HV and Effect on LAR to Allergen Challenge in Mild Asthmatics [Internet]. [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02958982](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02958982). 2019. Accessed April 25, 2021.
41. PRCL Research Inc. Randomized, Double Blind, Placebo Controlled, Incomplete Crossover Single Oral Dose Escalation of PRCL-02 in Normal Healthy Volunteers (Part A) and Multiple Oral Dose Escalation in Normal Healthy Volunteers (Part B) and in Chronic Plaque Psoriasis Patients (Part C) [Internet]. [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03062618](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03062618). 2018. Accessed April 25, 2021.
42. Humbert M, McLaughlin V, Gibbs JSR, Gomberg-Maitland M, Hoeper MM, Preston IR, Souza R, Waxman A, Escobedo Subias P, Feldman J. et al. Sotatercept for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2021;384:1204–1215. doi: 10.1056/NEJMoa2024277
43. Humbert M, McLaughlin V, Gibbs JSR, Gomberg-Maitland M, Hoeper MM, Preston IR, Souza R, Waxman AB, Ghofrani H-A, Escobedo Subias P. et al. Sotatercept for the treatment of pulmonary arterial hypertension: PULSAR open-label extension [published online August 30, 2022]. *Eur Respir J*. doi: 10.1183/13993003.01347-2022. <https://erj.ersjournals.com/content/early/2022/08/04/13993003.01347-2022.article>
44. Sankhe S, Manousakidi S, Antigny F, Arthur Ataam J, Bentebbal S, Ruchon Y, Lecerc F, Sabourin J, Price L, Fadel E. et al. T-type Ca<sup>2+</sup> channels elicit pro-proliferative and anti-apoptotic responses through impaired PP2A/Akt1 signaling in PASMCs from patients with pulmonary arterial hypertension. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1864:1631–1641. doi: 10.1016/j.bbamer.2017.06.018
45. Lambert M, Capuano V, Boet A, Tesson L, Bertero T, Nakhleh MK, Remy S, Anegon I, Pechoux C, Hautefort A. et al. Characterization of *Kcnk3*-mutated rat, a novel model of pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2019;125:678–695. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314793
46. Bartoli F, Bailey MA, Rode B, Mateo P, Antigny F, Bedouet K, Gerbaud P, Gosain R, Plante J, Norman K. et al. Orai1 channel inhibition preserves left ventricular systolic function and normal Ca<sup>2+</sup> handling after pressure overload. *Circulation*. 2020;141:199–216. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038891
47. Le Ribeuz H, Masson B, Capuano V, Dutheil M, Goroorchum H, Boët A, Ghigna M-R, De Montpreville V, Girerd B, Lambert M. et al. SUR1 as a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2022;66:539–554. doi: 10.1165/ajrmb.2021-01800C
48. Lambert M, Boet A, Rucker-Martin C, Mendes-Ferreira P, Capuano V, Hatem S, Adão R, Brás-Silva C, Hautefort A, Michel J-B. et al. Loss of KCNK3 is a hallmark of RV hypertrophy/dysfunction associated with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*. 2018;114:880–893. doi: 10.1093/cvr/cvy016
49. Le Ribeuz H, Courboulain A, Ghigna M-R, Lambert M, Hautefort A, Humbert M, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Perros F, Antigny F. In vivo miR-138-5p inhibition alleviates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and normalizes pulmonary KCNK3 and SLC45A3 expression. *Respir Res*. 2020;21:186. doi: 10.1186/s12931-020-01444-7
50. Le Ribeuz H, To L, Ghigna M-R, Martin C, Nagaraj C, Dreano E, Rucker-Martin C, Girerd B, Bouliouan J, Pechoux C. et al. Involvement of CFTR in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2021;58:2000653. doi: 10.1183/13993003.00653-2020
51. Chemla D, Castelain V, Humbert M, Hébert J-L, Simonneau G, Lecarpentier Y, Hervé P. New formula for predicting mean pulmonary artery pressure using systolic pulmonary artery pressure. *Chest*. 2004;126:1313–1317. doi: 10.1378/chest.126.4.1313
52. Razali, N, Wah, Y. Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2, 21–33. - References - Scientific Research Publishing [Internet]. [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjt55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2050949](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjt55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2050949). 2011. Accessed August 25, 2022.
53. Yin L, Zahradnikova A, Rizzetto R, Boncompagni S, Rabesahala de Meritens C, Zhang Y, Joanne P, Marqués-Sulé E, Aguilar-Sánchez Y, Fernández-Tenorio M. et al. Impaired binding to junctophilin-2 and nanostructural alteration in CPVT mutation. *Circ Res*. 2021;129:e35–e52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319094



## Supplemental Material

### Orai1 Inhibitors as Potential Treatments for Pulmonary Arterial Hypertension

Short title: Orai1 Inhibition as a Treatment for PAH

Bastien Masson, PhD<sup>1,2</sup>; Hélène Le Ribeuz, PhD<sup>1,2</sup>; Jessica Sabourin, PhD<sup>3</sup>; Loann Laubry, MSc<sup>1,2</sup>; Emily Woodhouse, PhD<sup>4</sup>; Richard Foster, PhD<sup>4</sup>; Yann Ruchon, MSc<sup>1,2,5</sup>; Mary Dutheil, MSc<sup>1,2,5</sup>; Angèle Boët, MD-PhD<sup>1,2,5</sup>; Maria-Rosa Ghigna, MD-PhD<sup>1,2</sup>; Vincent De Montpreville, MD<sup>6</sup>; Olaf Mercier, MD-PhD<sup>7</sup>; David J Beech, PhD<sup>4</sup>; Jean-Pierre Benitah, PhD<sup>3</sup>; Marc A Bailey, PhD, MBChB, MRCS<sup>4</sup>; Marc Humbert, MD-PhD<sup>1,2,8</sup>; David Montani, MD-PhD<sup>1,2,8</sup>; Véronique Capuano, PhD<sup>1,2,5</sup>; and Fabrice Antigny, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France. (B.M, H.L-R, L.B, L.R, Y.R, M.D, A.B, M-R.G, M.H, D.M, V.C and F.A)

<sup>2</sup>INSERM UMR\_S 999 « Hypertension pulmonaire : Physiopathologie et Innovation Thérapeutique », Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France. (B.M, H.L-R, L.R, Y.R, M.D, A.B, M-R.G, M.H, D.M, V.C and F.A)

<sup>3</sup>Inserm, UMR-S 1180, Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France. (J.S, J-P.B)

<sup>4</sup>Leeds Institute of Cardiovascular and Metabolic Medicine, School of Medicine, University of Leeds, United Kingdom. (E.W, R.F, L.C, D.B, M.B)

<sup>5</sup>Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis Robinson, France. (Y.R, M.D, A.B, V.C)

<sup>6</sup>*Department of Pathology, Groupe Hospitalier-Marie Lannelongue, 92350 Le Plessis-Robinson, France (V.D-M)*

<sup>7</sup>*Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Transplantation Cardio-Pulmonaire, Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Le Plessis Robinson, France. (O.M)*

<sup>8</sup>*Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France. (M.H, D.M)*

**Corresponding author:** Fabrice Antigny, INSERM UMR\_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France.

Tel.: (33) 1 40 94 22 99; E-mail: [fabrice.antigny@inserm.fr](mailto:fabrice.antigny@inserm.fr)

## **MATERIAL AND METHODS**

**Patients:** Human lung specimens were obtained at lung transplantation in 20 patients with PAH unrelated to genetic mutations (PAH) and lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer from 10 patients as control subjects. 70% of primary cells are provided from female PAH patients. PAs were isolated from away tumor areas in the lung specimens of control subjects. Transthoracic echocardiography was performed preoperatively in control subjects to rule out PH. Patients with PAH underwent genetic counseling and provided written informed consent for genetic analysis. The demographic information of PAH and control patients are presented in TableS1.

Patients were part of the French Network on Pulmonary Hypertension, a program approved by our institutional ethics committee, and provided written informed consent (Protocol N8CO-08-003, ID RCB: 2008-A00485-50, approved on June 18<sup>th</sup>, 2008). All human tissues were obtained

with written informed consent from transplant recipients or families of organ donors in accordance with the Declaration of Helsinki.

**Human PASMCM and PAEC culture (from PAH and control patients)-** Human PAECs and PASMCMs were cultured as previously described<sup>44,45</sup> and were used for the study between passages 3 and 5. hPASMCM or hPAEC were isolated from pulmonary arteries obtained during lung transplantation for PAH patients and lobectomy or pneumonectomy of localized lung cancer from control subjects. Pulmonary arteries were excised at a distance from tumor areas. Patients studied were part of a program approved by our institutional Ethics Committee and had given written informed consent (ID RCB: 2018-A01252-53, approved on June 18, 2006)

**Chemicals:** MCT, staurosporine, endothelin-1, PDTC, SB203580, cytosine arabinoside, and nifedipine were obtained from Sigma-Aldrich. UO126 (cell signaling), MK2206 (MedChemExpress), MCV1 (calbiochem), PDGF, BTP2 (YM-58483), and U46619 were obtained from R&D Systems. Fura-2-AM was obtained from Thermo Fisher Scientific. 5J4 was obtained from Tocris Bioscience. KB-R7943 was obtained from TOCRIS. JPIII was produced as previously described<sup>46</sup>.

**siRNA transfection:** PASMCMs were transfected in suspension by incubating  $4 \times 10^5$  cells in a solution containing 500  $\mu$ L of Opti-MEM (Gibco, ref 31985-062), 3  $\mu$ L of Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, ref 13778-150), and 100 nM of a specific *Silencer*<sup>TM</sup> Select siRNA against Orail (siOrail, #s99509, Thermo Fisher Scientific), STIM1 (siSTIM1, #s13563, Thermo Fisher Scientific), or STIM2 (siSTIM2, #s33457, Thermo Fisher Scientific), or KCNK3 (siKCNK3, #s7785, Thermo Fisher Scientific), or BMPR2 (siBMPR2, #s2045, Thermo Fisher Scientific) as well as a *Silencer*<sup>TM</sup> Select negative control (siControl) (Major Ressources Table) according to the manufacturer's protocol. All experiments were performed 72 h after PAH-hPASMCM transfection.

**PASMCs proliferation measurement:** To evaluate cell proliferation, we quantified BrdU incorporation in cells undergoing DNA replication using a DELFIA cell proliferation kit (AD0200, PerkinElmer). Experiments were performed according to the manufacturer's recommendations. Different treatments were used, including control siRNA, siRNA against Orai1 or STIM1, and Orai1 inhibitors (BTP2 at 1  $\mu\text{mol/L}$  and JPIII at 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ). 48h after cell synchronization (0% SVF) to stimulate the cell proliferation, the medium contained 10 percent of serum in the presence of 1  $\mu\text{mol/L}$  BrdU for 24 h (PerkinElmer)<sup>47</sup>. The fluorescence signal in the 96-well plate was read with a 2103 EnVision™ plate reader (PerkinElmer).

**Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay Kit:** hPASMCs were seeded in XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA, USA). Cells were washed and incubated in a base medium (Agilent Technologies) at 37 °C for 1 h. Then, extracellular acidification and oxygen consumption rates (extracellular acidification rate (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR), respectively) were measured in XF media (nonbuffered RPMI 1640 containing 10 mM glucose, 2 mM L-glutamine, and 1 mM sodium pyruvate) under basal conditions and in response to 1,5  $\mu\text{mol/L}$  oligomycin and 0.5  $\mu\text{mol/L}$  rotenone + 0.5  $\mu\text{mol/L}$  antimycin A by using the Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. At the end of the experiment, the number of cells was evaluated by MTS assay (Promega).

**Animals and surgical procedures:** The facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N° C92-019-01). This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments (CEEA26 CAP Sud). Animal experiments were performed in accordance with the guidelines of Directive 2010/63/EU on September 22<sup>nd</sup>, 2010, of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and complied with the French institution's guidelines for animal care and handling.

*In-vivo* experiments were performed according to clinical trial standards. Rats were randomly distributed between groups, and all methods and analyses were performed with researchers blinded to the conditions. All rats received a number known only by the experimenter who delivered the treatment. Before sacrifice (day 21), all rats underwent an evaluation by closed-chest right heart catheterization. This experiment was performed by a blinded experimenter who did not know the correspondence between rat number and treatment. Hemodynamic parameters were analyzed in a blinded fashion.

Male Wistar rats (4 weeks old) were used in five experimental protocols:

1. PH was induced by a single MCT injection (60 mg/kg, s.c.). MCT was dissolved in 1 N HCl and neutralized with 1 N NaOH. Control animals received the same volume of saline solution. MCT-exposed Wistar rats were treated with BTP2 (5 mg/kg/day in DMSO, daily i.p. injection) from week 2 (W2) to week 3 (W3). BTP2 was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO.

2. For the chronic hypoxia (CH) model, male Wistar rats were placed in a hypoxic chamber (10% O<sub>2</sub>) for three weeks in normobaric conditions. Normoxic Wistar rats were placed in the same room for three weeks. CH-exposed rats were treated with BTP2 (5 mg/kg/day, daily i.p. injection) from W2 to W3. BTP2 was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO.

3. MCT-exposed Wistar rats were treated with JPIII using osmotic minipumps (model 2002, Alzet) implanted subcutaneously via posterior neck incision one week after MCT exposure for two weeks, leading to continuous delivery of JPIII at 500 ng/kg/min (0.72 mg/kg/day in DMSO) or vehicle (DMSO) only.

4. MCT-exposed Wistar rats were treated with 5J4 (1 mg/kg/day in DMSO, daily i.p. injection) from W2 to W3. 5J4 was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO.

5. For the Sugen-hypoxia (Su/Hx) model, Wistar rats were injected with 20 mg/kg in SU5416 (Cliniscience) and placed in hypoxia (10% O<sub>2</sub>) for three weeks. After three weeks of hypoxia, animals returned to normoxia for 2 weeks. During these two extra weeks in normoxia, Su/Hx Wistar rats were treated with BTP2 (5 mg/kg/day, daily i.p. injection) from W3 to W5. BTP2 was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO. In vivo study design are presented in Major Ressources Table

**Preparation and administration of ALZET<sup>®</sup> osmotic pumps:** ALZET osmotic pumps were used to deliver JPIII or vehicle (DMSO) to the systemic circulation at a continuous and controlled rate for 2 weeks (Alzet pump 2002). Osmotic pumps were prepared using a 30 mmol/L (9.6 µg/µL) JPIII stock made up of DMSO. The total volume of JPIII infused per animal was 200 µL for rat experiments. The pump volume was made up with DMSO to achieve a total volume of 200 µL.

Rats were anesthetized with inhalational isoflurane (5% for induction, 2% for maintenance) in 2 L/min O<sub>2</sub>. A small patch of hair was shaved between the scapulae and cleaned with Vetasept<sup>®</sup>. A small (sub-1-cm) incision was made, and a pouch was created in the left flank by blunt dissection. The primed pump was inserted into the pouch with the flow moderator facing inwards. Explantation of osmotic pumps at the end of the experiment confirmed empty reservoirs and a lack of precipitation around the nozzle.

**Echocardiography:** Evaluation by trans-thoracic echocardiography (TTE) was performed with a digital ultrasound system (Vivid E9, GE Healthcare) using a high-frequency phased array transducer (12 S-D 4-12 MHz, GE Healthcare). The echocardiographic evaluation procedure was performed under general anesthesia and spontaneous breathing with an Isoflurane Rodent Anaesthesia System (Minerve, Esternay, France) (maintenance isoflurane 2% at room air). Rats were shaved, and body temperature was controlled during experiments. All analyses were blinded: rats' experimental conditions were unknown by the operator during TTE examination

and data interpretation. The following formula calculated the stroke volume: Stroke Volume = area ejection surface \* Velocity time integral. Aorta diameter was measured in parasternal long-axis view during systole when the diameter is greatest. Velocity time integral (VTI) was measured in apical four-chamber view using pulsed wave doppler. The aorta orifice area was calculated using the diameter by the following formula:  $area = \pi * radius^2$ , where radius = diameter/2.

**Immunoblot analysis:** Total protein from human or rat lung or isolated PA tissue samples was prepared as described previously<sup>48</sup>. Tissue or cell samples from rats or humans were prepared in lysis buffer containing 1% Igepal, 20mM Tris Hcl, 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 2mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, leupeptin 10μg/μl, pepstatin 10μg/μl, aprotinine 10μg/μl and protease inhibitor cocktail (aprotinin, leupeptin, and PefaBloc [Roche, Meylan, France]). Protein lysates (40 μg) were separated on SDS-PAGE and transferred to the nitrocellulose membrane. After blocking, membranes were incubated in T-TBS and 5% nonfat milk overnight at 4°C with primary antibodies:

Blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse diluted 1:10000 (Cell Signaling) or with HRP-conjugated goat anti-rabbit diluted 1:5000 (Cell Signaling), respectively. Antibodies were revealed using ECL reagents (Perkin Elmer). ImageJ Software was used to quantify the level of protein expression. The list of antibodies used is presented in Table S2 and in Major Ressources Table. β-Actin was used as a loading control.

**Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR):** Total gene expression was quantified using qPCR following the standard protocol for ready-to-use TaqMan gene expression assays (Life Technologies) on a StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies)<sup>6</sup>. Predesigned probe sets used in the experiments were Human ORAI1: Hs03046013\_m1; Human β-Actin: Hs01060665\_g1; Rat Orai1: Rn02397170\_m1; and Rat β-Actin: Rn00667869\_m1.

**Intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements:** hPASMCs were plated on 18-mm glass coverslips and loaded with 2 μmol/L Fura-2-AM dissolved in DMSO plus 20% pluronic acid (Life Technologies) and then incubated at 37°C for 30 min in darkness in Krebs solution (in mmol/L: 135 NaCl, 5.9 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 D-glucose) at pH 7.4. Loaded cells were washed twice with the physiological solution before imaging. Ca<sup>2+</sup> images were obtained using a microscope (Olympus IX71) equipped with a Sutter Fluo Lambda 421 LED system (Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA), which rapidly changed the excitation wavelengths between 340 nm and 380 nm. Emission was measured at 510 nm.

The Ca<sup>2+</sup>-free solution contained 1 mmol/L EGTA instead of 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> + nifedipine (L-type Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor) + KB-R7943 (Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor). Due to the high transfection efficiency, cytosolic Ca<sup>2+</sup> measurements were performed on the whole cell population. Image acquisition in selected cells and analysis with MetaFluor<sup>®</sup> 7.8 imaging software (Molecular Devices).

**Immunofluorescence staining:** Paraffin-embedded lung sections were prepared as described previously.<sup>49,50</sup> A list of antibodies used is provided in Table S3. Mouse IgG and rabbit pre-immune serum (both species of primary antibodies used in this study) were applied to lung sections, followed by anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 594. Other combinations of secondary antibodies gave the same negative result. The secondary antibody application (anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 594) also provided the same negative result. Additionally, we performed a negative control in lung or RV slice with rabbit IgG, indicating no Orai1, STIM1 and STIM2 immunostaining in the lung and no Orai1 staining in RV (Major Resources Table).

**Hemodynamic measurements and tissue collection:** Rats were placed under general anesthesia and spontaneous breathing with an isoflurane Rodent Anesthesia System (Minerve Esternay, France) (maintenance: isoflurane 2% in room air). Hemodynamic measurements,

such as heart rate (HR), right ventricular (RV) systolic pressure (RVSP; mmHg), and cardiac output (CO; mL/min), were blindly measured in unventilated anesthetized rats using a closed-chest technique. Under profound anesthesia (5% isoflurane), animals were euthanized by exsanguination. After catheterization, tissues were collected, and Fulton's index was calculated as the ratio of RV weight to left ventricular (LV) plus septal (S) weight ( $RV \div LV + S$ ).

Total pulmonary resistances were evaluated with the calculated mPAP value using the Chemla formula ( $mPAP = (0.61 * RVSP) + 2 \text{ mmHg}$ )<sup>51</sup>.

**Pulmonary vessel remodeling analysis:** The lungs were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and serially sectioned (5  $\mu\text{m}$ ). The histopathological evaluation of the lungs was performed by a pulmonary pathologist who was blinded to the rats' genotypes and treatment group assignments. The morphometric analyses were performed on sections stained with hematein-eosin-Safran (HES). The lung samples from all the conditions were analyzed by conventional light microscopy using quantitative semiautomated software (NIS-BR; Nikon, Champigny sur Marne, France). Vascular remodeling was assessed in all the pulmonary vessels more significantly than 50  $\mu\text{m}$  and less than 100  $\mu\text{m}$  identified in 20 randomly selected microscopic fields per tissue section. The wall thickness was calculated using the following equation:  $(\text{External diameter} - \text{Internal diameter}) / (\text{External diameter}) \times 100$ .

**Histological assessment on hearts:** Hearts were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded, and serially sectioned (5  $\mu\text{m}$ ). Heart sections were stained with Sirius red (0.1%) to assess heart fibrosis. Pictures were recorded at 10X on an EVOS microscope (Invitrogen). RV fibrosis was quantified using Image J software.

To assess the level of cardiomyocyte hypertrophy, sections were stained with FITC-conjugated wheat germ agglutinin (WGA) (50  $\mu\text{g/ml}$ ) and then observed on an EVOS microscope (Invitrogen). Pictures were recorded at 40X, and RV cardiomyocytes' diameters were

determined using Image J software by measuring the short axis of 10 cells/field (3 fields/ventricle/animal) at the level of the nucleus.

**Isometric tension measurement:** Human PAs were mounted on an emkaBATH4 modular tissue bath system (EMKA Technology, Paris, France) coupled with IOX software (EMKA Technologies).

As determined in preliminary experiments, human PAs were set at an optimal length by equilibration against a passive load of 0.6 g.

Vessels were bathed in Krebs solution containing (in mmol/L) 119 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.17 MgSO<sub>4</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, and 11 glucose at 37°C, and continuously aerated with a mixture of CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (5%/95%). After adding Krebs solution, vessels were contracted with 100 mmol/L K<sup>+</sup>-containing solutions (K100). Once a plateau was reached, the vessels were washed with Krebs solution for 30 min. DMSO or BTP2 (1 μmol/L) was used as a pretreatment before the dose-response to KCl (10–90 mmol/L) or U46619 (0.1 nM–3 μM). All modified Krebs solutions prepared with various KCl concentrations (K10 to K100) had an equimolar substitution of NaCl to maintain a constant osmolarity and [Cl<sup>-</sup>] compared with standard Krebs solution. The contractile response was expressed relative to the response to the K100 challenge.

**Wound healing assay:** We used the wound healing assay to evaluate cell migration. After 48 h of starvation (medium without growth factors: FBS, EGF, and insulin), human PASMCs were plated in a culture insert (Cat. No. 90209; Ibidi) at a density of  $1.2 \times 10^4$  cells per well in a fresh medium with cytosine arabinoside (10 μmol/L). After allowing cells to attach for 24 h, we removed the culture insert and washed the cells with phosphate-buffered saline to remove non-adherent cells. We then added fresh medium with different treatments (BTP2 at 1 μmol/L or JPIII at 0.5 μmol/L) and photographed the wound at time 0 and after 15 h (corresponding to approximately 50% of wound recovery). For siRNA treatment, cells were treated with control siRNA or siRNA against Orai1 24 h before starvation (72 h before removal of culture inserts).

Cell migration into the wound space was quantified using image J. Cell motility/invasion was assessed by the percentage of wound closure 15 h after initiation of wound healing ( $[(\text{area T0} - \text{area T15}) \div \text{area T15}] \times 100$ ).

**PASMCs induced-apoptosis measurement:** To induce apoptosis, we treated hPASMCs with staurosporine at 1  $\mu\text{mol/L}$  for 20 min or 50 nmol/L overnight. Cells were washed with cell staining buffer (Cat. No. 420201, BioLegend) and gently detached with trypsin and a cell scraper. After centrifugation (400 g, 4°C, 10 min), the supernatant was removed, and cells were stained with the FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit (Cat. No 640914, BioLegend) according to the manufacturer's recommendations. Cells were acquired by flow cytometry (MACSQuant, Miltenyi Biotec), with at least 35,000 cells counted in each sample and analyzed using Flowlogic software (Inivai Technologies).

**Statistical analyses:** Analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad, version 8.0 for Windows) and R statistical computing software. After checking with the Shapiro–Wilk, Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino & Pearson test and Anderson-Darling Tests normality test whether the sample data followed a normal distribution, differences between the two or more groups were assessed using an unpaired t-test or one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc analysis for multiple comparisons, respectively<sup>52</sup>. When conditions of parametric tests were not met, we used either a Mann-Whitney test or the data were submitted to an Aligned Rank Transform procedure in the ARTool R package (<https://cran.r-project.org/web/packages/ARTool/readme/README.html>), which allowed a nonparametric factorial ANOVA (repeated measurements when appropriate) to be performed considering the multiple observations per animal/patients as previously described<sup>53</sup>. All values are reported as mean  $\pm$  standard error of the mean. Representative images/figures were chosen representing the mean of each quantification. For all experiments, *P*-value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

**Table S1: Characteristics of Controls and PAH patients before lung transplantation**

	<b>PAH (n=20)</b>	<b>Control (n=10)</b>
<b>Age, years</b>	15 ( 48 ) 67	49 (65) 83
<b>Sex, M/F</b>	3M /20F	3M / 7F
<b>Mutation in BMPR2 gene, n</b>		NA
<b>carrier</b>	3	NA
<b>no-carrier</b>	17	NA
<b>mPAP, mmHg</b>	41 [56] 85	NA
<b>CI, l/min/m<sup>2</sup></b>	2.21 [2.7] 6	NA
<b>PVR, Wood units</b>	3.6 [9.875] 36	NA
<b>PCP, mmHg</b>	5 [9] 17	NA
<b>medication</b>		NA
<b>tritherapies</b>	80%	NA
<b>bitherapies</b>	5%	NA
<b>monotherapies</b>	0%	NA
<b>no PAH specific therapies</b>	15%	NA

**Table S2: Characteristics of primary antibodies used in Immunoblot studies**

<b>ANTIBODY</b>	<b>SPECIES</b>	<b>DILUTION</b>	<b>SUPPLIER</b>	<b>REFERENCE</b>
<b>Survivin</b>	Mouse	1/1000	Cell Signaling Technology	2808
<b>pP42/P44</b>	Rabbit	1/3000	Cell Signaling Technology	4376
<b>P42/P44</b>	Rabbit	1/3000	Cell Signaling Technology	9102
<b>pP38</b>	Rabbit	1/ 2000	Cell Signaling Technology	9211S
<b>P38</b>	Rabbit	1/2000	Cell Signaling Technology	7972
<b>p-Akt (Thr308)</b>	Rabbit	1/1000	Cell Signaling Technology	9275
<b>Akt</b>	Rabbit	1/2000	Cell Signaling Technology	2938
<b>P21</b>	Rabbit	1/2000	Cell Signaling Technology	610266
<b>Caspase 9</b>	Rabbit	1/2000	Cell Signaling Technology	9508
<b>β-Actin</b>	Mouse	1/5000	Sigma-Aldrich	A1978
<b>Orai1</b>	Rabbit	1/1000	Sigma-Aldrich	O8264
<b>STIM1</b>	Rabbit	1/1000	Sigma-Aldrich	S6072
<b>STIM2</b>	Rabbit	1/1000	Sigma-Aldrich	PRS4123
<b>Pan-Calcineurin A</b>	Rabbit	1/1000	Cell Signaling Technology	2614

**Table S3: Characteristics of primary antibodies used in immunofluorescence studies**

ANTIBODY	SPECIES	DILUTION	SUPPLIER	REFERENCE
<b><math>\alpha</math>-SMA-FITC</b>	Mouse	1/200	Sigma-Aldrich	F3777
<b>Orai1</b>	Rabbit	1/100	Sigma-Aldrich	O8264
<b>STIM1</b>	Rabbit	1/100	Sigma-Aldrich	S6072
<b>STIM2</b>	Rabbit	1/100	Sigma-Aldrich	PRS4123

**Table S4: Heart rate and stroke volume parameters**

Parameters	MCT + DMSO (n=6)	MCT + BTP2 (n=6)	P value
HR (bpm)	315 $\pm$ 41	354.7 $\pm$ 36.6	Two-tailed Mann Witney test 0.0931
Stroke Volume (ml)	70 $\pm$ 21.9	63.52 $\pm$ 15.9	Two-tailed Mann Witney test 0.3939

Parameters	CH + DMSO (n=5)	CH + BTP2 (n=6)	P value
HR (bpm)	393 $\pm$ 32	397 $\pm$ 19	Two-tailed Mann Witney test 0.918

Parameters	MCT + DMSO (n=6)	MCT + JP111 (n=6)	P value
HR (bpm)	402.3 $\pm$ 19.26	363.8 $\pm$ 18	Two-tailed Mann Witney test 0.0667
Stroke Volume (ml)	98.86 $\pm$ 5.37	87.54 $\pm$ 7.14	Two-tailed Mann Witney test 0.9143

Parameters	MCT + DMSO (n=6)	MCT + 5J4 (n=6)	P value
HR (bpm)	346 $\pm$ 23.9	369 $\pm$ 18.5	Two-tailed Mann Witney test 0.444

Parameters	SU/Hx + DMSO (n=8)	SU/Hx + BTP2 (n=8)	P value
HR (bpm)	333 $\pm$ 8.3	350 $\pm$ 6.04	Two-tailed unpaired t test 0.0846

*hPASMCs*

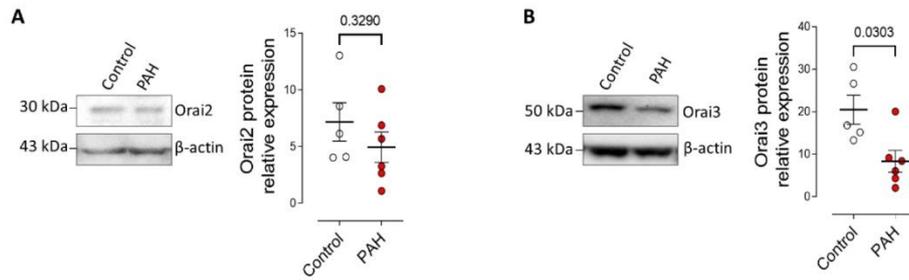


Figure S1

**Figure S1: Analysis of Orai2 and Orai3 expression in hPASMCs from control and patients with PAH.** Immunoblot images of Orai2 (A) and Orai3 (B) quantification (n = 5 for each condition). Orai2 and Orai3 expression was normalized to  $\beta$ -actin. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

*PAH-hPAECs*

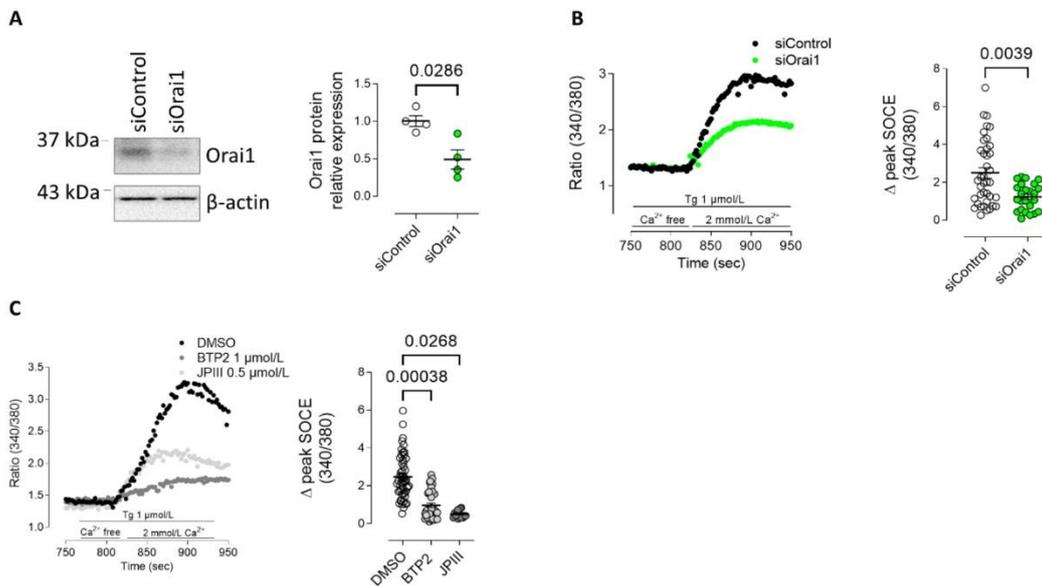


Figure S2

**Figure S2: Consequence of Orai1 knockdown or pharmacological inhibition on SOCE in PAH-hPAECs.** (A) PAH-hPAECs were transfected with siRNA against Orai1, and Immunoblot assessed knockdown efficiency (n = 4 for each condition).  $\beta$ -actin was used as a loading control. (B) SOCE and quantification of SOCE amplitude in PAH-hPAECs transfected with siControl or siOrai1 (n = 4 per condition, siControl 39 cells, siOrai1 24 cells). (C) Consequence of Orai1 inhibition (BTP2 or JPIII) on SOCE in PAH-hPAECs (n = 5 patients per condition, DMSO 52 cells, BTP2 39 cells, JPIII 25 cells). Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

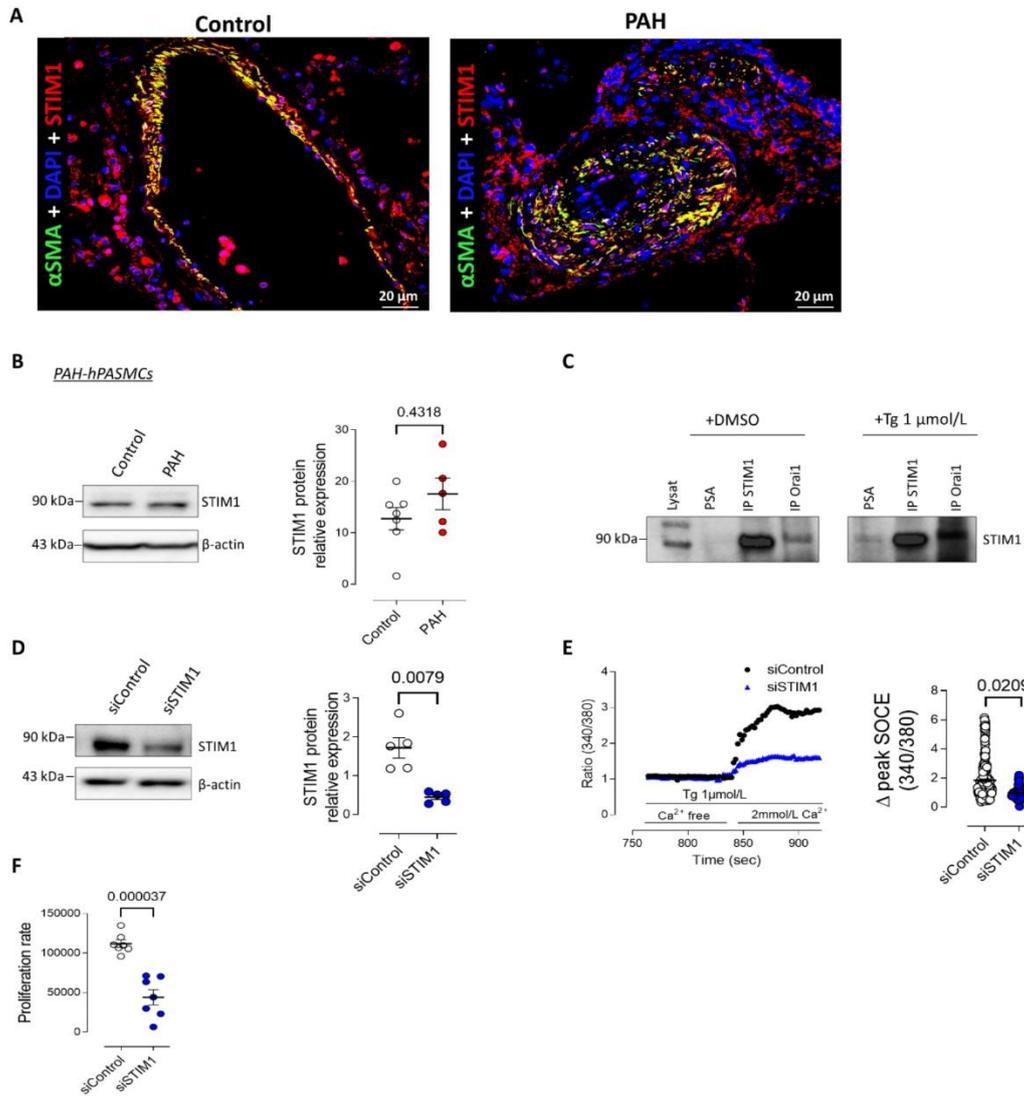


Figure S3

**Figure S3: Analysis of the localization, expression, and function of STIM1 in hPASMCs from control and PAH patients.** (A) Localization of STIM1 by immunofluorescence staining of paraffin-embedded lung sections from control subjects and patients with PAH. STIM1 (red) was localized to hPASMCs (green) in PAs from control subjects. Bar graph = 20 μm. (B) Immunoblot images of STIM1 and quantification of STIM1 expression in control hPASMCs and PAH-hPASMCs (n = 7 for control and 5 for PAH). (C) Co-immunoprecipitation

experiments in PAH-hPASMCs. Lysates (input lane) from PAH-hPASMCs treated (or not) with 1  $\mu\text{mol/L}$  Tg for 10 min were incubated with antibodies against STIM1 and Orai1. Immunoblots of the immunoprecipitated proteins were probed with antibodies against STIM1. (D) PAH-hPASMCs were transfected with siRNA against STIM1, and immunoblot assessed knockdown efficiency ( $n = 5$  for each condition).  $\beta$ -actin was used as a loading control. (E) Consequence of STIM1 knockdown on SOCE amplitude in PAH-hPASMCs ( $n = 6$  patients, siControl 196 cells, siSTIM1 55 cells). (F) The consequence of STIM1 knockdown on PAH-hPASMC proliferation. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

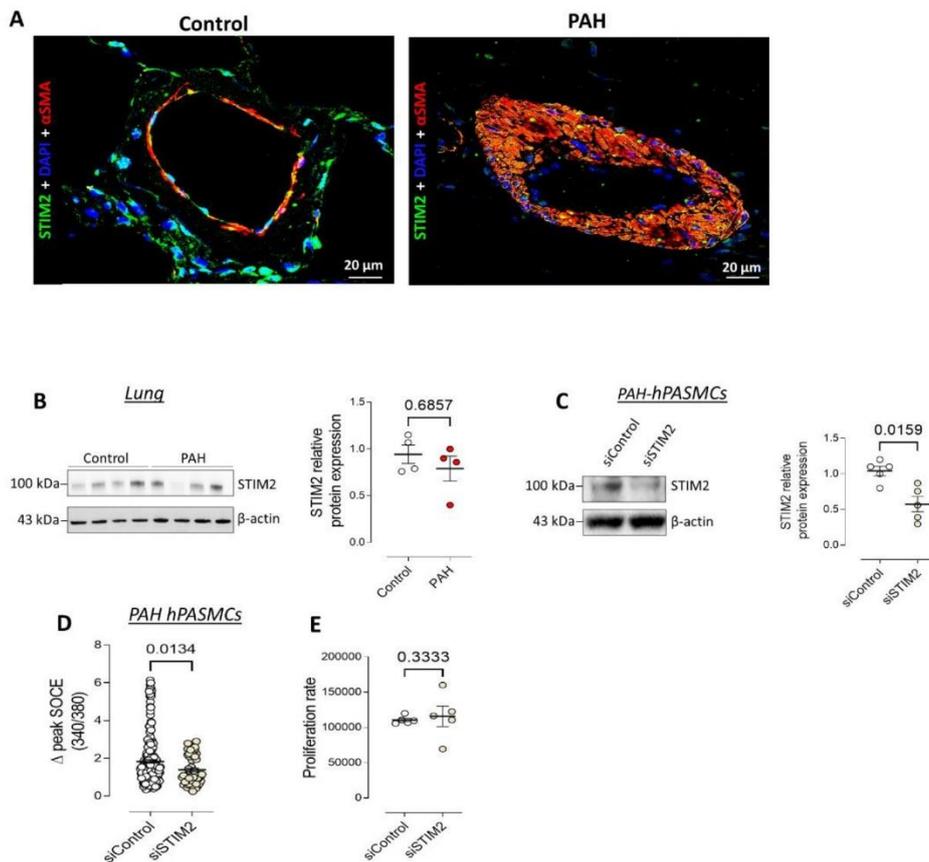


Figure S4

**Figure S4: Analysis of the localization, expression, and function of STIM2 in hPASCs from control and patients with PAH.** (A) Localization of STIM2 by immunofluorescence staining of paraffin-embedded lung sections from control subjects and patients with PAH. In PAs from control subjects, STIM2 staining (red) was localized to hPASCs (green). Bar graph = 20  $\mu$ m. (C) Immunoblot images of STIM2 in lung tissue from control subjects and patients with PAH. Quantification of STIM2 expression in lung tissue from control subjects and patients with PAH (n = 4 patients for each condition). (D) PAH-hPASCs were transfected with siRNA against STIM2, and immunoblot assessed knockdown efficiency.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. (E) Quantification of SOCE amplitude in PAH-hPASCs transfected with siControl or siSTIM2 (n = 5 patients, siControl 106 cells, siSTIM2 64 cells). (E) The consequence of STIM2 knockdown on PAH-hPASC proliferation. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

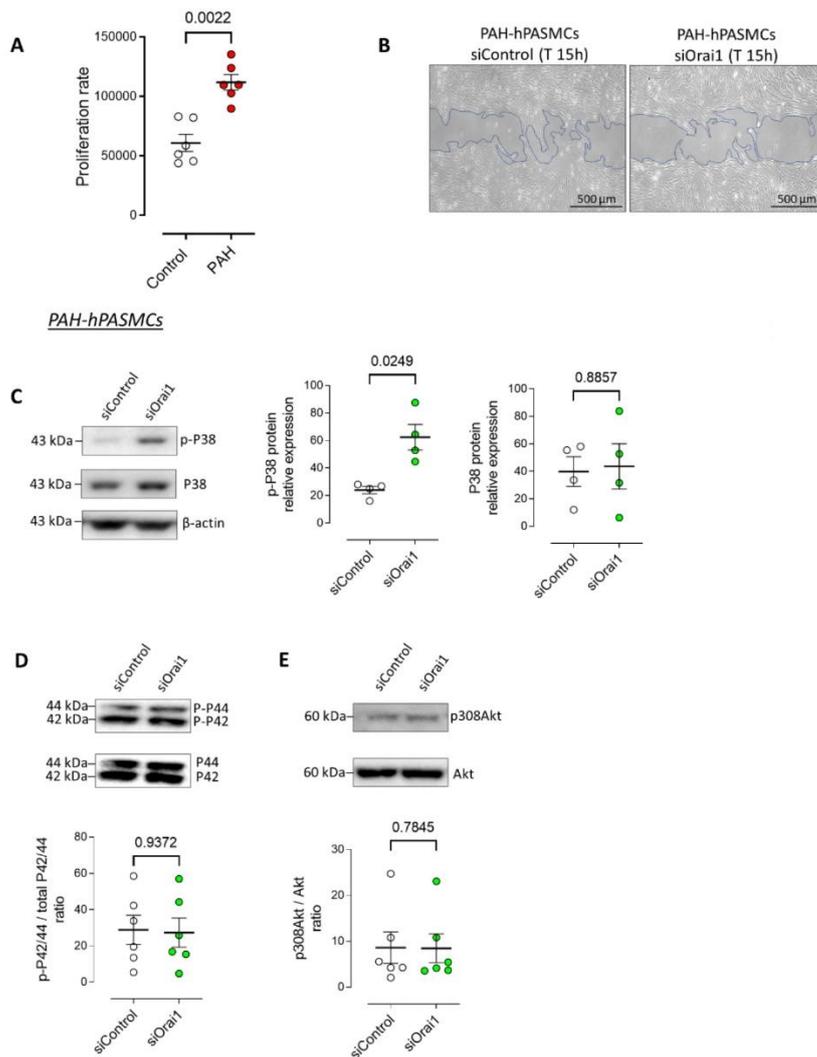


Figure S5

**Figure S5: Consequences of Orai1 knockdown on cell migration and the phosphorylation of calcineurin P38, P42/P44 and Akt in PAH-hPASMCs.** (A) Proliferation rate in control-hPASMCs and PAH-hPASMCs (n = 6 patients). (B) *In-vitro* wound closure assays were performed in control hPASMCs and PAH-hPASMCs. Cell motility/invasion was assessed by the percentage of wound closure 15 h after wound healing initiation ( $[(\text{area T0} - \text{area T15}) \div \text{area T15}] \times 100$ ). Wound closure images (15 h after initiation) in control hPASMCs and PAH-hPASMCs. (Immunoblot images and quantification of p-P38 and P38 (n = 4 for each condition)

(C), p-P42/44 and total P42/44 (n = 6 for each condition) (D), Akt and p308Akt (n = 6 for each condition) (E) in PAH-hPASMCs transfected with siControl or siOrai1. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

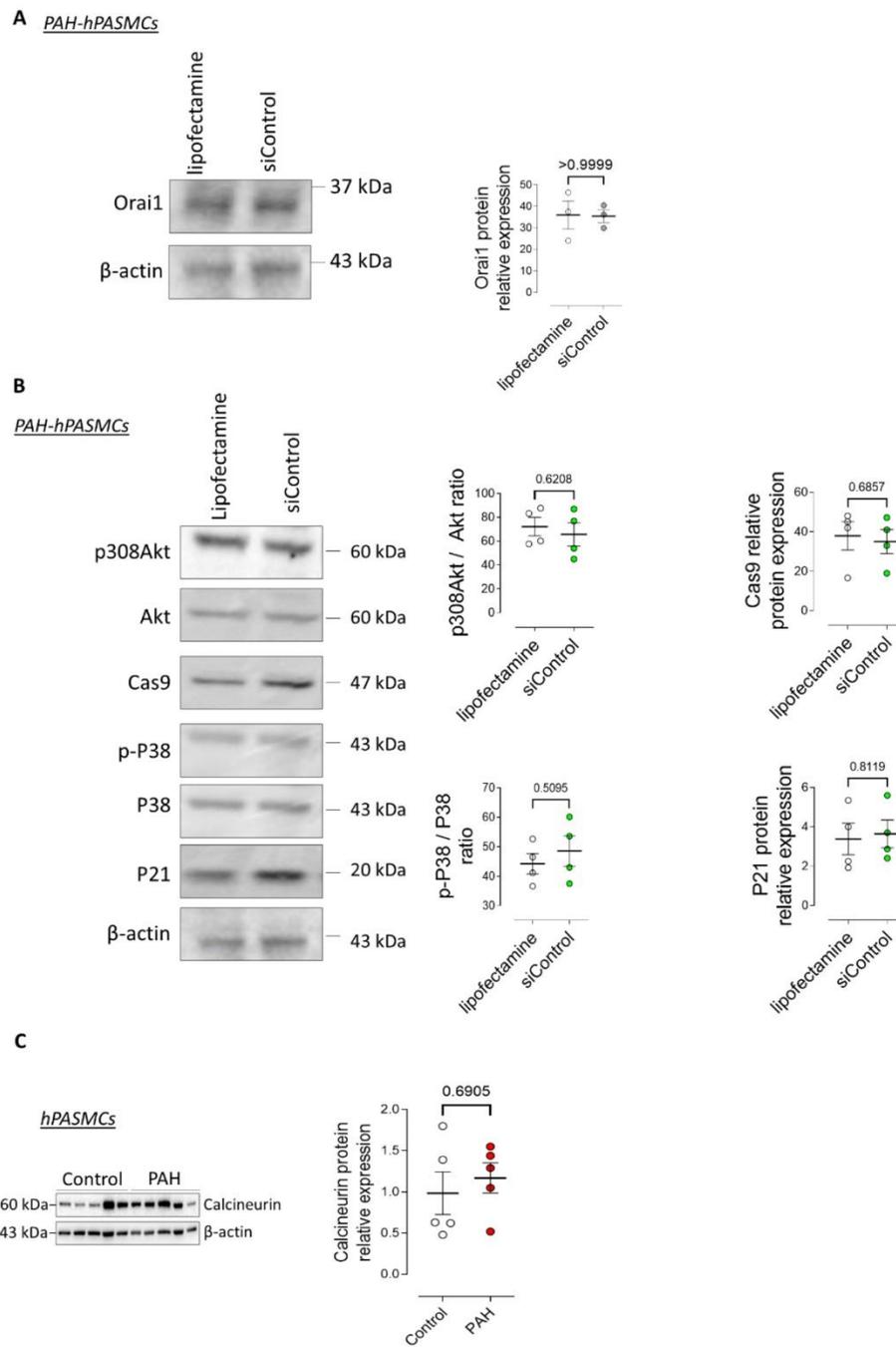


Figure S6

**Figure S6: Consequence of siControl on Orai1, Akt, Cas9, P38, P21, and calcineurin expression in PAH-hPASMCs.** (A) Immunoblot images and quantification of Orai1 expression in PAH-hPASMCs + lipofectamine alone or transfected with siControl (n = 3). (B) Immunoblot

images and quantification of p308Akt and Akt, Cas9, p-P38, and P38 and P21 expression in PAH-hPASMCs + lipofectamine alone or transfected with siControl (n = 4).  $\beta$ -actin was used as a loading control. (C) Immunoblot images of calcineurin and quantification of calcineurin expression in hPASMCs from control and patients with PAH (n = 5).  $\beta$ -actin was used as a loading control in hPASMCs and patients with PAH. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

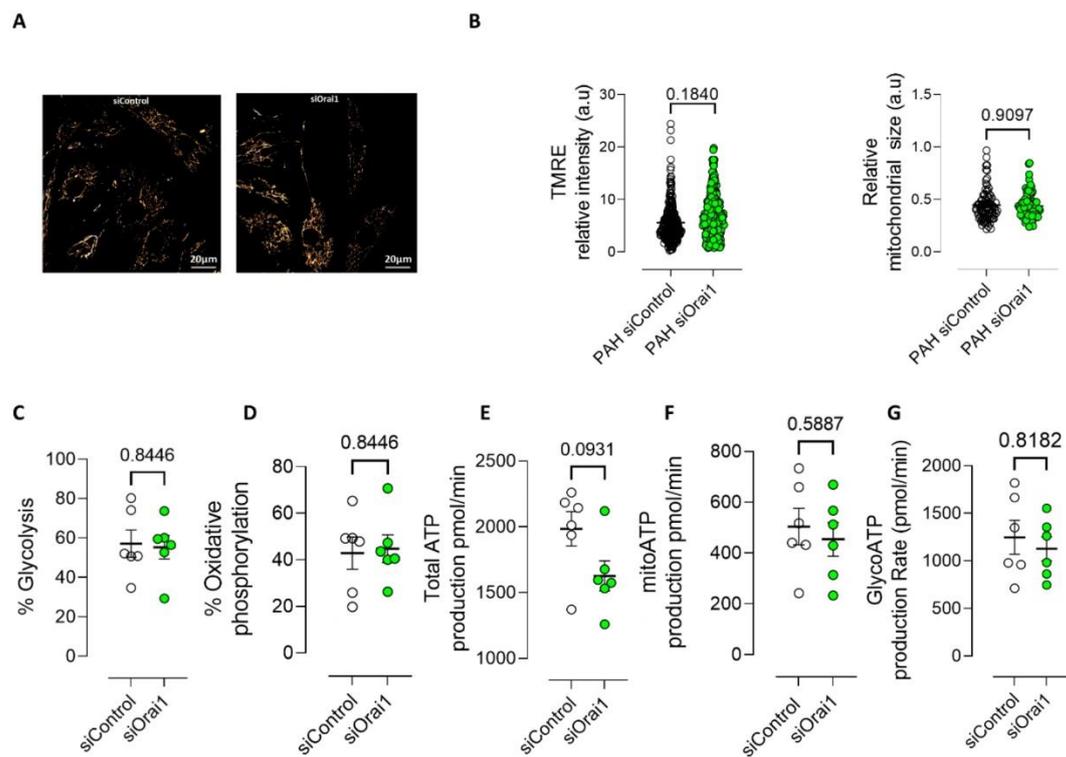


Figure S7

**Figure S7: Consequence of Orai1 knockdown in PAH-hPASMCs on mitochondrial membrane potential and ATP production.** (A) Confocal imaging of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) using TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester) on PAH-hPASMCs treated with si-Orai1. (B) Quantification of TMRE intensity n = 7 patients, PAH siControl 242 cells, PAH siOrai1 274 cells and relative mitochondria size (n = 7 patients, PAH siControl 88 cells,

PAH siOrai1 94 cells). Quantification of % of Glycolysis (C), of % of Oxidative phosphorylation (D), the total ATP production (E), the mitochondrial ATP production (F), and ATP produced by glycolysis (G) in PAH-hPASMCs, transfected with siControl and siOrai1 (n = 6 patients). Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

PAH-hPASMCs

Staurosporine-induced apoptosis 20 min

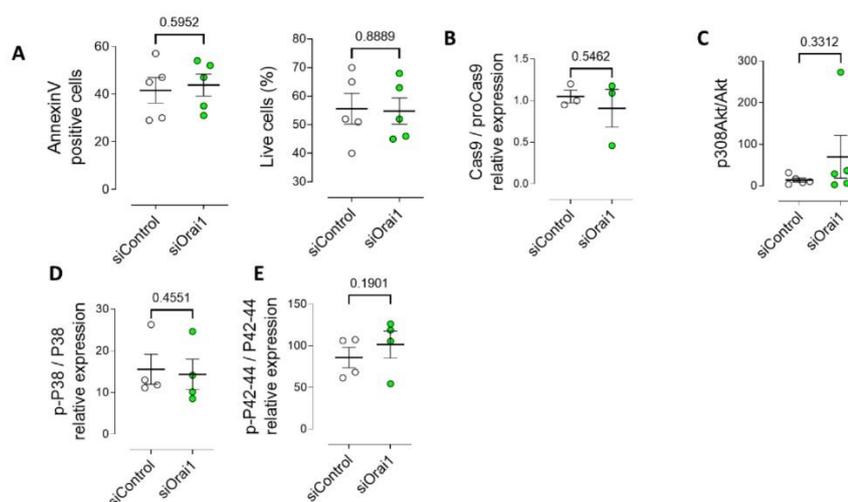


Figure S8

**Figure S8: Consequence of Orai1 knockdown on apoptosis in PAH-hPASMCs exposed to short-term staurosporine (20 min).** PAH-hPASMCs were exposed to 1  $\mu\text{mol/L}$  staurosporine for 20 min at 72 h after transfection of siControl or siOrai1. (A) Quantification of the percentage of Annexin V-positive and live PAH-hPASMCs (n = 5 patients). Quantification of the expression of Caspase 9/pro-Caspase 9 (n = 3 for each condition) (B), p308Akt/Akt (n = 5 for each condition) (C), pP38/P38 (n = 4 for each condition) (D), pP42/44/P42–44 (n = 4 for each condition) (E). Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

*Staurosporine-induced apoptosis 20 min*

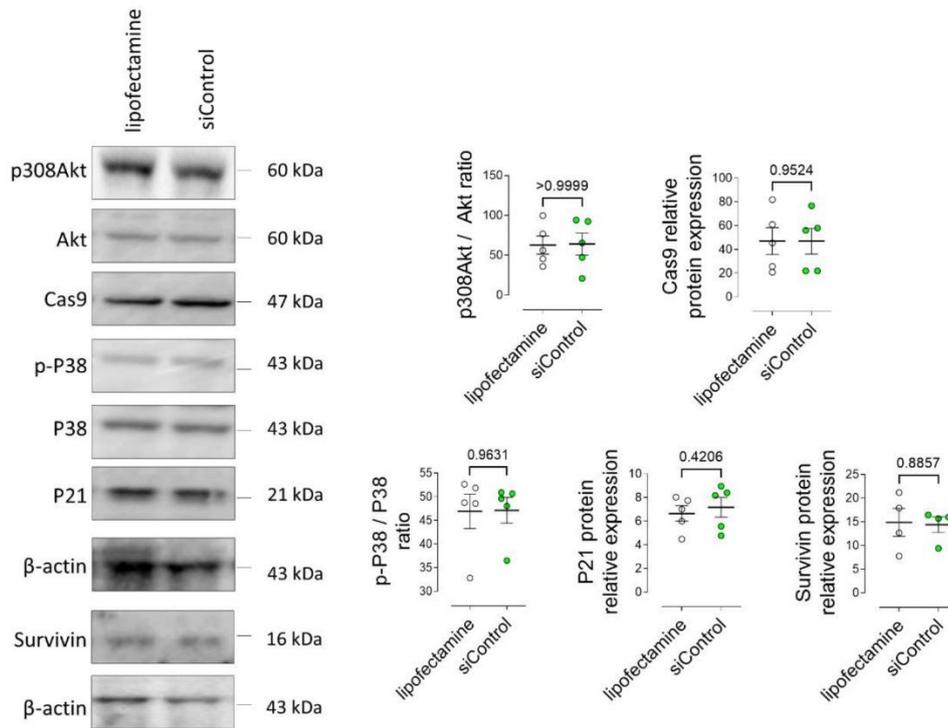


Figure S9

**Figure S9: Consequence of siControl on Akt, Cas9, P38, P21 and survivin in PAH-hPASCs exposed to staurosporine.** Immunoblot images and quantification of p308Akt and Akt (n = 5 for each condition), Cas9 (n = 5 for each condition), pP38 and P38 (n = 5 for each condition), P21 (n = 5 for each condition) and survivin (n = 4 for each condition) expression in PAH-hPASCs with lipofectamine or transfected with siControl and exposed overnight to 50 nmol/L staurosporine. β-actin was used as a loading control. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

Control-hPASMCs

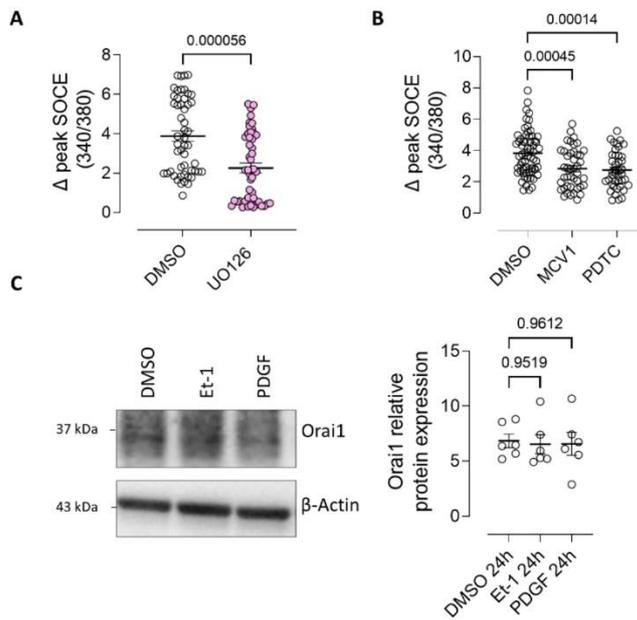


Figure S10

**Figure S10: Consequence of activation of endothelin-1 and PDGF pathways on Orai1 expression in hPASMCs.** (A) Quantification of SOCE amplitude in PAH-hPASMCs treated with UO126 or DMSO (n = 5 patients, DMSO 51 cells, UO126 48 cells). (B) Quantification of SOCE amplitude in each experimental condition (n = 5 patients, DMSO 64 cells, MCV1 43 cells, PDTC 41 cells). (C) Immunoblot images and quantification of Orai1 in control-hPASMCs treated 24h with Endothelin-1 (Et-1 200 nmol/L) or with PDGF (20 ng/ml) (n = 5 patients). Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

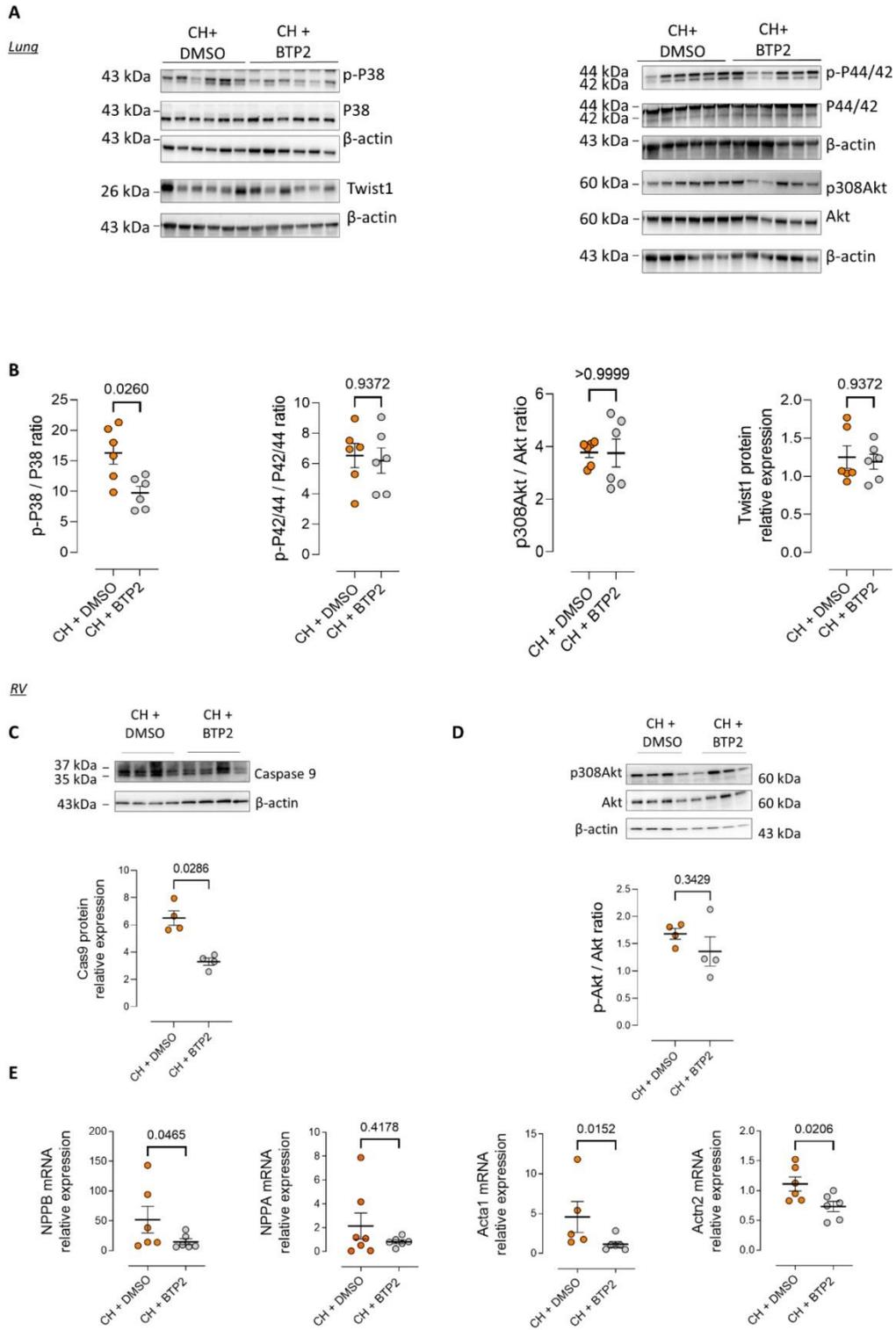


Figure S11

**Figure S11: Consequence of in vivo *Orai1* inhibition on *P42/44*, *Akt*, *P38*, and *Twist1* pathways in CH-PH rats.** (A) Immunoblot images and quantification (B) of p-P38 / P38 ratio, p-P42/44 / P42/44 ratio, p-308Akt / Akt ratio, and Twist1 in lung from CH + DMSO and CH + BTP2 groups (n = 6 rats per condition). (C) Immunoblot images and quantification of Caspase 9 in RV from, CH + DMSO and CH + BTP2 groups (n = 4 rats per condition). (D) Immunoblot images and quantification of p308Akt / Akt ratio in RV from, CH + DMSO and CH + BTP2 groups (n = 4 rats per condition). (E) mRNA expression of NPPB (BNP) (n = 6 rats per condition), NPPA (ANP) (n = 7 for CH + DMSO rats and 6 for CH + BTP2), Acta1 (actin alpha 1) (n = 5 for CH + DMSO rats and 6 for CH + BTP2) and Actn2 (Actinin Alpha 2) (n = 6 rats per condition) in RV from, CH + DMSO and CH + BTP2 groups. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

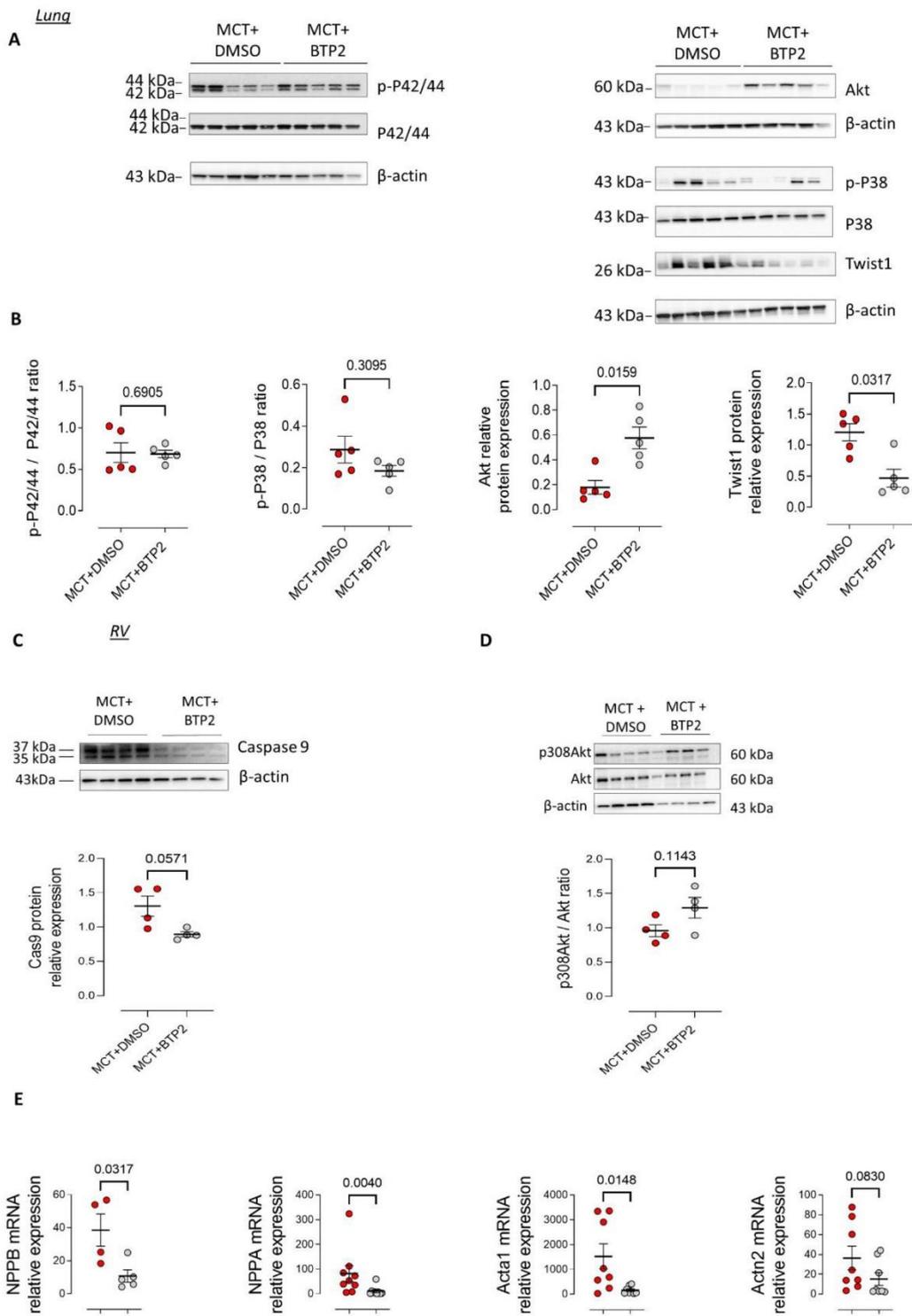


Figure S12

**Figure S12: Consequence of *in vivo* Orai1 inhibition on P42/44, Akt, P38, and Twist1 pathways in MCT-PH rats.** (A) Immunoblot images and quantification (B) of p-P42/44 / P42/44 ratio, p-P38 / P38 ratio, AKT1 and Twist1 in lung from, MCT + DMSO and MCT + BTP2 groups (n = 5 rats per condition). (C) Immunoblot images and quantification of Caspase 9 in RV from, MCT + DMSO and MCT + BTP2 groups (n = 4 rats per condition). (D) Immunoblot images and quantification of p308Akt / Akt ratio in RV from, MCT + DMSO and MCT + BTP2 groups (n = 4 rats per condition). (E) mRNA expression of NPPB (BNP) (n = 4 for MCT + DMSO rats and 4 for MCT + BTP2 rats), NPPA (ANP) (n = 6 for MCT + DMSO rats and 6 for MCT + BTP2 rats), Acta1 (actin alpha 1) (n = 6 for MCT + DMSO rats and 6 for MCT + BTP2 rats) and Actn2 (Actinin Alpha 2) (n = 6 for MCT + DMSO rats and 6 for MCT + BTP2 rats) in RV from, MCT + DMSO and MCT + BTP2 groups. Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

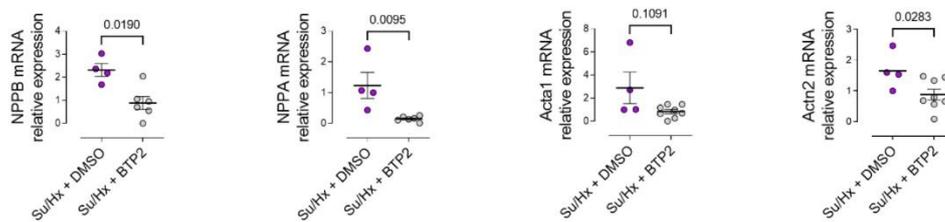


Figure S13

**Figure S13. Consequences of BTP2 treatment on RV hypertrophic markers.** mRNA expression of NPPB (BNP), NPPA (ANP), Acta1 (actin alpha 1) and Actn2 (Actinin Alpha 2) in RV from, Su/Hx + DMSO and Su/Hx + BTP2 groups (n = 4 Su/Hx + DMSO and n = 6 Su/Hx + BTP2). Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

MCT induced PH rats

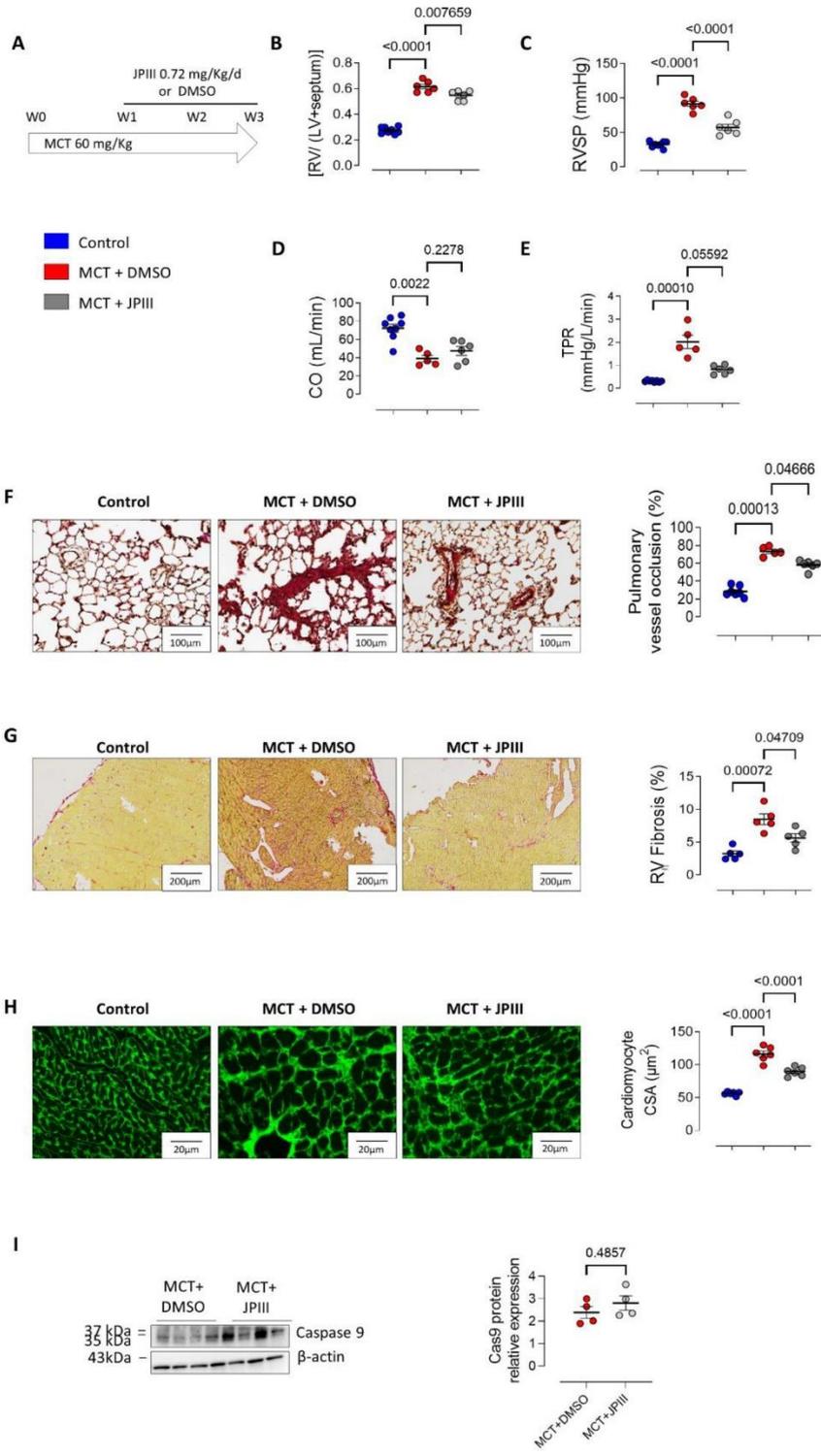


Figure S14

**Figure S14: In-vivo pharmacological inhibition of *Orai1* with JPIII reduces the development of MCT-induced PH in rats.** (A) *In-vivo* experimental design. One MCT subcutaneous injection treated rats at week 0 (W0). JPIII (0.72 mg/Kg/d or DMSO) was administered for 14 days from W1 to W3 by osmotic pump delivery. (B) Fulton's index (n = 8 for the Control rats, 5 for the MCT + DMSO rats and 6 for the MCT + JPIII rats), (C) RVSP (n = 8 for the Control rats, 5 for the MCT + DMSO rats and 6 for the MCT + JPIII rats), (D) CO (n = 8 for the Control rats, 4 for the MCT + DMSO rats and 6 for the MCT + JPIII rats), and (E) TPR (n = 8 for the Control rats, 5 for the MCT + DMSO rats and 6 for the MCT + JPIII rats). (F) Hematoxylin/eosin staining of paraffin-embedded lung sections and pulmonary vessel occlusion (%) in control, MCT + DMSO, and MCT + JPIII groups (n = 7 for the Control rats, 5 for the MCT + DMSO rats and 6 for the MCT + JPIII rats). (G) Sirius red staining of paraffin-embedded RV sections and quantification of the percentage of fibrosis in RV tissue (n = 5 rats per condition). (H) WGA staining of paraffin-embedded RV sections and quantification of the cardiomyocyte cross-section area (CSA,  $\mu\text{m}^2$ ) in RV tissue (n = 6 for the Control rats, 6 for the MCT + DMSO rats and 6 for the MCT + JPIII rats). Caspase 9 protein expression in RV tissues from the control, MCT + DMSO, and MCT + JPIII groups (n = 4 rats per condition). Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

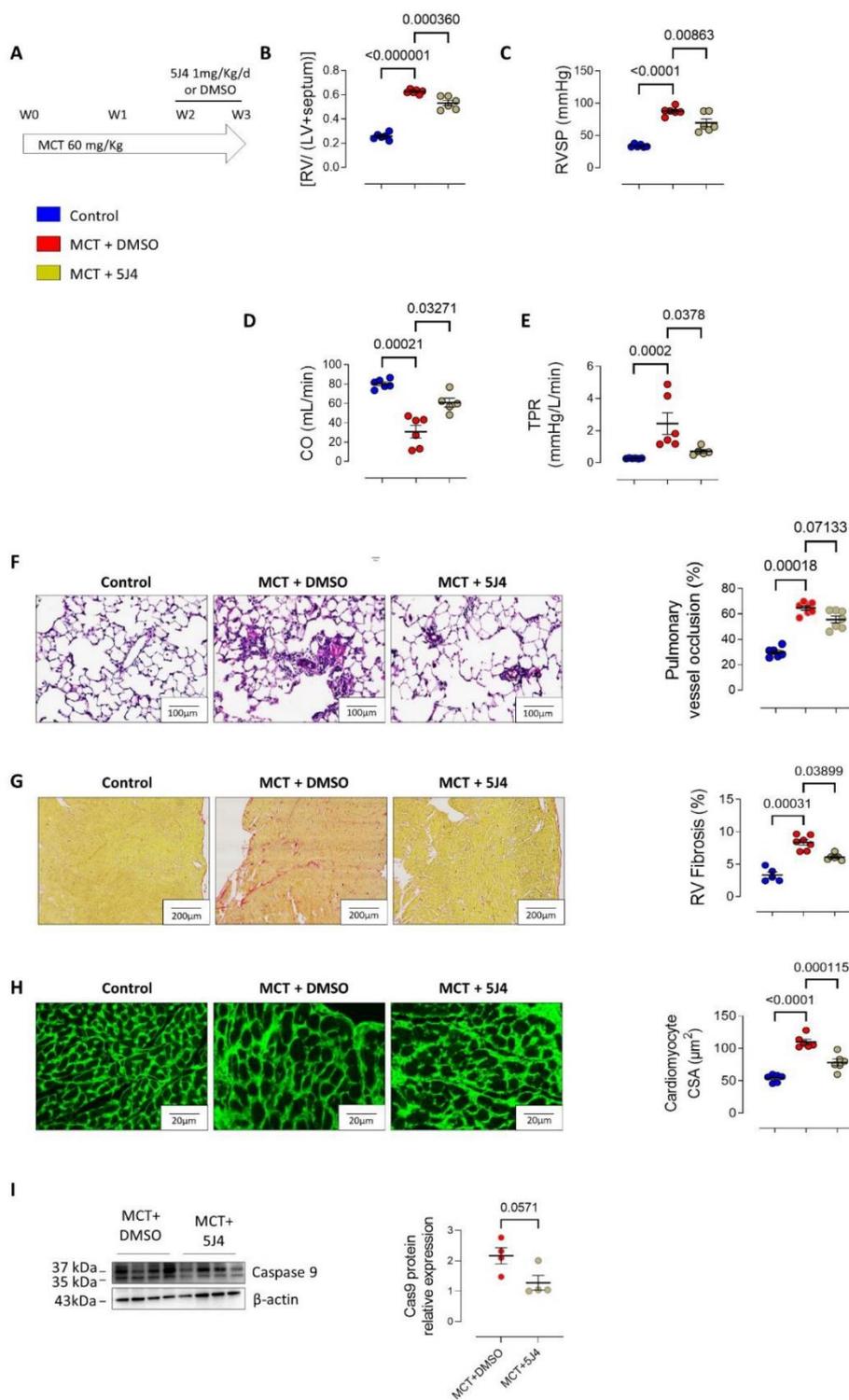


Figure S15

**Figure S15: In-vivo pharmacological inhibition of *Orai1* with 5J4 reduces the development of MCT-induced PH in rats.** (A) *In-vivo* experimental design. Rats have treated with one MCT subcutaneous injection at week 0 (W0). 5J4 (1 mg/kg/day) or DMSO was administered intraperitoneal injection for seven days from W2 to W3. (B) Fulton index (n = 6 rats per condition), (C) RVSP (n = 6 rats per condition), (D) CO (n = 6 for the Control rats, 6 for the MCT + DMSO rats and 5 for the MCT + 5J4 rats), and (E) TPR (n = 6 for the Control rats, 6 for the MCT + DMSO rats and 5 for the MCT + 5J4 rats). (F) Hematoxylin/eosin staining of paraffin-embedded lung sections and Pulmonary vessel occlusion (%) in the control, MCT + DMSO, and MCT + 5J4 groups (n = 6 for the Control rats, 7 for the MCT + DMSO rats and 7 for the MCT + 5J4 rats). (G) Sirius red staining of paraffin-embedded RV sections and quantification of the percentage of fibrosis in RV tissue (n = 5 for the Control rats, 8 for the MCT + DMSO rats and 5 for the MCT + 5J4 rats). (H) WGA staining of paraffin-embedded RV sections and quantification of the cardiomyocyte cross-section area (CSA,  $\mu\text{m}^2$ ) in RV tissue (n = 6 for the Control rats, 6 for the MCT + DMSO rats and 6 for the MCT + 5J4 rats). (I) Caspase 9 protein expression in RV tissues from the control, MCT + DMSO, and MCT + 5J4 groups (n = 4 rats per condition). Statistical tests and exact P values are provided in Table S5.

## 2<sup>ÈME</sup> PROJET : CONTRIBUTION OF TRPC CHANNELS IN HUMAN AND EXPERIMENTAL PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION

**Auteurs:** Bastien Masson, Anais Saint-Martin Willer, Mary Dutheil, Lucille Penalva, Hélène Le Ribeuz, Kristelle El Jekmek, Yann Ruchon, Sylvia Cohen-Kaminsky, Jessica Sabourin, Marc Humbert, Olaf Mercier, David Montani, Véronique Capuano et Fabrice Antigny

**Publié** le 27/06/2023, American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology

**Doi :** 10.1152/ajplung.00011.2023

### 1 RESUME DE L'ARTICLE

L'HTAP se caractérise par une obstruction progressive des AP, entraînant une hypertrophie et une défaillance du ventricule droit. Les résultats de ma première étude ont révélé une exacerbation du SOCE dans les CML-AP HTAP, contribuant aux dysfonctions des CML-AP HTAP. Bien que le canal Orai1 soit identifié comme acteur majoritaire de l'influx SOCE, les canaux TRPC peuvent contribuer à une partie non négligeable du SOCE. La famille des canaux TRPC, des canaux cationiques perméables au  $Ca^{2+}$ , est composée de sept isoformes (TRPC1 à TRPC7) avec TRPC2 qui est un pseudogène chez l'Homme. Des études de la littérature montrent une implication des TRPC dans la prolifération et la migration cellulaire des CML systémiques et CML-AP exposées à l'hypoxie. De plus, un polymorphisme dans le gène de TRPC6 a été identifié chez quelques patients HTAP.

Dans cette étude, j'ai étudié la localisation et l'expression des différents canaux TRPC dans les AP et les CML-AP de patients contrôles et atteints d'HTAP, ainsi que leurs contributions *in vitro* au phénotype des CML-AP HTAP. *In vivo*, j'ai également évalué la contribution du canal TRPC3 au développement de l'HTAP induite par exposition à la MCT chez le rat.

Premièrement, j'ai trouvé une augmentation protéique des canaux TRPC1 et TRPC3 dans les AP isolées de patients atteints d'HTAP. L'ARNm des canaux TRPC5 et TRPC7 n'ont pas été détectés dans ces AP humaines. Dans les CML-AP de patients atteints HTAP, nous avons retrouvé une augmentation protéique du canal TRPC3 et TRPC6, associée à une diminution du canal TRPC4.

NF- $\kappa$ B semble réguler la surexpression de TRPC3 tandis que NFAT semble contribuer à

la surexpression de TRPC6. La sous-expression de chaque isoforme de TRPC par siARN a révélé que dans les CML-AP contrôles, seul TRPC1 est impliqué dans le SOCE, tandis que dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP les canaux TRPC1/C3/C4/C6 sont tous impliqués dans le SOCE. Néanmoins, nous avons montré que seul TRPC3 est impliqué dans la suractivation de la calcineurine des CML-AP HTAP.

De plus, j'ai constaté par des expériences menées avec des siARN que tous les TRPC exprimés sont impliqués dans la prolifération et la résistance à l'apoptose des CML-AP HTAP et que seuls TRPC1 et TRPC4 contribuent à la migration accrue des CML-AP HTAP.

Dans le modèle expérimental d'HTAP chez le rat MCT, je n'ai trouvé aucune modification de l'expression de TRPC1, TRPC4, TRPC5 ou TRPC6 dans les poumons de rats exposés à la MCT. En revanche, j'ai montré une augmentation de l'expression protéique de TRPC3 dans les poumons de rats exposés à la MCT. J'ai mis en évidence son implication dans l'exacerbation du SOCE des CML-AP de rats exposés à la MCT. *Ex vivo*, par inhibition pharmacologique, nous avons montré que TRPC3 contribue à la contraction des AP de rats MCT induite par un mimétique du TXA2.

Enfin, nous avons mis en évidence que l'inhibition pharmacologique de TRPC3 par le composé Pyr3 réduit le développement de l'HTAP expérimentale dans le modèle MCT. En effet, l'inhibition TRPC3 a amélioré l'hypertrophie du VD, les pressions systoliques du VD, le débit cardiaque ainsi que les résistances vasculaires pulmonaires. Ces améliorations hémodynamiques sont associées à une diminution du remodelage des vaisseaux pulmonaires, de la fibrose et du diamètre des cardiomyocytes du VD.

Dans cette deuxième étude, j'ai montré, *in vitro*, que l'inhibition de TRPC1/C3/C4/C6 réduit le phénotype pathologique des CML-AP HTAP et que l'inhibition curative *in vivo* de TRPC3 améliore la condition des rats atteints d'HTAP expérimentale dans le modèle MCT.

Nous en concluons donc que l'inhibition pharmacologique du canal TRPC3 (mais aussi les autres canaux TRPC en raison de leur implication *in vitro*) peut être une cible pertinente pour réduire le remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTAP.

## **2 PUBLICATION**

## RESEARCH ARTICLE

## Contribution of transient receptor potential canonical channels in human and experimental pulmonary arterial hypertension

 Bastien Masson,<sup>1,2</sup> Anais Saint-Martin Willer,<sup>1,2</sup> Mary Dutheil,<sup>1,2,3</sup> Lucille Penalva,<sup>1,2</sup> Hélène Le Ribez,<sup>1,2</sup> Kristelle El Jekmek,<sup>1,2</sup> Yann Ruchon,<sup>1,2,3</sup>  Sylvia Cohen-Kaminsky,<sup>1,2</sup> Jessica Sabourin,<sup>4</sup> Marc Humbert,<sup>1,2,5</sup> Olaf Mercier,<sup>1,2,6</sup>  David Montani,<sup>1,2,5</sup> Véronique Capuano,<sup>1,2,3</sup> and  Fabrice Antigny<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculté de Médecine, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; <sup>2</sup>INSERM UMR\_S 999, Hypertension pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France; <sup>3</sup>Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis Robinson, France; <sup>4</sup>INSERM UMR-S 1180, Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France; <sup>5</sup>Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; and <sup>6</sup>Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Transplantation Cardio-Pulmonaire, Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Le Plessis Robinson, France

### Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is due to progressive distal pulmonary artery (PA) obstruction, leading to right ventricular hypertrophy and failure. Exacerbated store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE) contributes to PAH pathogenesis, mediating human PA smooth muscle cell (hPASMC) abnormalities. The transient receptor potential canonical channels (TRPC family) are  $Ca^{2+}$ -permeable channels contributing to SOCE in different cell types, including PASMCs. However, the properties, signaling pathways, and contribution to  $Ca^{2+}$  signaling of each TRPC isoform are unclear in human PAH. We studied in vitro the impact of TRPC knockdown on control and PAH-hPASMCs function. In vivo, we analyzed the consequences of pharmacological TRPC inhibition using the experimental model of pulmonary hypertension (PH) induced by monocrotaline (MCT) exposure. Compared with control-hPASMCs cells, in PAH-hPASMCs, we found a decreased TRPC4 expression, overexpression of TRPC3 and TRPC6, and unchanged TRPC1 expression. Using the siRNA strategy, we found that the knockdown of TRPC1-C3-C4-C6 reduced the SOCE and the proliferation rate of PAH-hPASMCs. Only TRPC1 knockdown decreased the migration capacity of PAH-hPASMCs. After PAH-hPASMCs exposure to the apoptosis inducer staurosporine, TRPC1-C3-C4-C6 knockdown increased the percentage of apoptotic cells, suggesting that these channels promote apoptosis resistance. Only TRPC3 function contributed to exacerbated calcineurin activity. In the MCT-PH rat model, only TRPC3 protein expression was increased in lungs compared with control rats, and in vivo "curative" administration of a TRPC3 inhibitor attenuated PH development in rats. These results suggest that TRPC channels contribute to PAH-hPASMCs dysfunctions, including SOCE, proliferation, migration, and apoptosis resistance, and could be considered as therapeutic targets in PAH.

**NEW & NOTEWORTHY** TRPC3 is increased in human and experimental pulmonary arterial hypertension (PAH). In PAH pulmonary arterial smooth muscle cells, TRPC3 participates in the aberrant store-operated  $Ca^{2+}$  entry contributing to their pathological cell phenotypes (exacerbated proliferation, enhanced migration, apoptosis resistance, and vasoconstriction). Pharmacological in vivo inhibition of TRPC3 reduces the development of experimental PAH. Even if other TRPC acts on PAH development, our results prove that TRPC3 inhibition could be considered as an innovative treatment for PAH.

calcineurin; PAH; Pyr3; SOCE; TRPC

### INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and progressive cardiovascular disease resulting from obstruction of the distal pulmonary artery (PA), leading to elevated pulmonary vascular resistance (PVR), right ventricular (RV) hypertrophy, and ultimately, RV failure (RVF) and death (1). According to the new guidelines, PAH is defined by a mean PA pressure  $>20$  mmHg, a PVR  $>2$  Wood units, and a PA

wedge pressure  $\leq 15$  mmHg at rest (2). PAH is a multifactorial syndrome that can be explained by dysfunction of all cell types composing the pulmonary circulation, particularly PA smooth muscle cells (PASMCs), including vasoconstriction, excessive migration, apoptosis resistance, and hyperproliferation (1). Despite adequate therapeutics that prolong patient survival, lung transplantation is the ultimate therapy for eligible patients with PAH, meaning that identifying novel targets is needed to improve patient management.

Correspondence: F. Antigny (fabrice.antigny@inserm.fr).  
Submitted 10 January 2023 / Revised 21 June 2023 / Accepted 21 June 2023

http://www.ajplung.org

1040-0605/23 Copyright   2023 the American Physiological Society.



L1

We demonstrated that exacerbated intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) contributes to PASMCM dysfunction in PAH (3). Among  $Ca^{2+}$  channel families, store-operated  $Ca^{2+}$  channels (SOCs) may play a critical role in regulating PASMCM function (3, 4). Three essential components constitute SOC: the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum (ER/SR)  $Ca^{2+}$  sensor belonging to the stromal interaction molecule family (STIM1-2) and two  $Ca^{2+}$  channels, namely, TRPC (transient receptor potential canonical) and Orai (Orai1-3) (3). TRPC channels are nonselectively permeable to cations, including potassium ( $K^+$ ), sodium ( $Na^+$ ), calcium ( $Ca^{2+}$ ), and magnesium ( $Mg^{2+}$ ) (5). The TRPC subfamily consists of seven members, from TRPC1 to TRPC7, and TRPC2 is a pseudogene in humans (6). TRPC contributes to the proliferation and migration of systemic vascular endothelial cells and smooth muscle cells (7). Gene polymorphism in the *TRPC6* gene was identified in a few patients with PAH, predisposing them to develop PAH (8). The double *trpc1/trpc6* knockout mice are protected from chronic hypoxia (CH)-induced PH (9). The triple *trpc1/trpc3/trpc6* knockout mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction without any consequence on pulmonary vascular obstruction induced by CH exposure (10). However, in human PASMCMs (hPASMCMs), the role of each expressed TRPC channel in PAH pathological phenotypes remains elusive.

In the present study, we investigated the expression and function of TRPC isoforms in human PA and human PASMCMs isolated from control (control-hPASMCMs) and PAH patients (PAH-hPASMCMs) and their contribution to PAH-hPASMCM phenotypes (proliferation, migration, contraction, and apoptosis resistance). We also evaluated *in vivo* the contribution of TRPC3 to the development of experimental PH caused by monocrotaline (MCT) exposure in rats. Overall, we show that all expressed TRPC channels contribute to cellular dysfunction occurring in PAH-hPASMCMs and that targeting TRPC could constitute an innovative therapeutic approach in PAH.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

MCT, staurosporine, endothelin-1, histamine, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), cytosine arabinoside, and nifedipine were obtained from Sigma-Aldrich. MCV1 (Calbiochem) and U46619 were obtained from R&D Systems. Fura-2-AM was obtained from Thermo-Fisher Scientific. KB-R7943 and Pyr3 were obtained from TOCRIS. LW6 was obtained from ClniSciences.

### Human Lung Specimens

Human lung specimens were obtained from lung transplantation in 12 patients with PAH and from lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer from 10 patients as control subjects. Female patients with PAH represent 70% of primary cells. PAs (diameter: 3–5 mm) were isolated from nontumoral areas in the lung specimens of control subjects. Transthoracic echocardiography was performed preoperatively in control subjects to rule out PH. Patients with PAH underwent genetic counseling and were provided written informed consent for genetic analysis. The demographic

information of PAH and control patients are presented in Supplemental Table S1.

Patients were part of the French Network on Pulmonary Hypertension, a program approved by our institutional ethics committee, and provided written informed consent (Protocol N8CO-08-003, ID RCB: 2008-A00485-50, approved on June 18, 2008). Patients studied were part of a program approved by our institutional ethics committee and had given written informed consent (ID RCB: 2018-A01252-53, approved on June 18, 2006). All human tissues were obtained with written informed consent from transplant recipients or families of organ donors following the Declaration of Helsinki.

### Human PASMCM Culture from PAH and Control Patients

The hPASMCMs were isolated from pulmonary arteries (diameter: 3–5 mm) obtained during the lung transplantation for PAH patients and lobectomy or pneumonectomy of localized lung cancer from control subjects. Pulmonary arteries were excised at a distance from tumor areas.

PAs (diameter: 3–5 mm) were kept in DMEM at 4°C before their intimal cell layer, and residual adventitial tissues were stripped using fusing forceps. The dissected media of the vessels was then cut into small pieces (3–5 mm), which were transferred into 6-well plates (1 piece per well). The explants were incubated in DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 10 U/mL epidermal growth factor and insulin). After 2 wk of incubation, the hPASMCMs were collected in the culture medium and the vessel tissues were transferred into new cell-culture flasks. Cultured hPASMCMs were used between passages 3 and 5 (11, 12).

Characterization of cultured control and PAH-hPASMCMs was assessed by positive staining with antibodies against smooth muscle cell  $\alpha$ -actin, desmin, and vinculin (13).

### Animal Models

The facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (Agreement No. C92-019-01). This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments (CEEA26 CAP Sud). Animal experiments were performed following the guidelines of Directive 2010/63/EU on September 22, 2010 of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and complied with the French institution's animal care and handling guidelines.

*In vivo* experiments were performed according to clinical trial standards. Rats were randomly distributed between groups, and all methods and analyses were performed with researchers blinded to the conditions. All rats received a number known only by the experimenter who delivered the treatment. Before euthanasia (*day 21*), all rats underwent an evaluation by closed-chest right heart catheterization. This experiment was performed by a blinded experimenter who did not know the correspondence between rat number and treatment. Hemodynamic parameters were analyzed in a blinded fashion.

PH was induced by a single MCT injection (60 mg/kg, *sc*) in male Wistar rats (4-wk old). MCT was dissolved in 1 N HCl and neutralized with 1 N NaOH. Control animals received the same volume of saline solution. Pyr3 was dissolved in DMSO. MCT-exposed Wistar rats were treated with Pyr3 (1

mg/kg/day in DMSO, daily ip injection) from week 2 (W2) to week 3 (W3). Control animals received the same volume of DMSO.

### Hemodynamic Measurements and Tissue Collection

Rats were placed under general anesthesia and spontaneous breathing with an isoflurane Rodent Anesthesia System (Minerve Esternay, France) (maintenance: isoflurane 2% in room air). Hemodynamics parameters, such as heart rate (HR), right ventricular (RV) systolic pressure (RVSP; mmHg), and cardiac output (CO; mL/min), were blindly measured in unventilated anesthetized rats using a closed-chest technique. Under profound anesthesia (5% isoflurane), animals were euthanized. After catheterization, tissues were collected, and Fulton's index was calculated as the ratio of RV weight to left ventricular (LV) plus septal (S) weight ( $RV \div LV + S$ ).

### siRNA Transfection

PASMCs were transfected in suspension by incubating  $4 \times 10^5$  cells in a solution containing 500  $\mu$ L of Opti-MEM (Gibco, Ref No. 31985-062), 3  $\mu$ L of Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Ref No. 13778-150), and 100 nM of a specific Silencer Select siRNA against TRPC1 (siTRPC1, #s14411, Thermo Fisher Scientific), TRPC3 (siTRPC3, #s14413, Thermo Fisher Scientific), TRPC4 (siTRPC4, #s229618, Thermo Fisher Scientific), or TRPC6 (siTRPC6, #s14421, Thermo Fisher Scientific) as well as a Silencer Select negative control (siControl) according to the manufacturer's protocol. All experiments were performed 72 h after PAH-hPASMCs transfection.

### Isometric Tension Measurement

Rat intralobar main PAs were mounted on an emkaBATH4 modular tissue bath system (EMKA Technology, Paris, France) coupled with IOX software (EMKA Technologies). As determined in preliminary experiments, rat PAs were set at an optimal length by equilibration against a passive load of 0.3 g. After adding Krebs solution, vessels were contracted with 100 mmol/L  $K^+$ -containing solutions (K100). Once a plateau was reached, the vessels were washed with Krebs solution for 30 min. DMSO or Pyr3 (1  $\mu$ mol/L) was pre-incubated before the dose-response to U46619 (0.1 nM to 3  $\mu$ M). The relaxation responses were expressed as the percentage of the precontractile response obtained with U46619.

### Reverse Transcription-Quantitative PCR

Total gene expression was quantified using qPCR following the standard protocol for ready-to-use qPCR SignArrays (AnyGenes) on a StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies) (14). Predesigned probe sets used in the experiments were Human TRPC1 NM\_001251845.1; Human TRPC3 NM\_001130698.2; Human TRPC4 NM\_016179.4; Human TRPC6 NM\_004621.6; Human Orail NM\_001277961.3; and Human STIM1; Human  $\beta$ -Actin NM\_001101.

### Pulmonary Vessel Remodeling Analysis

The lungs were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and serially sectioned (5  $\mu$ m). A pulmonary pathologist performed the histopathological evaluation of the lungs, blinded to treatment group assignments. The

morphometric analyses were performed on sections stained with hematein-eosin-Safran (HES). The lung samples from all rat groups were analyzed by conventional light microscopy using quantitative semiautomated software (NIS-BR; Nikon, Champigny sur Marne, France). Vascular remodeling was assessed in all the pulmonary vessels of size 50–100  $\mu$ m identified in 20 randomly selected microscopic fields per tissue section. The wall thickness was calculated using the following equation:  $(\text{external diameter} - \text{internal diameter}) / (\text{external diameter}) \times 100$ .

### Cardiac Histological Assessment

Hearts were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded, and serially sectioned (5  $\mu$ m). To assess heart fibrosis, heart sections were stained with Sirius red (0.1%). Pictures were recorded at 10 $\times$  on an EVOS microscope (Invitrogen). RV fibrosis was quantified using ImageJ software.

The level of cardiomyocyte hypertrophy was assessed by analyzing RV sections stained with FITC-conjugated wheat germ agglutinin (WGA) (50  $\mu$ g/mL) and then observed on an EVOS microscope (Invitrogen). Pictures were recorded at 40 $\times$ , and the diameters of RV cardiomyocytes were determined using ImageJ software (15).

### Intracellular $Ca^{2+}$ Measurements

The hPASMCs were plated on 18-mm glass coverslips and loaded with 2  $\mu$ mol/L Fura-2-AM dissolved in DMSO plus 20% pluronic acid (Life Technologies) and then incubated at room temperature for 30 min in darkness in Krebs solution (in mmol/L: 135 NaCl, 5.9 KCl, 2  $CaCl_2$ , 1  $MgCl_2$ , 10 HEPES, 10 D-glucose) at pH 7.4. Loaded cells were washed twice with the physiological solution before imaging.  $Ca^{2+}$  images were obtained using a microscope (Olympus IX71) equipped with a Sutter Fluo Lambda 421 LED system (Sutter Instrument Company, Novato, CA), which rapidly changed the excitation wavelengths between 340 nm and 380 nm. Emission was measured at 510 nm.

The  $Ca^{2+}$ -free solution contained 1 mmol/L EGTA instead of 2 mmol/L  $CaCl_2$  + nifedipine (L-type  $Ca^{2+}$  channel inhibitor) + KB-R7943 ( $Na^+$ / $Ca^{2+}$  exchanger inhibitor).  $Ca^{2+}$  imaging measurements were performed at room temperature. Due to the high transfection efficiency (90% of transfected cells), cytosolic  $Ca^{2+}$  measurements were performed on the whole cell population. Image acquisition in selected cells and analysis was performed with MetaFluor 7.8 imaging software (Molecular Devices).

### Immunoblot Analysis

Total protein from lungs or isolated PA or cell samples from rats or humans was prepared in lysis buffer containing 1% Igepal, 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM  $Na_3VO_4$ , leupeptin 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, pepstatin 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, aprotinin 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, and protease inhibitor cocktail [aprotinin, leupeptin, and Pefabloc (Roche, Meylan, France)]. Protein lysates (40  $\mu$ g) were separated on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (16). After blocking, membranes were incubated in Tris-buffered saline with Tween and 5% nonfat milk overnight at 4°C with primary antibodies at adequate concentrations (Supplemental Table S2).

Blots were then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse diluted 1:10,000 (Cell Signaling) or HRP-conjugated goat anti-rabbit diluted 1:5,000 (Cell Signaling). Antibodies were revealed using enhanced chemiluminescence reagents (Perkin Elmer). ImageJ Software was used to quantify the level of protein expression. The list of antibodies used is presented in Supplemental Table S2.  $\beta$ -Actin was used as a loading control.

### Immunofluorescence Staining

Paraffin-embedded lung sections (5  $\mu$ m) were dewaxed in toluene, and antigens were retrieved in Power Universal Antigen Retrieval buffer pH 9.5 (Leica ref PV6125 BR02-1000) for 20 min at 95°C. Slices were saturated with human (10%) and donkey (10%) sera in phosphate-buffered saline for 1 h at room temperature.

Free aldehyde groups from paraformaldehyde fixation were quenched for 10 min with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution. Sections were saturated with human (10%) and goat (10%) sera in PBS for 1 h at room temperature. Primary and secondary antibodies were used, as reported in Supplemental Table S3. Primary antibodies were detected with secondary antibodies from goat anti-rabbit (1/200). Slides were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (17). Mouse IgG and rabbit preimmune serum (both species of primary antibodies used in this study) were applied to lung sections, followed by anti-rabbit Alexa Fluor 594. Sections were viewed under an LSM 700 microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with 405-, 488-, 555-, and 639-nm lasers (Carl Zeiss). Images were recorded and analyzed with ZEN software (Carl Zeiss).

### Wound Healing Assay

We used the wound healing assay to evaluate cell migration. After 48 h of starvation (medium without growth factors: FBS, EGF, and insulin), human PSMCs were plated in a culture insert (Cat. No. 90209; Ibidi) at a density of  $1.2 \times 10^4$  cells per well in a fresh medium with cytosine arabinoside (10  $\mu$ mol/L). After allowing cells to attach for 24 h, we removed the culture insert and washed the cells with phosphate-buffered saline to remove nonadherent cells. Cells were treated with control siRNA or siRNA against TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 24 h before starvation (72 h before removal of culture inserts). Cell migration into the wound space was quantified using ImageJ. Cell motility/invasion was assessed by the percentage of wound closure 15 h after initiation of wound healing ( $[(\text{area T0} - \text{area T15}) \div \text{area T15}] \times 100$ ).

### Calcineurin Activity

The activity of calcineurin was assessed using the Ser/Thr phosphatase assay system (Cat. No. V2460, Promega). The experiments were performed according to the manufacturer's recommendations. The optical density values obtained with the molybdate-malachite green-phosphate complex were read at 600 nm with a FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices).

### PASMCs Induced-Apoptosis Measurement

In hPASMCs, apoptosis was induced with 1  $\mu$ mol/L staurosporine for 20 min or 50 nmol/L staurosporine overnight.

Cells were washed with cell-staining buffer (Cat. No. 420201, BioLegend) and gently detached with trypsin and a cell scraper. After centrifugation (400g, 4°C, 10 min), the supernatant was removed, and cells were stained with the FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit (Cat. No. 640914, BioLegend) according to the manufacturer's recommendations. Cells were acquired by flow cytometry (MACSQuant, Miltenyi Biotec), with 75,000 cells counted in each sample and analyzed using FlowLogic software (Inivai Technologies).

### PASMCs Proliferation Measurement

To evaluate cell proliferation, we quantified 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation in cells undergoing DNA replication using the DELFIA cell proliferation kit (AD0200, PerkinElmer), according to the manufacturer's recommendations. hPASMCs were treated with siControl or siTRPC1, or siTRPC3, or siTRPC4, or siTRPC6. Forty-eight hours after cell synchronization (0% SVF), cell proliferation was induced for 24 h by a medium containing 10% of serum + 1  $\mu$ mol/L of BrdU (18). The fluorescence signal in the 96-well plate was read with a FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices).

### Statistical Analyses

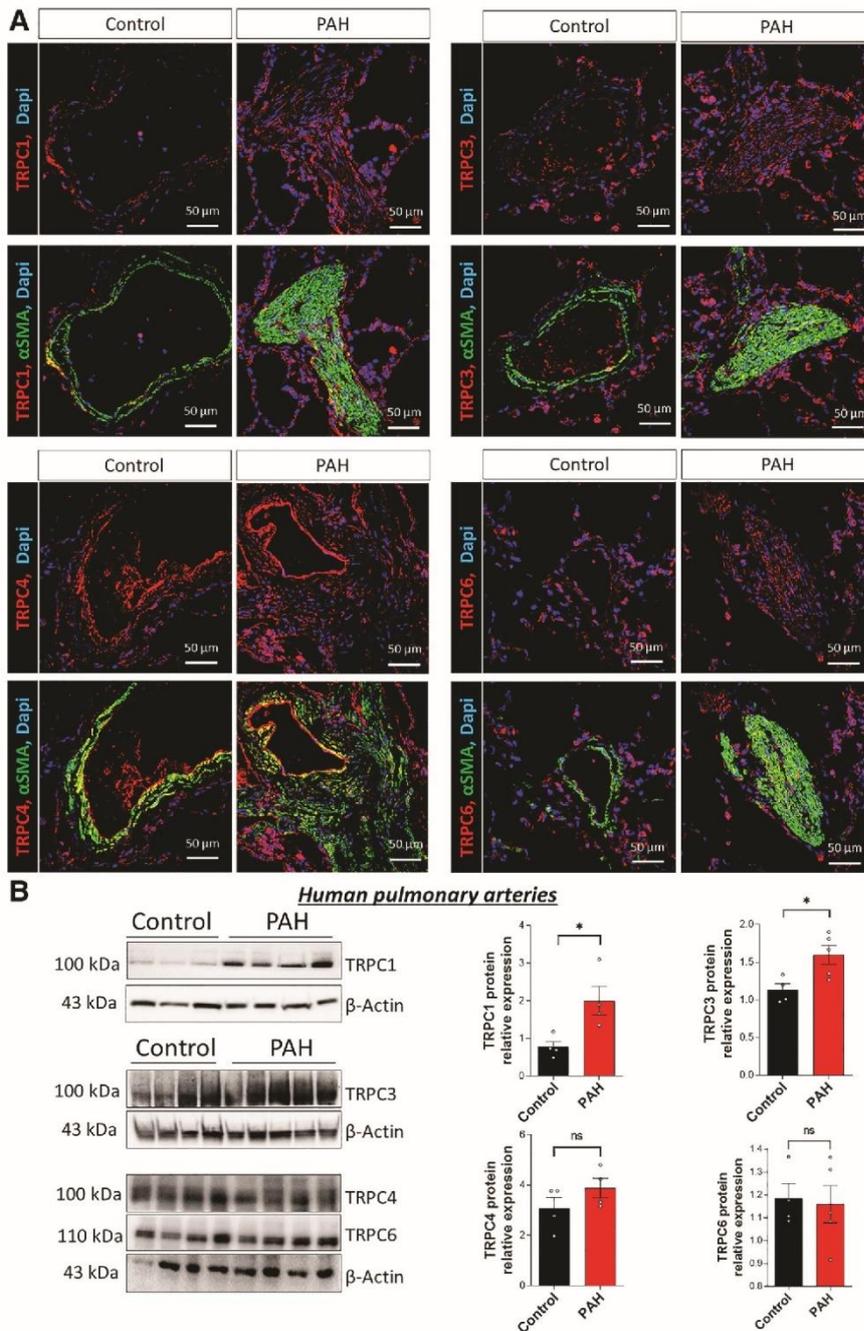
Analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad, version 9.0 for Windows) and R statistical computing software. After checking the distribution of our samples with the Shapiro-Wilk Test, differences between the two or more groups were assessed using an unpaired *t* test or one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc analysis for multiple comparisons. When conditions of parametric tests were not met, we used either a Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post hoc analysis for multiple comparisons. All values are reported as means  $\pm$  SE. Representative images/figures were chosen to represent the mean of each quantification. For all experiments, a *P*-value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Increased TRPC1 and TRPC3 Protein Expression in Pulmonary Arteries Isolated from PAH Patients

We performed immunofluorescent staining in lung sections from control and PAH patients to visualize the localization and expression of TRPC1, TRPC3, TRPC4, and TRPC6 channels. Figure 1A shows that TRPC1, TRPC3, TRPC4, and TRPC6 are expressed in PASMCs and pulmonary artery endothelial cells (PAECs). As highlighted by the increased staining intensity, TRPC1, TRPC3, and TRPC6 appear overexpressed in PASMCs from remodeled PA in patients with PAH. In contrast, TRPC4 staining intensity suggested increased TRPC4 expression in PAECs from patients with PAH and not in PASMCs. As immunostaining is not quantitative, we performed immunoblot analyses on isolated human PA from control and PAH patients. Immunoblot showed a higher expression of TRPC1 and TRPC3 in isolated PAH-PA compared with the control condition, whereas TRPC4 and TRPC6 protein expressions were unchanged (Fig. 1B). Since TRPC5 and TRPC7 mRNA were not detected in

TRPC CHANNELS IN PAH



**Figure 1.** Increased expression of TRPC1 and TRPC3 in pulmonary arteries (PA) isolated from patients with pulmonary arterial hypertension (PAH). **A:** expression and localization of TRPC1, TRPC3, TRPC4, and TRPC6 by immunofluorescence staining on paraffin-embedded lung sections from control and PAH patients [DAPI staining (blue), TRPC staining (red), and alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) staining (green)]. Bar graph = 50. **B:** immunoblot and quantification of TRPC1 ( $n = 4$  patients), TRPC3 ( $n = 5$  patients), TRPC4 ( $n = 4$  patients), or TRPC6 ( $n = 5$  patients) in pulmonary arteries from control and PAH patients. Experiments presented in **B** were analyzed using the Mann–Whitney test. \* $P < 0.05$ . ns, nonsignificant; TRPC, transient receptor potential canonical.

human pulmonary arteries (3), we did not investigate their role in PAH pathogenesis.

**TRPC1, TRPC3, TRPC4, and TRPC6 Contribute to Exacerbated SOCE in PAH-hPASCs**

In PAH-hPASCs, we found an increase in TRPC3 and TRPC6 protein expressions and decreased expression of TRPC4. TRPC1 protein expression was unchanged in PAH-hPASCs (Fig. 2A).

Seventy-two hours after cell transfection, each siRNAs used reduced the counterpart mRNA (Fig. 2B) and protein (Fig. 2C) without effect on other TRPC or Orail or STIM1 expression (Supplemental Fig. S1).

Then, we elicited the contribution of each TRPC on SOCE. SOCE was stimulated by depleting  $Ca^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum by applying 1  $\mu$ mol/L thapsigargin (SERCA pump inhibitor) for 10 min in  $Ca^{2+}$ -free medium and then by adding 2 mmol/L extracellular  $Ca^{2+}$  reached medium. We confirmed

TRPC CHANNELS IN PAH

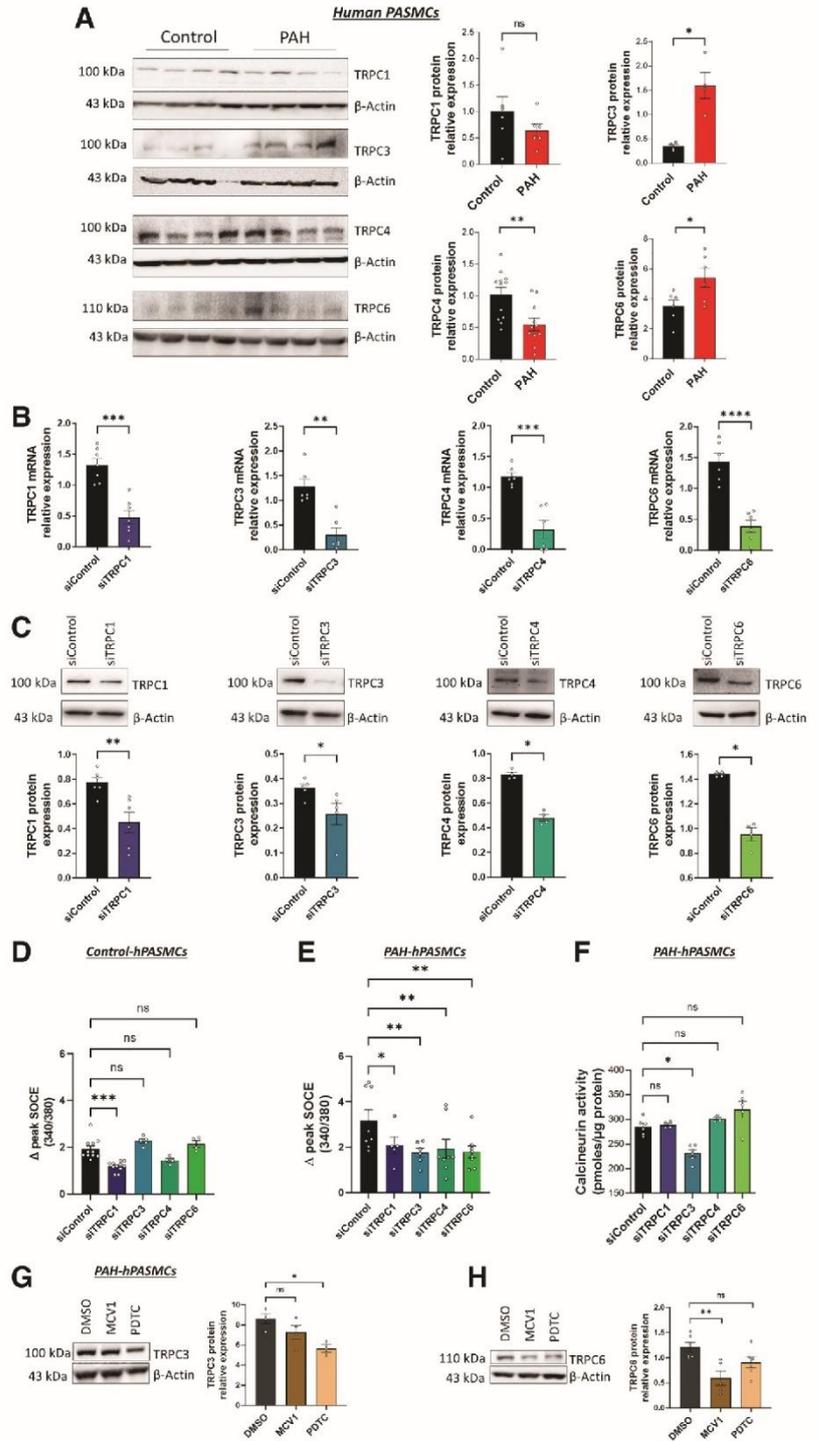
the twofold SOCE increase in PAH-hPASCs compared with control-hPASCs (Fig. 2, D–E), as recently described (4).

In control-PASCs, only siTRPC1 decreased the SOCE (by 40%) (Fig. 2D). However, in PAH-hPASCs, the knockdown of each TRPC isoform, TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6,

reduced SOCE amplitude by 50%, 50%, 60%, and 30%, respectively (Fig. 2E).

TRPC channels are known to be involved in receptor-operated  $Ca^{2+}$  entry. We performed experiments to measure the contribution of each TRPC isoform on  $Ca^{2+}$  signaling

**Figure 2.** TRPC channels are associated with exacerbated store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE) in pulmonary arterial hypertension (PAH)-human pulmonary arterial smooth muscle cells (hPASCs). **A:** immunoblot and quantification of TRPC1 ( $n = 6$  patients), TRPC3 ( $n = 4$  patients), TRPC4 ( $n = 11$  patients), or TRPC6 ( $n = 6$  patients) in PAH-hPASCs. **B:** PAH-hPASCs were transfected with siRNA against TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6, and knockdown efficiency was assessed by RT-qPCR ( $n = 6$  for each condition). **C:** consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown on their counterpart protein expression ( $n = 4–6$  for each condition). **D:** consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown on SOCE amplitude in control-hPASCs ( $n = 9$  patients with 173 cells for siControl,  $n = 9$  patients with 134 cells for siTRPC1,  $n = 4$  patients with 85 cells for siTRPC3,  $n = 6$  patients with 137 cells for siTRPC4, and  $n = 4$  patients with 69 cells for siTRPC6). **E:** consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown on SOCE amplitude in PAH-hPASCs ( $n = 8$  patients with 196 cells for siControl,  $n = 4$  patients with 72 cells for siTRPC1,  $n = 4$  patients with 79 cells for siTRPC3,  $n = 6$  patients with 96 cells for siTRPC4, and  $n = 8$  patients with 153 cells for siTRPC6). **F:** consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown on calcineurin activity in PAH-hPASCs ( $n = 6$  patients for siControl,  $n = 4$  for siTRPC1 and TRPC4, and  $n = 5$  for siTRPC3 and TRPC6). **G:** Immunoblot and quantification of TRPC3 in PAH-PASCs treated 48 h with NFAT inhibitor (MCV1, 1  $\mu$ mol/L) and NF- $\kappa$ B inhibitor (PDTC, 1  $\mu$ mol/L) ( $n = 4$  for DMSO and MCV1 and  $n = 3$  for PDTC). **H:** immunoblot and quantification of TRPC6 in PAH-PASCs treated 48 h with NFAT inhibitor (MCV1 1  $\mu$ mol/L) and NF- $\kappa$ B inhibitor (PDTC, 1  $\mu$ mol/L) ( $n = 6$  for DMSO and PDTC and  $n = 5$  for MCV1). Experiments presented in A–C were analyzed using an unpaired  $t$  test or Mann–Whitney test, and experiments presented in D–H were analyzed using the Kruskal–Wallis test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . ns, nonsignificant; TRPC, transient receptor potential canonical.



mediated by G protein-coupled receptor (GPCR) activation induced by endothelin 1 (50 nmol/L) or histamine (10  $\mu$ mol/L) stimulations (Supplemental Fig. S2).  $Ca^{2+}$  signaling induced by both stimulations was unchanged in control and PAH-hPASCs (Supplemental Fig. S2, A–C). Only the knockdown of TRPC1 reduced endothelin 1-mediated  $Ca^{2+}$  signaling (Supplemental Fig. S2, B–D), whereas none of siTRPC affected histamine-induced  $Ca^{2+}$  signaling in PAH-PASCs.

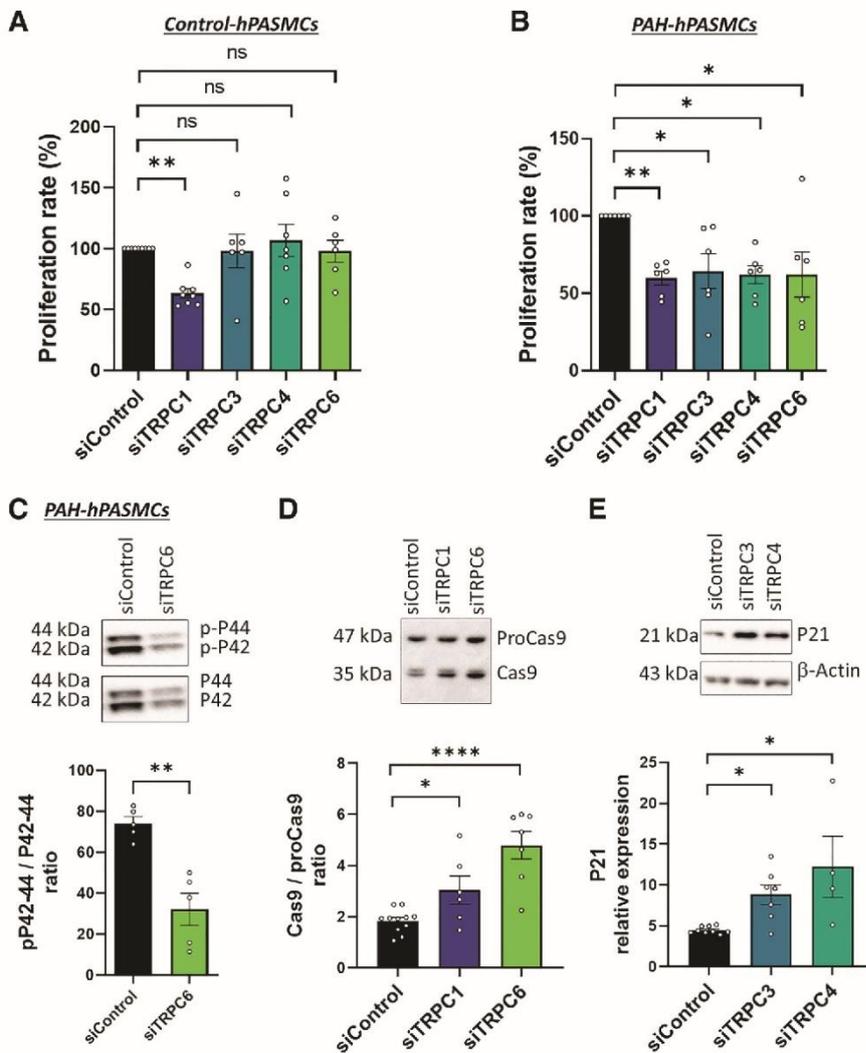
SOCE plays a crucial role in regulating calcineurin/nuclear factor of activated T-cells (NFAT) activity, and we and others demonstrated exacerbated calcineurin activity in PAH-PASCs (4). We, therefore, measured the consequence of TRPC knockdown on calcineurin activity. We found that only TRPC3 knockdown reduced calcineurin activity in PAH-hPASCs, indicating that increased TRPC3 expression/function contributes to calcineurin overactivity in PAH-PASCs (Fig. 2F).

To understand the increase of TRPC3 and TRPC6 in PAH-PASCs, we evaluated the contribution of two major transcription factors involved in PAH pathogenesis, NFAT and NF- $\kappa$ B, using selective pharmacological inhibitors. TRPC3

protein expression was unchanged in PAH-PASCs treated with NFAT inhibitor (MCV1), whereas the treatment with NF- $\kappa$ B inhibitor (PDTC) reduced TRPC3 expression in PAH-hPASCs (Fig. 2G). The opposite effect was observed for TRPC6. Indeed, TRPC6 expression was decreased with MCV1 treatment but unchanged with PDTC treatment (Fig. 2H). NFAT or NF- $\kappa$ B inhibition did not affect TRPC1 protein expression, whereas NF- $\kappa$ B inhibition reduced TRPC4 protein expression (Supplemental Fig. S3, A and B). The selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) (LW6) did not change TRPC3 and TRPC6 expression in PAH-hPASCs (Supplemental Fig. S3C).

### TRPC Channels Contribute to the Exacerbated Proliferative Phenotype of PAH-hPASCs

We studied the contribution of each TRPC in control and PAH-hPASCs proliferation, migratory capacity, and apoptosis resistance. In control-hPASCs, only TRPC1 knockdown decreased the proliferation (Fig. 3A). Interestingly and in association with the contribution of all TRPC to SOCE of



**Figure 3.** TRPC channels are associated with increased proliferation of pulmonary arterial hypertension (PAH)-human pulmonary arterial smooth muscle cells (PAH-hPASCs). **A:** consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown on the proliferation rate (BrdU assay) of control-hPASCs ( $n = 9$  patient for siControl,  $n = 8$  for siTRPC1,  $n = 6$  for siTRPC3 and siTRPC6, and  $n = 7$  for siTRPC4). **B:** Consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown on the proliferation rate (BrdU assay) of PAH-hPASCs ( $n = 7$  patient for siControl and  $n = 6$  for siTRPC1, siTRPC3, siTRPC4, and siTRPC6). **C:** immunoblot and quantification of the consequence of TRPC6 knockdown on the pP42-44/P42-44 ratio ( $n = 5$  patients). **D:** immunoblot and quantification of the consequence of TRPC1 or TRPC6 knockdown on the Caspase9/proCaspase9 ratio ( $n = 11$  patients for siControl,  $n = 6$  for siTRPC1, and  $n = 7$  for siTRPC6). **E:** immunoblot and quantification of the consequence of TRPC3 or TRPC4 knockdown on P21 expression in PAH-PASCs ( $n = 9$  patients for siControl,  $n = 7$  for siTRPC3, and  $n = 4$  for siTRPC4). Experiments presented in A, B, D, and E were analyzed with Kruskal–Wallis test, and C were analyzed using the Mann–Whitney test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . Cas9/proCas9, Caspase9/proCaspase9; ns, nonsignificant; TRPC, transient receptor potential canonical.

PAH-hPASCs, the proliferative capacity of these cells was decreased by ~40% in siTRPC1-, siTRPC3-, siTRPC4-, or siTRPC6-treated PAH-hPASCs (Fig. 3B). In correlation with the impact of each TRPC isoform in the regulation of PAH-hPASCs proliferation, we found that siTRPC6 reduced the activation of P42/44 assessed by the level of P42/44 phosphorylation (Fig. 3C). These results could partly explain the over-activation in P42/44 already described in PAH-PASCs (11). No changes in the expression and activation of P42/44 were found in PAH-hPASCs treated with siTRPC1, siTRPC3, or siTRPC4 (Supplemental Fig. S4A). We also found increased cell cycle inhibitor P21<sup>CIP1/Waf</sup> (P21) protein expression in PAH-hPASCs treated with siTRPC3 or siTRPC4 (Fig. 3E). This cell cycle inhibitor is repressed in PAH-PASCs (11). These results suggest that TRPC3 and TRPC4 contribute to the PAH-hPASCs excessive proliferative phenotype by regulating P21. In addition, in siTRPC1- or siTRPC6-treated PAH-hPASCs, we found an increase in the Cas9/proCaspase9 ratio, without any significant changes in siTRPC3- or siTRPC4-treated cells (Fig. 3E and Supplemental Fig. S4B), suggesting that TRPC1

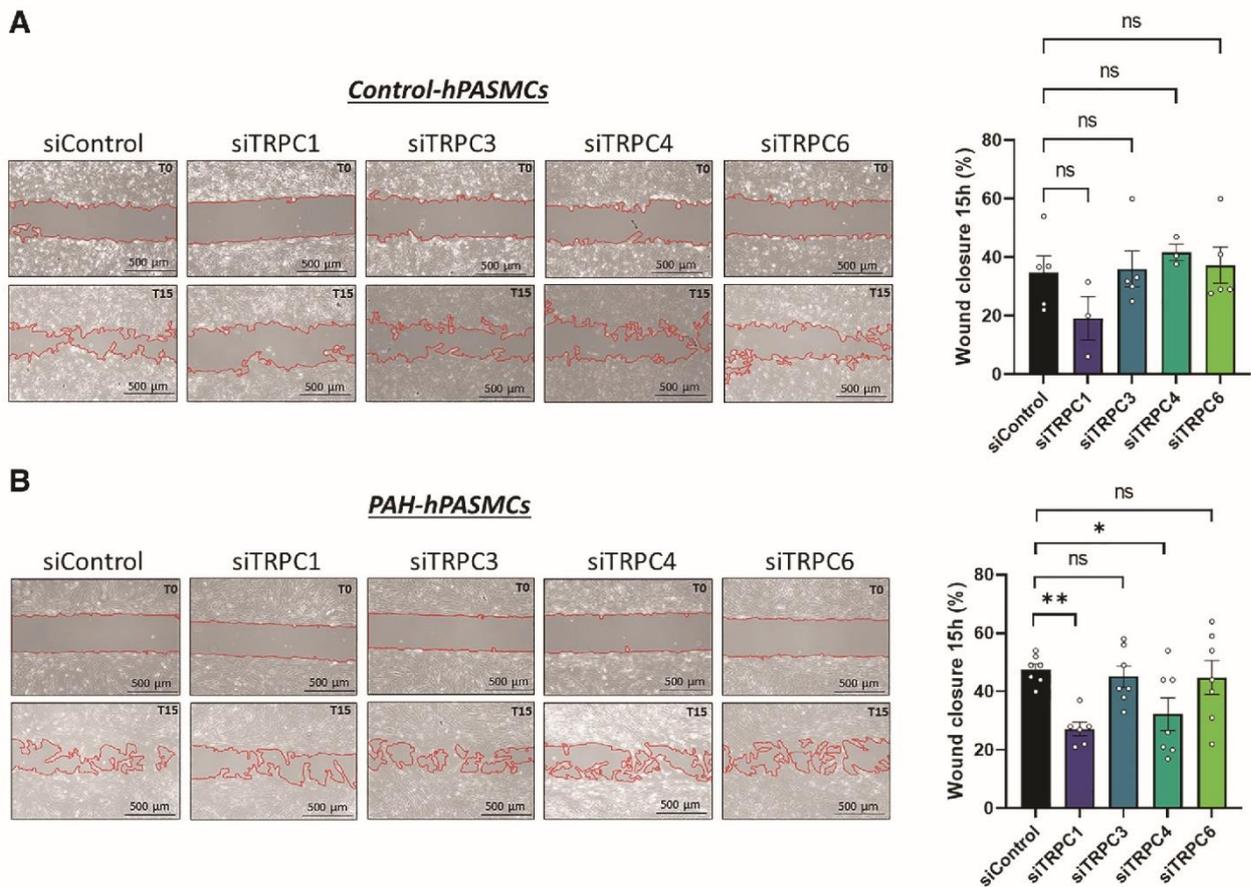
and TRPC6 contribute partly to the apoptosis resistance phenotype of PAH-hPASCs.

### TRPC1 and TRPC4 Channels Contribute to the Aberrant Migratory Capacity of PAH-hPASCs

As increased PASC migration is a feature of PAH pathogenesis (4), we analyzed the contribution of TRPC isoform on the migratory capacity of control-PASCs and PAH-PASCs. In control-PASCs, only the knockdown of TRPC1 caused a decrease in cell migration. In contrast, the knockdown of TRPC1 or TRPC4 decreased the migratory capacity of PAH-PASCs (Fig. 4, A and B), indicating that both channels are involved in enhanced PAH-hPASCs migration.

### Reduction of TRPC Expression Worsens Staurosporine-Induced Apoptosis in PAH-hPASCs

To evaluate the contribution of TRPC channels in the resistance to apoptosis of PAH-PASCs, we exposed cells to 50 nmol/L staurosporine (an apoptosis inducer) overnight to



**Figure 4.** TRPC1 and TRPC3 channels contribute to the exacerbated migration of pulmonary arterial hypertension (PAH)-human pulmonary arterial smooth muscle cells (PAH-hPASCs). **A:** wound-closure images (15 h after initiation) and percentage wound closure of the consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown in control-hPASCs ( $n = 5$  patients for siControl, siTRPC3, and siTRPC6 and  $n = 3$  for siTRPC1 and siTRPC4). **B:** wound-closure images (15 h after initiation) and percentage wound closure of the consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown in PAH-hPASCs ( $n = 7$  patients for siControl, siTRPC3, siTRPC4, and siTRPC6 and  $n = 6$  for siTRPC1). Experiments presented in **A** and **B** with Kruskal–Wallis test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . ns, nonsignificant; TRPC, transient receptor potential canonical.

perform Annexin V-Propidium iodide staining and detect cell apoptosis. As illustrated in Figure 5, in PAH-hPASCs, the knockdown of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 increased the number of Annexin V-positive cells and simultaneously decreased the number of live cells (Fig. 5, A–C). Moreover, in PAH-hPASCs transfected with siTRPC1, siTRPC3, siTRPC4, or siTRPC6 and exposed to staurosporine, the Caspase9/proCaspase9 ratio was increased, indicating that their knockdown increases apoptosis via Caspase9 activation (Fig. 5D).

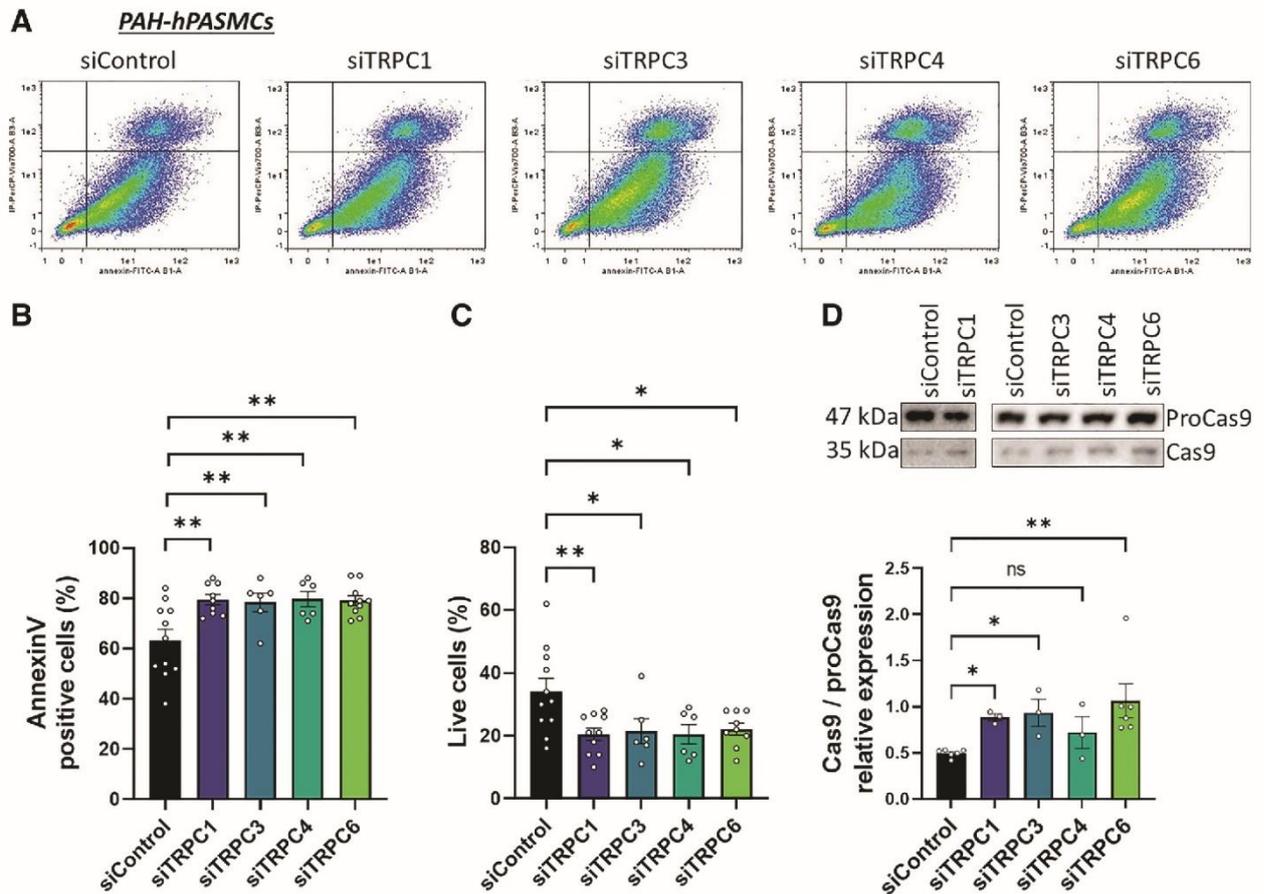
#### Increased TRPC3 Expression/Function in PH Induced by MCT Exposure in Rats

We investigated the expression of each isoform in the lungs from MCT-PH rats (3 wk after PH induction). Contrary to what we observed in human lung tissues, immunoblot analyses of lungs from MCT-PH rats revealed unchanged TRPC1 protein expression and reduced TRPC4, TRPC5, and TRPC6 compared with control animals (Supplemental Fig.

S5). In contrast, TRPC3 expression was increased in lungs from MCT-PH rats (Fig. 6A). Immunofluorescent staining showed that TRPC3 was expressed in PASCs from both control and MCT-PH rats, with a higher fluorescence intensity in pulmonary arteries from MCT-PH rats, similarly to TRPC3 localization observed in human lung tissues (Fig. 6B).

Then, using Pyr3, a selective inhibitor of TRPC3 (19) at 1  $\mu\text{mol/L}$ , we evaluated the involvement of TRPC3 in SOCE of PASCs isolated from MCT-PH rats. As shown in Fig. 6, C and D, TRPC3 pharmacological inhibition reduced SOCE in MCT-PASCs and PAH-hPASCs.

As PA vasoconstriction is a hallmark of human and experimental PAH, we evaluated the role of TRPC3 in regulating pulmonary arterial constriction. TRPC3 inhibition by Pyr3 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) induced a shift to the right of the dose-response curve for thromboxane A2 receptor agonist (U46619 at 0.1–3  $\mu\text{mol/L}$ ), meaning that TRPC3 contributes to PA constriction induced by thromboxane A2 mimetics (Fig. 6, E).

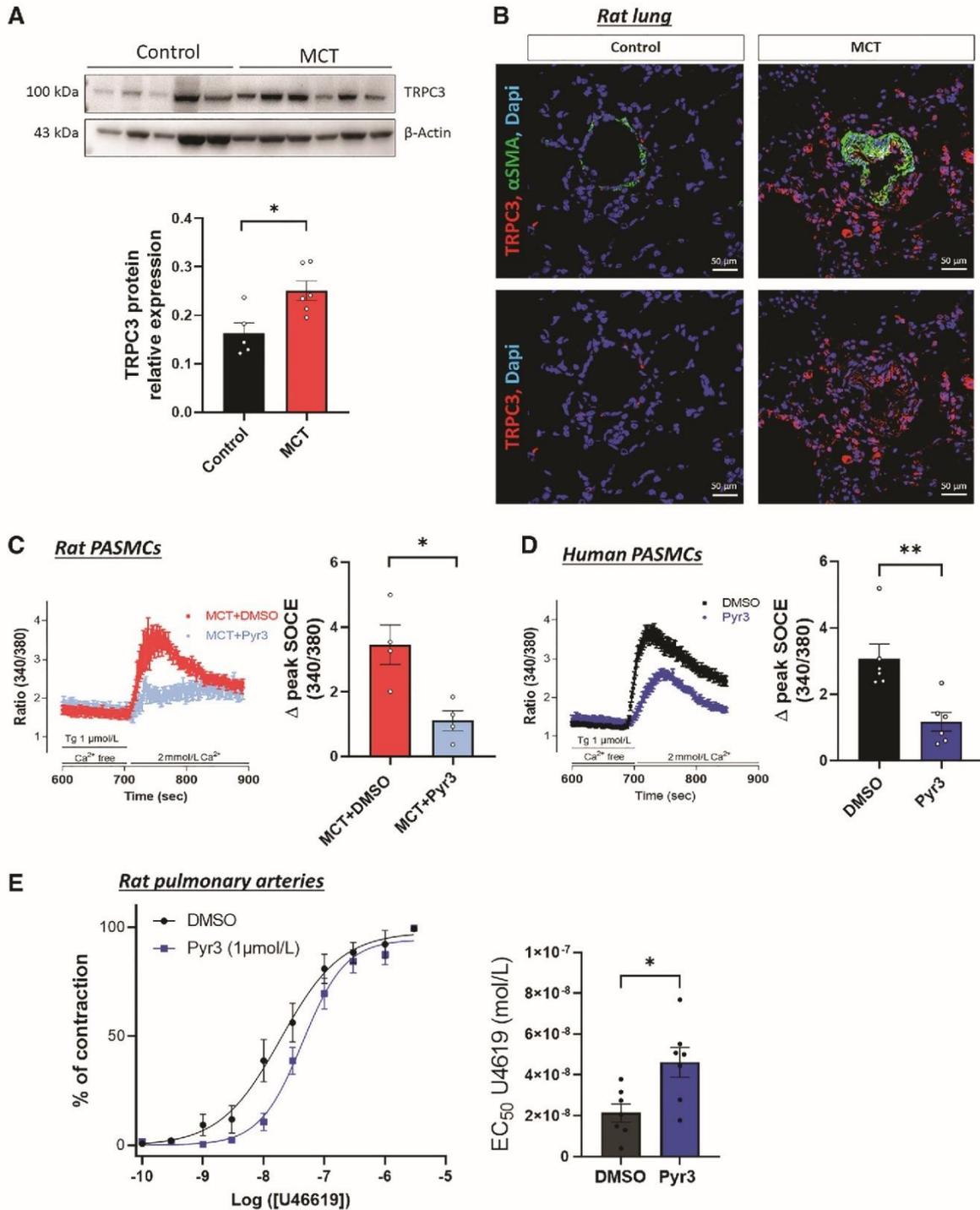


**Figure 5.** Knockdown of TRPC channels enhances apoptosis of pulmonary arterial hypertension (PAH)-human pulmonary arterial smooth muscle cells (PAH-hPASCs) exposed to staurosporine. **A:** dot plots of Annexin V + Propidium iodide dual-labeling in PAH-PASCs transfected with siControl, siTRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 and exposed to 50 nmol/L staurosporine overnight. **B** and **C:** consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown on the percentage of Annexin V-positive and live PAH-hPASCs exposed to 50 nmol/L staurosporine overnight ( $n = 11$  patient for siControl,  $n = 9$  for siTRPC1,  $n = 6$  for siTRPC3 and siTRPC4, and  $n = 10$  for siTRPC6). **D:** immunoblots and quantification of the consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 knockdown on Caspase 9/proCaspase 9 ratio in PAH-PASCs exposed to 50 nmol/L staurosporine overnight ( $n = 6$  patient for siControl and siTRPC6 and  $n = 3$  for siTRPC1, siTRPC3, and siTRPC4). Experiments presented in B–D were analyzed with Kruskal–Wallis test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Cas9/proCas9, Caspase9/proCaspase9; ns, nonsignificant; TRPC, transient receptor potential canonical.

**In Vivo TRPC3 Pharmacological Inhibition Reduces the Development of MCT-Induced PH in Rats**

Since we found that TRPC3 overexpression/function contributes to aberrant PAH-hPASMCs phenotypes and that

only TRPC3 is overexpressed in the lungs of MCT-PH rats, we next measured the consequence of in vivo TRPC3 pharmacological inhibition on the severity of PH induced by MCT exposure (60 mg/kg). We administered Pyr3 or vehicle (DMSO) daily intraperitoneal injection at 1 mg/kg during the



last week of PH induction (Fig. 7A). In comparison with the MCT+DMSO group, the group treated with MCT+Pyr3 showed significant improvement in the RV hypertrophy evaluated by measuring the Fulton index (Fig. 7B), a reduction of the RV systolic pressure (Fig. 7C), an increase of the cardiac output (Fig. 7D), and an improvement in total pulmonary resistance (Fig. 7E). Moreover, in vivo TRPC3 inhibition reduced MCT-exposure-induced pulmonary vessel obstruction (Fig. 7G). At the cardiac level, RV fibrosis (Fig. 7F) and RV cardiomyocyte cross-section area (Fig. 7G) were improved in the group treated with MCT and Pyr3 compared with the group treated with MCT and DMSO. All these results demonstrate the benefit of pharmacological inhibition of TRPC3 in the PH experimental model induced by MCT exposure.

## DISCUSSION

In the present study, we provide the evidence of the contribution of TRPC channel isoforms to the development of PAH-hPASCs pathological phenotype. First, we found that PAH-hPASCs overexpressed TRPC3 and TRPC6. Second, the use of specific siRNA demonstrated that TRPC1, TRPC3, TRPC4, or TRPC6 contribute to aberrant SOCE, exacerbated proliferation, and apoptosis resistance of PAH-hPASCs. In contrast, TRPC1 and TRPC4 increased the migratory capacity of PAH-hPASCs. Third, we found that only TRPC3 contributes to calcineurin/NFAT activity exacerbation in PAH-hPASCs. Fourth, we showed that TRPC3 protein/function is pathologically increased in lungs from MCT-induced PH rats. Finally, in vivo “curative” administration of the TRPC3 inhibitor attenuated PH development in the MCT-PH model.

We confirmed that hPASCs expressed TRPC1, TRPC3, TRPC4, and TRPC6 isoforms, as previously described (3), whereas TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, and TRPC6 were expressed in rodent PASCs (3, 20). TRPC1 was overexpressed in control-hPASCs undergoing proliferation in association with increased SOCE, meaning that TRPC1 contributes to SOCE in control-hPASCs (3). In rat or human control-PASCs, hypoxia exposure increased the expression of TRPC1 or TRPC6 in association with increased SOCE (21, 22). In rats exposed to chronic intermittent hypoxia, lung TRPC1, TRPC4, and TRPC6 protein expression was increased compared with rats under normoxia (23, 24). In CH-induced PH rats, the expression of TRPC1 and TRPC6 were increased in isolated PA, associated with increased SOCE (25). Altogether these data suggest that hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) could regulate TRPC expression. However, we found that HIF-1 $\alpha$  pharmacological inhibition had no impact on the expression of TRPC3 and TRPC6 in PAH-hPASCs, indicating that increased HIF-1 $\alpha$  activity in PAH (26) is not

responsible for TRPC channel remodeling in PAH-hPASCs. In idiopathic PAH-hPASCs, the knockdown of TRPC6 reduced the hyperproliferative phenotype (27). Here, we found an increased expression of TRPC1, TRPC3, and TRPC6 contributing equally to increased SOCE in PAH-hPASCs.

In PAH-hPASCs, we found that NF- $\kappa$ B and NFAT signaling partly control the increased TRPC3 and TRPC6 protein expressions, respectively. In contrast to neonatal rat ventricular myocytes, where it has been demonstrated that TRPC3 expression is regulated through a calcineurin/NFAT mechanism (and not by NF- $\kappa$ B) and that TRPC3 function contributes to calcineurin activity (28), we found in PAH-hPASCs that calcineurin/NFAT did not control TRPC3 expression. However, the TRPC3 function partly controlled calcineurin overactivity in PAH-hPASCs. Unlike TRPC3, we highlighted that TRPC6 overexpression in PAH-hPASCs is regulated by calcineurin/NFAT and not by NF- $\kappa$ B, as previously described in rodent cardiomyocytes (29). However, in PAH-hPASCs, the TRPC6 function did not influence the calcineurin function. In cardiomyocytes, we found that aldosterone exposure mediates TRPC upregulation (30, 31). As aldosterone contributes to PAH pathogenesis in humans (32) and experimental PH (33), we propose that aldosterone overproduction could enhance TRPC channels expression in PAH.

An additional mechanism can explain the overexpression/overactivity of TRPC6 in PAH. We recently observed a reduced expression of the chloride and bicarbonate transporter CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) in PAH-hPASCs (17), which is known to be functionally and physically coupled to TRPC6 (34, 35). In human airway epithelial cells, the loss of CFTR enhances TRPC6 expression and function (34), observed in mice pulmonary vasculature contributing to hypoxic vasoconstriction (35), suggesting overexpression/overactivity of TRPC6 in PAH could be related to CFTR loss in PAH-hPASCs.

To be fully functional, TRPC channels can form homo-tetrameric channels or hetero-tetrameric channels like TRPC1/3, TRPC1/4, TRPC1/5, TRPC3/4, TRPC4/5, and TRPC1/4/5 (3). The inhibition of TRPC channels by pharmacological or knockdown approaches indicates that TRPC1, TRPC4, and TRPC5 participate in SOCE in several cell types (36). However, TRPC channels activation mainly occurs following the activation of Gq-coupled receptor and tyrosine kinases receptor, coupled to phospholipase C (PLC) via inositol triphosphate IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum or through DAG (diacylglycerol) synthesis. Ca<sup>2+</sup> could also indirectly regulate TRPC channel function by activating calmodulin and other Ca<sup>2+</sup>-binding proteins or phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>). Protein kinase C (PKC) can activate TRPC3 in human endothelial cells

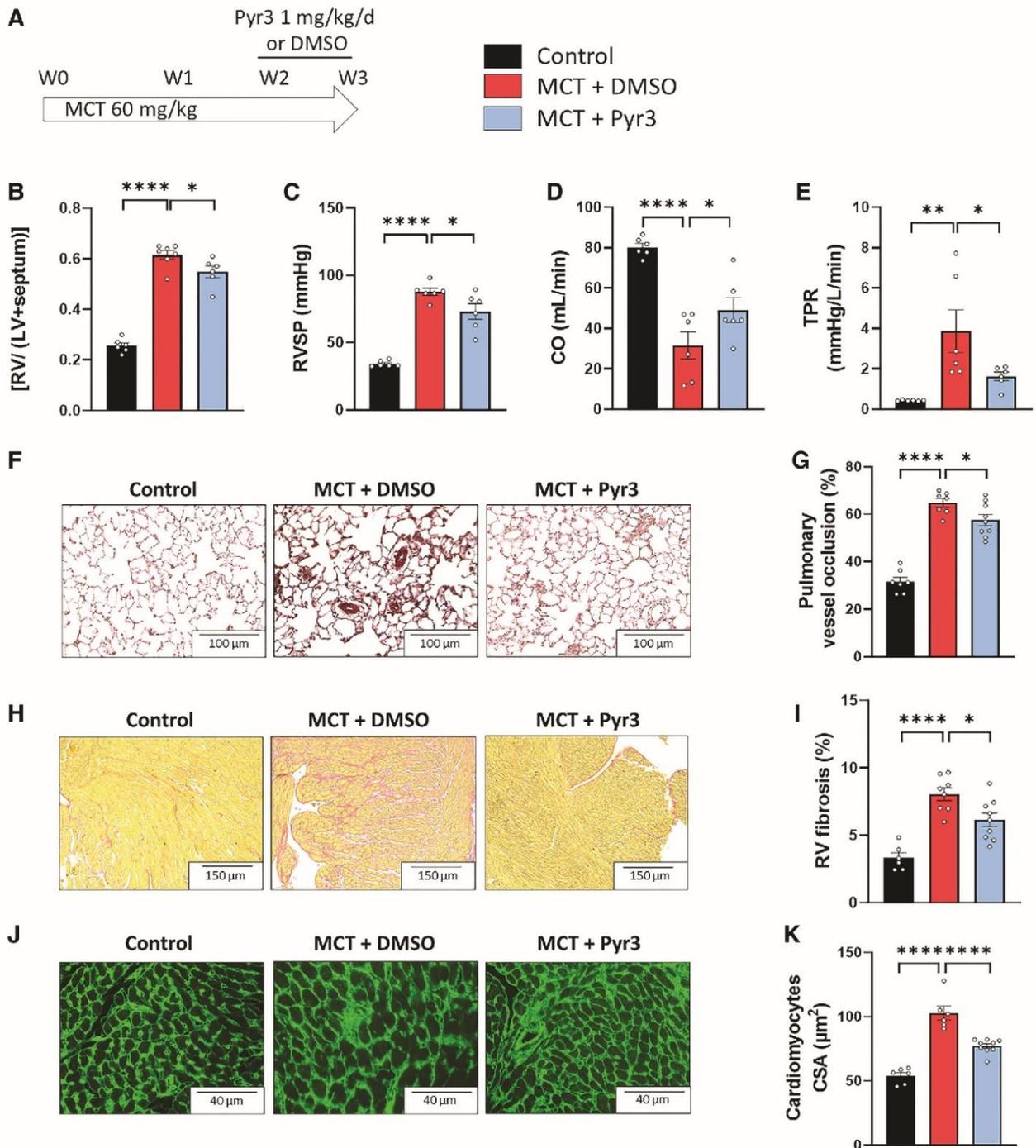
**Figure 6.** TRPC3 expression is increased in experimental pulmonary hypertension (PH)-induced by monocrotaline (MCT) exposure in rats, and TRPC3 pharmacological blockade reduced store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) in MCT-PASCs. *A*: immunoblot and quantification of TRPC3 expression in lung tissue from control and MCT rats ( $n = 5$  for control rats and  $n = 6$  for MCT rats). *B*: localization and expression of TRPC3 immunofluorescence staining of paraffin-embedded lung sections from control and MCT rats at 3 wk [DAPI staining (blue), TRPC3 staining (red), and  $\alpha$ SMA staining (green)]. Bar graph = 50  $\mu$ m. *C*: SOCE and SOCE amplitude in MCT-rat PASCs from rats treated with DMSO or Pyr3 (1  $\mu$ mol/L, TRPC3 inhibitor) ( $n = 4$  rats with 45 cells for DMSO and  $n = 4$  with 46 cells for Pyr3). *D*: SOCE and SOCE amplitude in PAH-hPASCs treated with DMSO or Pyr3 (1  $\mu$ mol/L) ( $n = 6$  rats with 67 cells for DMSO and Pyr3). *E, left*: dose-response curve (normalized to K100) was established by applying increasing concentrations of U46619 (a thromboxane A<sub>2</sub> mimetic) on isolated rat pulmonary arteries in the presence of DMSO or Pyr3 (1  $\mu$ mol/L). *E, right*: corresponding quantification of EC<sub>50</sub> values ( $n = 4$  rats). Experiments presented in A–E were analyzed using the Mann–Whitney test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . ns, nonsignificant; TRPC, transient receptor potential canonical.

TRPC CHANNELS IN PAH

during ER Ca<sup>2+</sup> depletion induced by thapsigargin stimulation (37). STIM1 is known to interact directly or indirectly with all TRPC channels, with the exception of TRPC7, conferring to TRPC a SOCE function (38, 39). It has also been described that TRPC1 function could be dependent on the Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup> entry, permitting the recruitment of

TRPC1 into the plasma membrane (40). We found that STIM1 and Orai1 expressions were unaffected by the knock-down of TRPC. However, we do not entirely exclude that reduced TRPC expression alters STIM1/Orai1 clustering.

In the context of PAH, where several growth factors (transforming growth factor  $\beta$ , platelet-derived growth factor, and



epidermal growth factor) or proangiogenic molecules (endothelin1 and thromboxane A2) are known to be overexpressed, we could hypothesize that all cited molecules could activate TRPC channels by inducing endoplasmic reticulum/SR  $\text{Ca}^{2+}$  depletion, DAG production, PKC activation, and generating intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevation. Here, we found that all expressed TRPC in hPASCs are involved in SOCE of PAH-hPASCs. In contrast, only TRPC1 and TRPC4 are involved in SOCE of control-hPASCs, suggesting dysregulation of a protein complex or activation mechanisms, which need to be elucidated in further study.

In rat models, TRPC1 overexpression has been demonstrated to enhance PA vasoconstriction (41), suggesting that TRPC1-mediated SOCE regulates PASC contraction. In rat aortic smooth muscle cells, TRPC1 is complexed to the KCa channel ( $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$  channels), promoting TRPC1  $\text{Ca}^{2+}$  entry and then membrane hyperpolarization. Plasma membrane hyperpolarization mediated by the TRPC1-KCa complex could limit smooth muscle cell contraction by reducing membrane depolarization (42). *Trpc6* deficiency in mice impaired the contractile capacity of mesangial cells (43). TRPC3 inhibitor application mediates mesenteric artery vasodilatation, suggesting that TRPC3 function contributes to mesenteric constriction regulation (44). Here, we found that selective TRPC3 pharmacological inhibition reduced the contractile capacity mediated by thromboxane A2, suggesting that TRPC3-exacerbated function in PAH-PASCs could contribute to PA vasoconstriction.

Even though patients with PAH died due to RV failure, RV failure is understudied compared with left ventricular failure (LVF). Nevertheless, many studies demonstrated that TRPC channels are crucial for  $\text{Ca}^{2+}$  mishandling in LVF (45). Indeed, a considerable amount of knowledge obtained in experimental models demonstrated the crucial role of each TRPC isoform in the development of LV hypertrophy (LVH) or LVF (45). In humans, failing hearts increase TRPC1, TRPC5, and TRPC6 expressions (45), suggesting that TRPC channels are also involved in human heart failure. In most cases, TRPC upregulation leads to increasing SOCE that activates the calcineurin/NFAT pathway and/or calmodulin kinase II pathway or the NF- $\kappa$ B pathway influencing ventricular remodeling (46). Selective pharmacological inhibition of TRPC3 and TRPC6 has been proposed to attenuate LVH and improve LV function induced by pressure overload in mice (19, 47). In the RV, only a few studies investigated the implication of SOCE in RV remodeling. We found a significant reduction of CO in MCT-DMSO rats, indicating that

these animals developed heart failure. We showed an improvement of CO after TRPC3-selective inhibition, explained by the reduction of pulmonary vascular narrowing and direct action on the TRPC3 channels expressed in RV cardiomyocytes (48). In RVF induced by MCT in rats, the mRNA level of *Trpc1* decreased, whereas the mRNA level of *Trpc6* increased (49). At the protein level, we found an upregulation of TRPC1/TRPC4 expression and of the long STIM1 in RVF induced by MCT exposure in rats correlated with an increased SOC current, contributing to the RV remodeling during hypertrophic stress (48). In this previous study, TRPC3 protein expression was unchanged in RV from MCT-PH rats (48). In the present study, we found that in vivo inhibition of TRPC3 improved RV hypertrophy and systolic pressure in MCT-PH rat models, explained by a reduction in pulmonary vascular remodeling and, to some extent, by the direct action of TRPC3 inhibition on RV myocyte function.

By preventing pulmonary vessel remodeling induced by CH exposure, double *trpc1/trpc6* knockout mice are protected against PH (9), indicating that TRPC1 and TRPC6 are essential for CH-induced PH in mice. Moreover, in vivo administration of siRNA against TRPC1 in CH-exposed mice reduces pulmonary arterial remodeling and RV systolic pressure (50). Furthermore, *trpc1*<sup>-/-</sup> mice developed partial protection against PH in response to CH compared with wild-type mice (51). *Trpc4*<sup>-/-</sup> rats exposed to Sugren/hypoxia exhibited similar hemodynamic parameters to wild-type rats, but *Trpc4*<sup>-/-</sup> rats showed a significant survival benefit, preserving cardiac output (52). In vivo TRPC6 inhibition with BI-749237 compound reduced PH phenotype in mice exposed to chronic hypoxia (53), suggesting that TRPC6 could also be a potential target in PAH. Using the siRNA strategy, we found that TRPC3 inhibition reduced several pathological phenotypes of PAH-hPASCs in vitro, including aberrant proliferation, exacerbated migration, and apoptosis resistance. Finally, our present results revealed that in vivo "curative" inhibition of TRPC3 reduced the development of PH in rats MCT-PH model. These data highlight that targeting the TRPC3 function could be a promising strategy for treating PAH.

Indeed, this study has some limitations. First, Pyr3 has been described to selectively and directly inhibit TRPC3 channels. Since the  $\text{IC}_{50}$  of Pyr3 for TRPC3 is 700 nmol/L, we used, in the present study, Pyr3 at 1  $\mu\text{mol/L}$  for our in vivo experiments to avoid potential side effects. Indeed, it was documented that at higher concentration (3  $\mu\text{mol/L}$ ), Pyr3

**Figure 7.** In vivo pharmacological inhibition of TRPC3 reduces the development of monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension (PH) at pulmonary and right ventricular (RV) levels. **A:** in vivo experimental design. Rats were injected subcutaneously with MCT at week 0 (W0) (60 mg/kg). DMSO or Pyr3 (1 mg/kg/day) injection was administered intraperitoneally 7 days from week 2 (W2) to week 3 (W3). **B:** Fulton's index (RV ÷ LV + septum) ( $n = 6$  rats for control and MCT + Pyr3 group and  $n = 7$  rats for MCT + DMSO group). **C:** right ventricular systolic pressure (RVSP) in mmHg ( $n = 6$  rats). **D:** cardiac output (CO) in mL/min for control ( $n = 6$  rats), MCT + Pyr3 ( $n = 7$  rats), and MCT + DMSO ( $n = 7$  rats) group. **E:** total pulmonary resistance (TPR) in mmHg/L/min (RVSP/CO) ( $n = 6$  rats). **F:** representative hematoxylin-eosin-Safran staining of paraffin-embedded lung sections from the control, MCT + DMSO, and MCT + Pyr3 groups. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . **G:** pulmonary vessel occlusion (%) in control ( $n = 7$  rats), MCT + DMSO ( $n = 9$  rats), and MCT + Pyr3 ( $n = 9$  rats) groups. **H:** representative interstitial fibrosis identified with Sirius red staining in RV compartment from control, MCT + DMSO, and MCT + Pyr3 groups. Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ . **I:** quantification of the percentage of fibrosis in RV tissue from control ( $n = 6$  rats), MCT + DMSO ( $n = 8$  rats), and MCT + Pyr3 ( $n = 9$  rats) groups. **J:** representative immunofluorescence images of RV sections stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated wheat germ agglutinin (WGA, 50  $\mu\text{g/mL}$ , green) from the control, MCT + DMSO, and MCT + Pyr3 groups. Scale bar, 40  $\mu\text{m}$ . **K:** quantification of cardiomyocytes cross-section area [CSA,  $n = 30$  cardiomyocytes measurement per rat for the control ( $n = 6$  rats), MCT + DMSO ( $n = 6$  rats), and MCT + Pyr3 ( $n = 9$  rats)]. Experiments presented in B–E and G, I, and K were analyzed using a one-way ANOVA test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . LV, left ventricular; TRPC, transient receptor potential canonical.

can also inhibit TRPC6 (19). At 3  $\mu\text{mol/L}$ , Pyr3 was also suggested to reduce Orail  $\text{Ca}^{2+}$  channel function (54). Since Orail or TRPC6 inhibition reduces experimental PH (4, 53), we cannot discriminate whether Pyr3 in vivo exposure protects rats from PH through the Orail and/or TRPC6 function. However, we found that Pyr3 at 1  $\mu\text{mol/L}$  has similar effects on SOCE in PAH-hPASCs compared with siRNA directed against TRPC3 in transfected PAH-hPASCs. Moreover, despite significant evolution in the selectivity of pharmacological molecules targeting TRPC, we were limited in using a selective inhibitor of each TRPC isoform, since we found, in the present study, that all TRPC isoforms could be an interesting target to reduce PAH-hPASCs dysfunctions.

In conclusion, our findings prove that all TRPC isoforms contribute to PAH pathogenesis by regulating the PAH-PASC phenotypes, such as hyperproliferation, apoptosis resistance, excessive migration, and contraction. Our data reveal that pharmacological inhibition of TRPC3 may be a relevant approach to decrease pulmonary vascular remodeling in PAH.

## DATA AVAILABILITY

All supporting data are available within the article and its online data supplement.

## SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Tables S1–S3 and Supplemental Figs. S1–S5: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.23145740.v1>.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Yvonne Duthel from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM) U999 and Hôpital Marie Lannelongue for all the help. Parts of the Graphical Abstract were drawn using Servier Medical Art, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

## GRANTS

This study was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), the Université Paris-Saclay, the Marie Lannelongue Hospital, and the French National Agency for Research (ANR) [Grant No. ANR-18-CE14-0023 (KAPAH)]. B.M. and A.S.-M.W. are supported by the Therapeutic Innovation Doctoral School (ED569).

## DISCLOSURES

M.H. and D.M. have relationships with drug companies, including Actelion, Bayer, GSK, Novartis, and Pfizer. In addition to being investigators in trials involving these companies, other relationships include consultancy services and memberships to scientific advisory boards. None of the other authors has any conflicts of interest, financial or otherwise, to disclose.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.A. conceived and designed research; B.M., A.S.-M.W., M.D., L.P., H.L.R., K.E.J., Y.R., V.C., and F.A. performed experiments; B.M., A.S.-M.W., M.D., L.P., H.L.R., K.E.J., Y.R., S.C.-K., V.C., and F.A. analyzed data; M.H., A.S.-M.W., M.D., L.P., H.L.R., J.S., V.C., and F.A. interpreted results of experiments; B.M., A.S.-M.W., M.D., Y.R., S.C.-K.,

and F.A. prepared figures; B.M., A.S.-M.W., S.C.-K., J.S., O.M., D.M., V.C., and F.A. drafted manuscript; J.S., M.H., O.M., D.M., V.C., and F.A. edited and revised manuscript; B.M., A.S.-M.W., M.D., L.P., H.L.R., K.E.J., Y.R., S.C.-K., J.S., M.H., O.M., D.M., V.C., and F.A. approved final version of manuscript.

## REFERENCES

- Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmueller P, Klinger JR, Nicols MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, Rabinovitch M. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J* 53: 1801887, 2019. doi:10.1183/13993003.01887-2018.
- Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 53: 1801913, 2019. doi:10.1183/13993003.01913-2018.
- Masson B, Montani D, Humbert M, Capuano V, Antigny F. Role of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in the pulmonary vascular remodeling occurring in pulmonary arterial hypertension. *Biomolecules* 11: 1781, 2021. doi:10.3390/biom11121781.
- Masson B, Le Ribez H, Sabourin J, Laubry L, Woodhouse E, Foster R, Ruchon Y, Duthel M, Boët A, Ghigna M-R, De Montpreville V, Mercier O, Beech DJ, Benitah J-P, Bailey MA, Humbert M, Montani D, Capuano V, Antigny F. Orail1 inhibitors as potential treatments for pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 131: e102–e119, 2022. doi:10.1161/CIRCRESAHA.122.321041.
- Earley S, Brayden JE. Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev* 95: 645–690, 2015. doi:10.1152/physrev.00026.2014.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L. Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2060–2064, 1999. doi:10.1073/pnas.96.5.2060.
- Ruhle B, Trebak M. Emerging roles for native Orail  $\text{Ca}^{2+}$  channels in cardiovascular disease. *Curr Top Membr* 71: 209–235, 2013. doi:10.1016/B978-0-12-407870-3.00009-3.
- Yu Y, Keller SH, Remillard CV, Safrina O, Nicholson A, Zhang SL, Jiang W, Vangala N, Landsberg JW, Wang J-Y, Thistlethwaite PA, Channick RN, Robbins IM, Loyd JE, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT, Cahalan MD, Rubin LJ, Yuan JX-J. A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119: 2313–2322, 2009. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.782458.
- Xia Y, Yang X-R, Fu Z, Paudel O, Abramowitz J, Birnbaumer L, Sham JSK. Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions. *Hypertension* 63: 173–180, 2014. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01902.
- Malkmus K, Brosien M, Knoepp F, Schaffelhofer L, Grimminger F, Rummel C, Gudermann T, Dietrich A, Birnbaumer L, Weissmann N, Kraut S. Deletion of classical transient receptor potential 1, 3 and 6 alters pulmonary vasoconstriction in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Front Physiol* 13: 1080875, 2022. doi:10.3389/fphys.2022.1080875.
- Sankhe S, Manousakidi S, Antigny F, Arthur Ataam J, Bentebbal S, Ruchon Y, Lecerf F, Sabourin J, Price L, Fadel E, Dorfmueller P, Eddahibi S, Humbert M, Perros F, Capuano V. T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels elicit pro-proliferative and anti-apoptotic responses through impaired PP2A/Akt1 signaling in PASCs from patients with pulmonary arterial hypertension. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 1631–1641, 2017. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.06.018.
- Lambert M, Capuano V, Boët A, Tesson L, Bertero T, Nakhleh MK, Remy S, Anegon I, Pechoux C, Hautefort A, Rucker-Martin C, Manoury B, Domergue V, Mercier O, Girerd B, Montani D, Perros F, Humbert M, Antigny F. Characterization of *Kcnk3*-mutated rat, a novel model of pulmonary hypertension. *Circ Res* 125: 678–695, 2019. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.314793.
- Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Dartevielle P, Hamon M, Adnot S. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth

- muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 108: 1141–1150, 2001. doi:10.1172/JCI200112805.
14. Le Ribez H, Courboulin A, Ghigna M-R, Lambert M, Hautefort A, Humbert M, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Perros F, Antigny F. In vivo miR-138-5p inhibition alleviates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and normalizes pulmonary KCNK3 and SLC45A3 expression. *Respir Res* 21: 186, 2020. doi:10.1186/s12931-020-01444-7.
  15. Lambert M, Mendes-Ferreira P, Ghigna M-R, LeRibez H, Adão R, Boet A, Capuano V, Rucker-Martin C, Brás-Silva C, Quarck R, Domergue V, Vachiéry J-L, Humbert M, Perros F, Montani D, Antigny F. Kcnk3 dysfunction exaggerates the development of pulmonary hypertension induced by left ventricular pressure overload. *Cardiovasc Res* 117: 2474–2488, 2021. doi:10.1093/cvr/cvab016.
  16. Lambert M, Boet A, Rucker-Martin C, Mendes-Ferreira P, Capuano V, Hatem S, Adão R, Brás-Silva C, Hautefort A, Michel J-B, Dorfmueller P, Fadel E, Kotsimbos T, Price L, Jourdon P, Montani D, Humbert M, Perros F, Antigny F. Loss of KCNK3 is a hallmark of RV hypertrophy/dysfunction associated with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 114: 880–893, 2018. doi:10.1093/cvr/cvy016.
  17. Le Ribez H, To L, Ghigna M-R, Martin C, Nagaraj C, Dreano E, Rucker-Martin C, Girerd B, Bouliguad J, Pechoux C, Lambert M, Boet A, Issard J, Mercier O, Hoetzenecker K, Manoury B, Becq F, Burgel P-R, Cottart C-H, Olschewski A, Sermet-Gaudelus I, Perros F, Humbert M, Montani D, Antigny F. Involvement of CFTR in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 58: 2000653, 2021. doi:10.1183/13993003.00653-2020.
  18. Le Ribez H, Masson B, Capuano V, Duthell M, Goroochurn H, Boët A, Ghigna M-R, De Montpreville V, Girerd B, Lambert M, Mercier O, Chung WK, Humbert M, Montani D, Antigny F. SUR1 as a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 66: 539–554, 2022. doi:10.1165/rcmb.2021-01800C.
  19. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5400–5405, 2009. doi:10.1073/pnas.0808793106.
  20. Lambert M, Capuano V, Olschewski A, Sabourin J, Nagaraj C, Girerd B, Weatherald J, Humbert M, Antigny F. Ion channels in pulmonary hypertension: a therapeutic interest? *Int J Mol Sci* 19: 3162, 2018. doi:10.3390/ijms19103162.
  21. Ng LC, Airey JA, Hume JR. The contribution of TRPC1 and STIM1 to capacitative  $Ca^{2+}$  entry in pulmonary artery. *Adv Exp Med Biol* 661: 123–135, 2010. doi:10.1007/978-1-60761-500-2\_8.
  22. Lu W, Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT. Differences in STIM1 and TRPC expression in proximal and distal pulmonary arterial smooth muscle are associated with differences in  $Ca^{2+}$  responses to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L104–L113, 2008. doi:10.1152/ajplung.00058.2008.
  23. Castillo-Galán S, Arenas GA, Reyes RV, Krause BJ, Iturriaga R. Stim-activated TRPC-ORAI channels in pulmonary hypertension induced by chronic intermittent hypoxia. *Pulm Circ* 10: 13–22, 2020. doi:10.1177/2045894020941484.
  24. Castillo-Galán S, Arenas GA, Iturriaga R. Contribution of STIM-Activated TRPC-ORAI channels in pulmonary hypertension induced by chronic sustained and intermittent hypoxia. *Curr Vasc Pharmacol* 20: 272–283, 2022. doi:10.2174/1570161120666220321141805.
  25. Lin M-J, Leung GPH, Zhang W-M, Yang X-R, Yip K-P, Tse C-M, Sham JSK. Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated  $Ca^{2+}$  channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 95: 496–505, 2004. doi:10.1161/01.RES.0000138952.16382.ad.
  26. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 113: 2630–2641, 2006. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008.
  27. Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX-J. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13861–13866, 2004. doi:10.1073/pnas.0405908101.
  28. Bush EW, Hood DB, Papst PJ, Chappo JA, Minobe W, Bristow MR, Olson EN, McKinsey TA. Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J Biol Chem* 281: 33487–33496, 2006. doi:10.1074/jbc.M605536200.
  29. Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest* 116: 3114–3126, 2006. doi:10.1172/JCI27702.
  30. Bartoli F, Moradi Bachiller S, Antigny F, Bedouet K, Gerbaud P, Sabourin J, Benitah J-P. Specific upregulation of TRPC1 and TRPC5 channels by mineralocorticoid pathway in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Cells* 9: 47, 2019. doi:10.3390/cells9010047.
  31. Sabourin J, Bartoli F, Antigny F, Gomez AM, Benitah J-P. Transient receptor potential canonical (TRPC)/Orai1-dependent store-operated  $Ca^{2+}$  channels: new targets of aldosterone in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 291: 13394–13409, 2016. doi:10.1074/jbc.M115.693911.
  32. Maron BA, Opatowsky AR, Landzberg MJ, Loscalzo J, Waxman AB, Leopold JA. Plasma aldosterone levels are elevated in patients with pulmonary arterial hypertension in the absence of left ventricular heart failure: a pilot study. *Eur J Heart Fail* 15: 277–283, 2013. doi:10.1093/eurjhf/hfs173.
  33. Tu L, Thuillet R, Perrot J, Ottaviani M, Ponsardin E, Kolkhof P, Humbert M, Viengchareun S, Lombès M, Guignabert C. Mineralocorticoid receptor antagonism by finerenone attenuates established pulmonary hypertension in rats. *Hypertension* 79: 2262–2273, 2022. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.19207.
  34. Antigny F, Norez C, Dannhoffer L, Bertrand J, Raveau D, Corbi P, Jayle C, Becq F, Vandebrouck C. Transient receptor potential canonical channel 6 links  $Ca^{2+}$  mishandling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44: 83–90, 2011. doi:10.1165/rcmb.2009-0347OC.
  35. Tabelaing C, Yu H, Wang L, Ranke H, Goldenberg NM, Zabini D, Noe E, Krauszman A, Gutbier B, Yin J, Schaefer M, Arenz C, Hocke AC, Suttorp N, Proia RL, Witzentrath M, Kuebler WM. CFTR and sphingolipids mediate hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E1614–E1623, 2015. doi:10.1073/pnas.1421190112.
  36. Lopez JJ, Jardin I, Sanchez-Collado J, Salido GM, Smani T, Rosado JA. TRPC channels in the SOCE scenario. *Cells* 9: 126, 2020. doi:10.3390/cells9010126.
  37. Antigny F, Jousset H, König S, Frieden M. Thapsigargin activates  $Ca^{2+}$  entry both by store-dependent, STIM1/Orai1-mediated, and store-independent, TRPC3/PLC/PKC-mediated pathways in human endothelial cells. *Cell Calcium* 49: 115–127, 2011. doi:10.1016/j.ceca.2010.12.001.
  38. Choi S, Maletch J, Jha A, Lee KP, Kim MS, So I, Ahuja M, Muallem S. The TRPCs-STIM1-Orai interaction. *Handb Exp Pharmacol* 223: 1035–1054, 2014. doi:10.1007/978-3-319-05161-1\_13.
  39. Zeng W, Yuan JP, Kim MS, Choi YJ, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol Cell* 32: 439–448, 2008. doi:10.1016/j.molcel.2008.09.020.
  40. Cheng KT, Liu X, Ong HL, Swaim W, Ambudkar IS. Local  $Ca^{2+}$  entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic  $Ca^{2+}$  signals required for specific cell functions. *PLoS Biol* 9: e1001025, 2011. doi:10.1371/journal.pbio.1001025.
  41. Kunichika N, Yu Y, Remillard CV, Platoshyn O, Zhang S, Yuan JX-J. Overexpression of TRPC1 enhances pulmonary vasoconstriction induced by capacitative  $Ca^{2+}$  entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L962–L969, 2004. doi:10.1152/ajplung.00452.2003.
  42. Kwan H-Y, Shen B, Ma X, Kwok Y-C, Huang Y, Man Y-B, Yu S, Yao X. TRPC1 associates with  $BK_{Ca}$  channel to form a signal complex in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 104: 670–678, 2009 [Erratum in *Circ Res* 105: e6, 2009]. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.188748.
  43. Li W, Ding Y, Smedley C, Wang Y, Chaudhari S, Birnbaumer L, Ma R. Increased glomerular filtration rate and impaired contractile function of mesangial cells in TRPC6 knockout mice. *Sci Rep* 7: 4145, 2017. doi:10.1038/s41598-017-04067-z.
  44. Álvarez-Miguel I, Cidad P, Pérez-García MT, López-López JR. Differences in TRPC3 and TRPC6 channels assembly in mesenteric

- vascular smooth muscle cells in essential hypertension. *J Physiol* 595: 1497–1513, 2017. doi:10.1113/JP273327.
45. Sabourin J, Beauvais A, Luo R, Montani D, Benitah J-P, Masson B, Antigny F. The SOCE machinery: an unbalanced knowledge between left and right ventricular pathophysiology. *Cells* 11: 3282, 2022. doi:10.3390/cells11203282.
  46. Wen H, Gwathmey JK, Xie L-H. Role of transient receptor potential canonical channels in heart physiology and pathophysiology. *Front Cardiovasc Med* 7: 24, 2020. doi:10.3389/fcvm.2020.00024.
  47. Seo K, Rainer PP, Shalkey Hahn V, Lee D, Jo S-H, Andersen A, Liu T, Xu X, Willette RN, Lepore JJ, Marino JP, Birnbaumer L, Schnackenberg CG, Kass DA. Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 1551–1556, 2014 [Erratum in *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 6115, 2014]. doi:10.1073/pnas.1308963111.
  48. Sabourin J, Boet A, Rucker-Martin C, Lambert M, Gomez A-M, Benitah J-P, Perros F, Humbert M, Antigny F. Ca<sup>2+</sup> handling remodeling and STIM1/Orai1/TRPC1/TRPC4 upregulation in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 118: 208–224, 2018. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.04.003.
  49. Benoist D, Stones R, Drinkhill MJ, Benson AP, Yang Z, Cassan C, Gilbert SH, Saint DA, Cazorla O, Steele DS, Bernus O, White E. Cardiac arrhythmia mechanisms in rats with heart failure induced by pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H2381–H2395, 2012. doi:10.1152/ajpheart.01084.2011.
  50. Sun CK, Zhen YY, Lu HI, Sung PH, Chang LT, Tsai TH, Sheu JJ, Chen YL, Chua S, Chang HW, Chen YL, Lee FY, Yip HK. Reducing TRPC1 expression through liposome-mediated siRNA delivery markedly attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in a murine model. *Stem Cells Int* 2014: 316214, 2014. doi:10.1155/2014/316214.
  51. Malczyk M, Veith C, Fuchs B, Hofmann K, Storch U, Schermuly RT, Witznath M, Ahlbrecht K, Fecher-Trost C, Flockerzi V, Ghofrani HA, Grimminger F, Seeger W, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N. Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 188: 1451–1459, 2013. doi:10.1164/rccm.201307-1252OC.
  52. Alzoubi A, Almalouf P, Toba M, O'Neill K, Qian X, Francis M, Taylor MS, Alexeyev M, McMurtry IF, Oka M, Stevens T. TRPC4 inactivation confers a survival benefit in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol* 183: 1779–1788, 2013. doi:10.1016/j.ajpath.2013.08.016.
  53. Jain PP, Lai N, Xiong M, Chen J, Babicheva A, Zhao T, Parmisano S, Zhao M, Paquin C, Matti M, Powers R, Balistreri A, Kim NH, Valdez-Jasso D, Thistlethwaite PA, Shyy JY-J, Wang J, Garcia JGN, Makino A, Yuan JX-J. TRPC6, a therapeutic target for pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 321: L1161–L1182, 2021. doi:10.1152/ajplung.00159.2021.
  54. Schleifer H, Doleschal B, Lichtenegger M, Oppenrieder R, Derler I, Frischauf I, Glasnov TN, Kappe CO, Romanin C, Groschner K. Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry pathways. *Br J Pharmacol* 167: 1712–1722, 2012. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02126.x.

## Contribution of TRPC channels in human and experimental pulmonary arterial hypertension

**Short title: TRPC channels in PAH**

Bastien Masson<sup>1,2</sup>, Anais Saint-Martin Willer<sup>1,2</sup>, Mary Dutheil<sup>1,2,3</sup>, Lucille Penalva<sup>1,2</sup>, Hélène Le Ribezuz<sup>1,2</sup>,  
Kristelle El Jekmek<sup>1,2</sup>, Yann Ruchon<sup>1,2,3</sup>, Sylvia Cohen-Kaminsky<sup>1,2</sup>, Jessica Sabourin<sup>4</sup>, Marc Humbert<sup>1,2,5</sup>,  
Olaf Mercier<sup>1,2,6</sup>, David Montani<sup>1,2,5</sup>, Véronique Capuano<sup>1,2,3</sup> and Fabrice Antigny<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France. (B.M, H.L-R, M.D, L.P, A. SM-W, Y. R, C.E-J, S.C-K, M.H, D.M, V.C and F.A)

<sup>2</sup>INSERM UMR\_S 999 « Hypertension pulmonaire : Physiopathologie et Innovation Thérapeutique », Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France. (B.M, H.L-R, M.D, L.P, A. SM-W, Y. R, C.E-J, S.C-K M.H, D.M, V.C and F.A)

<sup>3</sup>Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis Robinson, France. (Y.R, M.D, V.C)

<sup>4</sup>Inserm, UMR-S 1180, Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France. (J.S)

<sup>5</sup>Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France. (M.H, D.M)

<sup>6</sup>Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Transplantation Cardio-Pulmonaire, Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Le Plessis Robinson, France. (O.M)

**Corresponding author:** Fabrice Antigny, INSERM UMR\_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France.

Tel. : (33) 1 40 94 22 99; E-mail: [fabrice.antigny@inserm.fr](mailto:fabrice.antigny@inserm.fr)

## SUPPLEMENTAL TABLE

Supplemental Table 1: Characteristics of Controls and PAH patients before lung transplantation

	PAH (n=12)	Control (n=10)
Age, years	22 ( 45 ) 62	49 (65) 83
Sex, M/F	2M /10F	3M / 7F
Mutation in <i>BMPR2</i> gene, n		NA
carrier	1	NA
no-carrier	11	NA
mPAP, mmHg	42 [60.1] 85	NA
CI, l/min/m <sup>2</sup>	2.19 [3.1] 6	NA
PVR, Wood units	8.5 [12.9] 35	NA
PCP, mmHg	5.9 [9] 14	NA
medication		NA
tritherapies	80%	NA
bitherapies	5%	NA
monotherapies	0%	NA

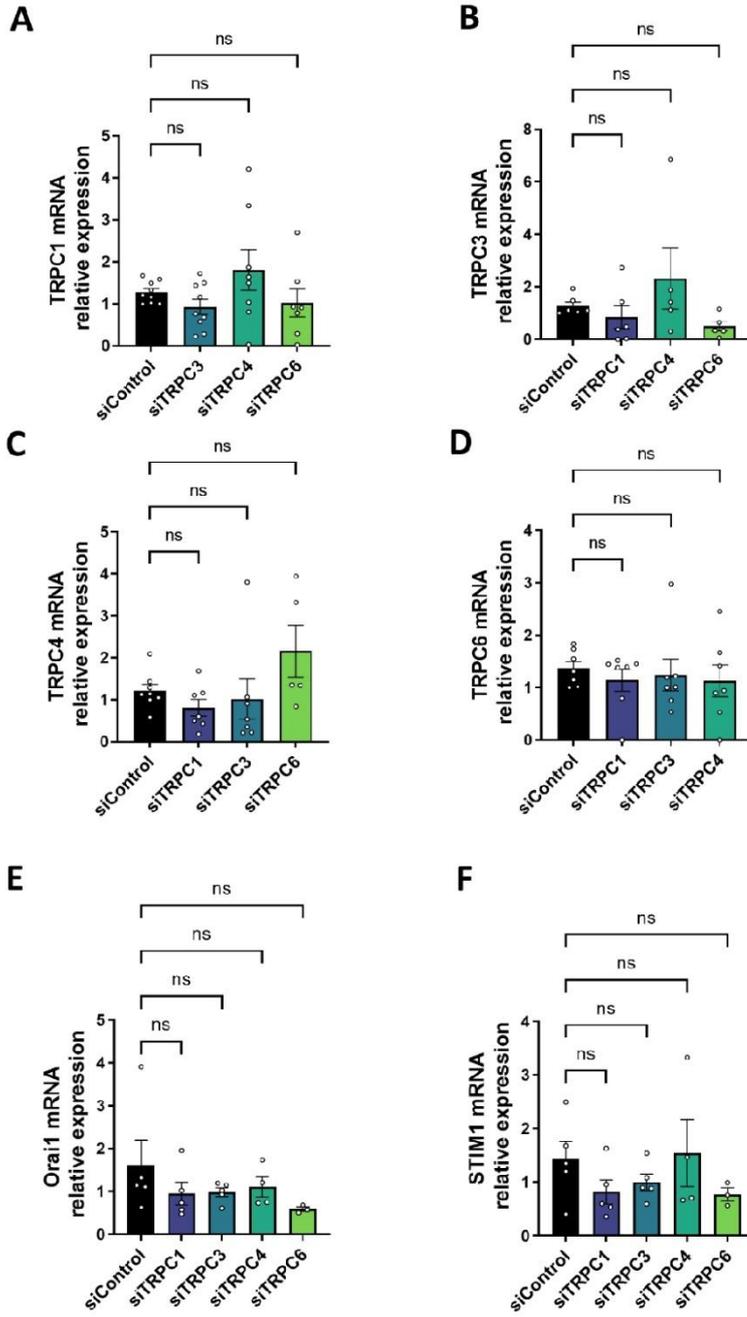
**Supplemental Table 2: Antibodies used for western blotting**

ANTIBODY	SPECIES	DILUTION	SUPPLIER	REFERENCE
<b>pP42/P44</b>	Rabbit	1/3000	Cell Signaling Technology	4376
<b>P42/P44</b>	Rabbit	1/3000	Cell Signaling Technology	9102
<b>pP38</b>	Rabbit	1/ 2000	Cell Signaling Technology	9211S
<b>P38</b>	Rabbit	1/2000	Cell Signaling Technology	7972
<b>p-Akt (Thr308)</b>	Rabbit	1/1000	Cell Signaling Technology	9275
<b>Akt</b>	Rabbit	1/2000	Cell Signaling Technology	2938
<b>P21</b>	Rabbit	1/2000	Cell Signaling Technology	610266
<b>Caspase 9</b>	Rabbit	1/2000	Cell Signaling Technology	9508
<b>β-Actin</b>	Mouse	1/5000	Sigma-Aldrich	A1978
<b>Orai1</b>	Rabbit	1/1000	Sigma-Aldrich	O8264
<b>STIM1</b>	Rabbit	1/1000	Sigma-Aldrich	S6072
<b>TRPC1</b>	Rabbit	1/2000	Alomone	ACC-010
<b>TRPC3</b>	Rabbit	1/2000	Alomone	ACC-016
<b>TRPC4</b>	Rabbit	1/1000	Alomone	ACC-018
<b>TRPC5</b>	Mouse	1/200	NeuroMab	75-104
<b>TRPC6</b>	Rabbit	1/2000	Alomone	ACC-017

**Supplemental Table 3: Primers used for RT-qPCR**

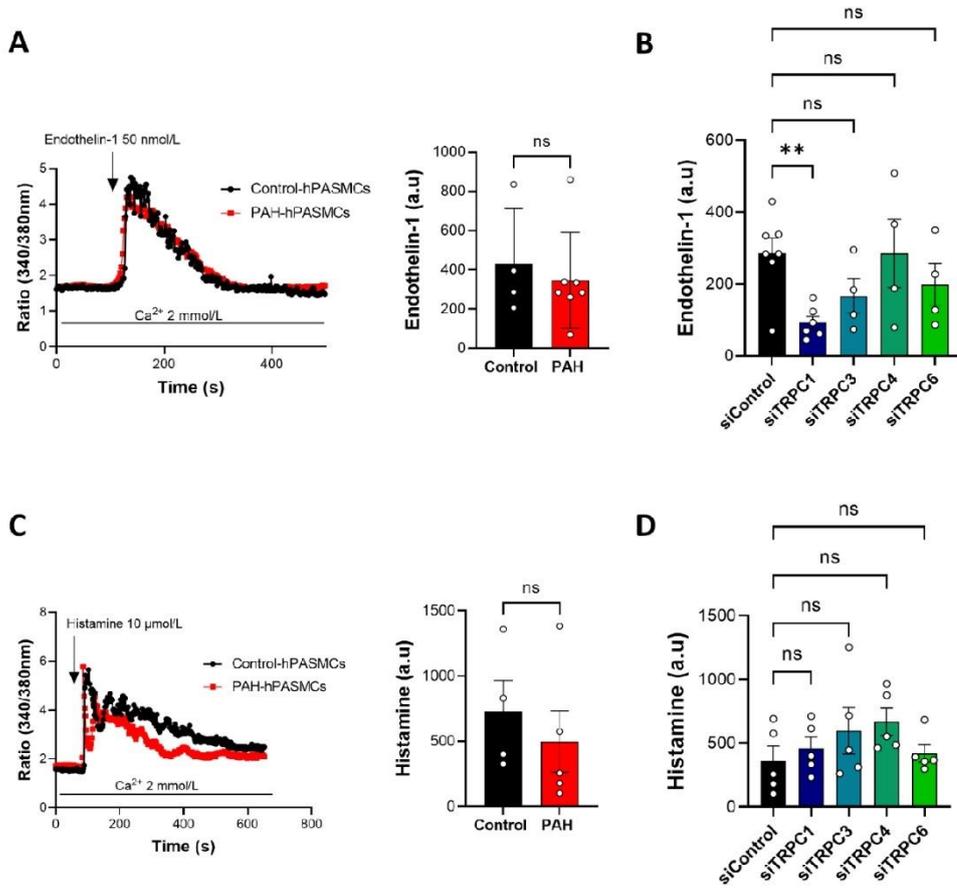
ANTIBODY	SPECIES	DILUTION	SUPPLIER	REFERENCE
<b><math>\alpha</math>-SMA-FITC</b>	Mouse	1/200	Sigma-Aldrich	F3777
<b>TRPC1</b>	Rabbit	1/100	Alomone	ACC-010
<b>TRPC3</b>	Rabbit	1/100	Alomone	ACC-016
<b>TRPC4</b>	Rabbit	1/100	Alomone	ACC-018
<b>TRPC6</b>	Rabbit	1/100	Alomone	ACC-017

SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental Figure 1

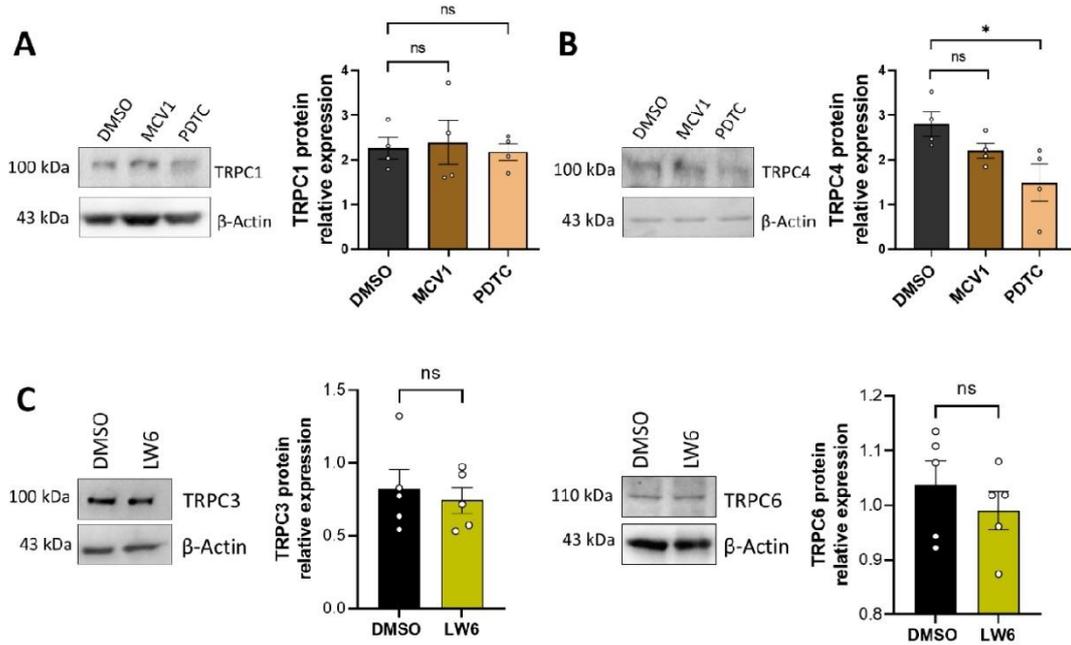
**Supplemental Figure 1: Consequence of the knockdown of TRPC1 or TRPC3 or TRPC4, or TRPC6 on TRPC and Orai1 channels and STIM1 expression.** (A) Quantification of the consequence of siControl (n=9), siTRPC3 (n=9), siTRPC4 (n=7), and siTRPC6 (n=7) on TRPC1 mRNA expression in PAH-hPASMCs. (B) Quantification of the consequence of siControl (n=6), siTRPC1 (n=6), siTRPC4 (n=5), and siTRPC6 (n=5) on TRPC3 mRNA expression in PAH-hPASMCs. (C) Quantification of the consequence of siControl (n=8), siTRPC1 (n=7), siTRPC3 (n=7), and siTRPC6 (n=5) on TRPC4 mRNA expression in PAH-hPASMCs. (D) Quantification of the consequence of siControl (n=7), siTRPC1 (n=6), siTRPC3 (n=7), and siTRPC4 (n=6) on TRPC6 mRNA expression in PAH-hPASMCs. (E) Quantification of the consequence of siControl (n=5), siTRPC1 (n=5), siTRPC3 (n=5), siTRPC4 (n=4), and siTRPC6 (n=3) on Orai1 protein expression (n=6 patients). (F) Quantification of the consequence of siControl (n=5), siTRPC1 (n=5), siTRPC3 (n=5), siTRPC4 (n=4), and siTRPC6 (n=3) on STIM1 protein expression (n=6 patients). Experiments presented were analysed with Kruskal–Wallis test. ns = non-significant.



Supplemental Figure 2

**Supplemental Figure 2: Consequence of the knockdown of TRPC1 or TRPC3 or TRPC4, or TRPC6 in intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling induced by endothelin-1 and histamine in PAH-hPASMCs.** (A) Endothelin-1-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in control (n=4) and PAH-hPASMCs (n=5). Quantification of the area under the curve in control (n=4) and PAH-hPASMCs (n=5). (B) Consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4 or TRPC6 knockdown on endothelin-1-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in PAH-PASMCs (n=4). (C) Histamine-induced Ca<sup>2+</sup>

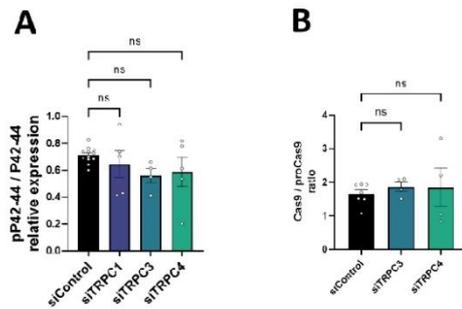
signaling in control and PAH-hPASMCs. Quantification of the area under the curve in control (n=4) and PAH-hPASMCs (n=5). (D) Consequence of TRPC1, TRPC3, TRPC4 or TRPC6 knockdown on histamine-induced  $Ca^{2+}$  signaling in PAH-PASMCs (n=5). Experiments presented in panels A and C were analysed using Mann-Whitney test, experiments presented in panels B and D were analysed using Kruskal–Wallis test test. ns = non-significant; \*\* $P < 0.01$ .



Supplemental Figure 3

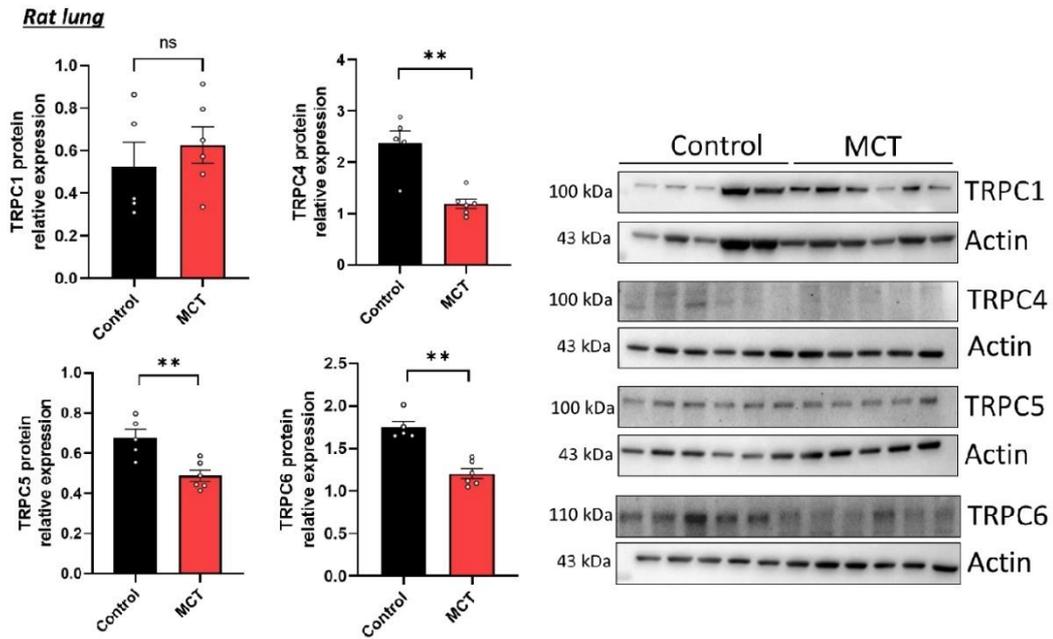
**Supplemental Figure 3: Consequence of NFAT, NFκB, and HIF-1α inhibition on TRPC expression.** (A) Immunoblot and quantification of TRPC1 in PAH-PASMCs treated 48h with NFAT inhibitor (MCV1 1 μmol/L) and NFκB inhibitor (PDTC, 1 μmol/L). (B) Immunoblot and quantification of TRPC4 in PAH-PASMCs treated 48h with NFAT inhibitor (MCV1 1 μmol/L) and NFκB inhibitor (PDTC, 1 μmol/L) (n=4 patients). (C) Immunoblot and quantification of

TRPC3 and TRPC6 in PAH-PASMCs treated 48h with 20  $\mu\text{mol/L}$  HIF-1 $\alpha$  inhibitor LW6 (n=4 patients). Experiments presented in panels A and B were analysed using Kruskal–Wallis test, experiments presented in panels A and B were analysed using Mann-Whitney test. ns = non-significant; \* $P < 0.05$ .



Supplemental Figure 4

**Supplemental Figure 4: Consequence of TRPC channels inhibition on P42-44 and Caspase9/procaspase9 protein expression.** (A) Immunoblot and quantification of the consequence of siControl (n=12) TRPC1 (n=5), TRPC3 (n=4) or TRPC4 (n=5) knockdown on the pP42-44 / P42-44 ratio. (B) Immunoblot and quantification of the consequence of siControl (n=7), TRPC3 (n=4), or TRPC4 (n=4) knockdown on the caspase9 / procaspase9 ratio. Experiments presented in panels A and B were analysed using Kruskal–Wallis test. ns = non-significant.



Supplemental Figure 5

**Supplemental Figure 5: TRPC1, TRPC4, TRPC5, and TRPC6 protein expression in lungs from control and MCT-PH rats.** Representative Western blots and quantification of TRPC1, TRPC4, TRPC5, and TRPC6 in lungs from control and MCT-PH rats (3 weeks) (n=5 for Control and n=6 for MCT). Experiments presented were analysed using Mann-Whitney test. ns = non-significant; \*\* $P < 0.01$ .

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

# 1 RÔLE DES CANAUX SOC DANS LES CML-AP DE PATIENTS ATTEINTS D'HTAP

## 1.1 La composition du SOCE dans les CML-AP

Lors de notre première étude, nous montrons que le SOCE est quasiment doublé dans les CML-AP de patients HTAP comparé aux patients contrôles. Les proportions du SOCE médié par le canal Orai1 sont variables en fonction du type cellulaire. J'ai mis en évidence, par siARN, que Orai1 est impliqué dans 65 à 70 % du SOCE des CML-AP de patients atteints d'HTAP. L'autre partie du SOCE, qui n'est pas inhibée par la sous-expression d'Orai1, peut être attribuée aux canaux Orai1 restants ainsi qu'aux canaux TRPC. De nombreuses études ont également démontré l'implication des canaux TRPC dans le SOCE. Lors de notre seconde étude, nous montrons que la sous-expression unique de TRPC1, TRPC3, TRPC4 ou TRPC6 provoque une diminution du SOCE de 35 à 40 % pour chaque isoforme.

Ces résultats sont probablement explicables grâce aux interactions existantes entre ces différents canaux. En effet, les canaux TRPC sont capables de former des hétérotétramères avec des associations entre les différentes isoformes : TRPC1/3, TRPC1/4, TRPC1/5, TRPC3/4, TRPC4/5, TRPC3/6 ou encore TRPC1/4/5 [538,563]. Il a également été démontré que les canaux Orai peuvent interagir avec tous ces canaux TRPC [629,630]. De ce fait, il serait intéressant d'étudier les interactions entre ces différents acteurs, par exemple par expérience de co-immunoprécipitation. Les résultats permettraient ainsi de comparer les interactions entre CML-AP de patient contrôles et de patients atteints d'HTAP.

## 1.2 Expression et régulation des canaux Orai et TRPC

J'ai montré une augmentation de l'expression d'Orai1, TRPC3 et TRPC6 dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP. Cette expression est notamment responsable de l'augmentation du SOCE dans ces cellules.

Il a déjà été démontré que les canaux TRPC peuvent avoir un impact sur la présence du canal Orai1 à la membrane plasmique, potentiellement directement ou en ayant un impact sur le cytosquelette. Par exemple, le recyclage d'Orai1 à la membrane plasmique est lié à l'influx par le canal TRPC6 dans des lignées cellulaires de cancer du sein [631]. Néanmoins, cela ne semble pas être le cas dans les CML-AP car nous montrons dans la seconde étude que les expressions de STIM et Orai1 ne sont pas affectées par les

sous-expressions des canaux TRPC. Cependant, nous n'avons pas vérifié si la réduction de l'expression des canaux TRPC modifie le regroupement de STIM1/Orai1 en *clusters*.

De nombreuses voies de signalisation sont dérégulées dans l'HTAP et peuvent impacter l'expression des canaux SOC. Il a été démontré que l'expression de HIF1- $\alpha$ , qui est augmentée dans l'HTAP, pouvait réguler l'expression d'Orai2 dans les CML-AP de rats. Néanmoins, dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP, nous n'avons montré aucune modification de l'expression du canal Orai1, TRPC3 ou TRPC6 en réponse à l'inhibition de HIF1- $\alpha$  par un inhibiteur pharmacologique, le LW6.

Le PDGF et l'ET-1 sont tous les deux fortement retrouvés chez les patients atteints d'HTAP. Ogawa *et al.* ont démontré que le traitement (24h) des CML-AP humaines contrôles au PDGF provoquait une augmentation de l'expression de STIM et Orai1 et du SOCE via la phosphorylation et l'activation d'Akt [76]. La phosphorylation d'Akt est augmentée dans les CML-AP de patients HTAP [167]. Nous n'avons pas retrouvé ces résultats dans notre première étude, le traitement des CML-AP contrôles au PDGF (24h) n'ayant aucun effet sur l'expression d'Orai1. Cependant, il a été démontré dans les CMLV d'origine systémique que le PDGF pouvait activer un influx calcique par Orai1 sans provoquer la redistribution à la membrane de STIM1 et Orai1 [632]. L'augmentation du PDGF dans l'HTAP pourrait donc tout de même être à l'origine d'une augmentation du calcium passant par Orai1. De plus, le traitement de CML-AP de rat avec du PDGF a augmenté l'expression protéique et de l'ARNm de TRPC6, associé à une augmentation du SOCE [197]. Il serait donc intéressant de regarder l'effet de l'endothéline et du PDGF sur l'expression des canaux TRPC. Le traitement des CML-AP avec de l'endothéline-1 n'a pas non plus modifié l'expression d'Orai. Cependant, j'ai montré que le traitement de CML-AP à l'endothéline-1 provoque un influx calcique lié au canal TRPC1 pouvant expliquer des différences d'activation entre les différents canaux TRPC. Ainsi, il serait intéressant d'analyser l'expression protéique des canaux TRPC suite à une stimulation à l'endothéline-1.

Lors de mes études, nous montrons que MEK1/2 est impliqué dans la régulation de l'expression protéique d'Orai1, NFAT dans celle d'Orai1 et TRPC6, et NF $\kappa$ B dans celle d'Orai1 et TRPC3. Concernant Orai1, ces régulations n'ont pas agi sur l'ARNm et semblent donc être des modifications traductionnelles ou post-traductionnelles. En outre, cette régulation ne semble pas liée à Akt ou P38 (dont l'expression/phosphorylation est augmentée dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP et qui peut réguler Orai1 dans d'autres types cellulaires) [108]. Ces résultats

sont très intéressants pour la compréhension de la surexpression de ces canaux, les MAPK étant suractivées dans les CML-AP de patients HTAP. Associé à l'augmentation du SOCE, nous avons trouvé une augmentation de l'activité de la calcineurine dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP, liée à l'influx par les canaux Orai1 et TRPC3. Il est connu que l'entrée de calcium active la calcineurine qui déphosphoryle NFAT et lui permet d'agir comme facteur de transcription. De plus, il a déjà été reporté que AKAP79 (*A-kinase anchoring protein 79*), grâce à son interaction avec le côté N-terminal d'Orai1, la calcineurine et NFAT, forme un complexe de signalisation activant NFAT [633]. Même s'il n'est pas connu d'interaction entre AKAP79 et TRPC3, il est possible d'imaginer un lien entre TRPC3 et ce complexe de signalisation. Dans les CML-AP, nous pouvons supposer qu'il existe une boucle de régulation positive entre l'entrée de calcium par les canaux Orai1, la voie calcineurine/NFAT ou NFκB et l'expression d'Orai1. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse d'un lien entre TRPC3, la calcineurine, et l'expression d'Orai1. Cependant, la sous-expression de TRPC3 n'a pas eu d'effet sur l'expression d'Orai1. D'autres études plus approfondies sont donc nécessaires pour la compréhension de ces mécanismes.

En outre, nous montrons dans notre première étude que KCNK3, un canal potassique impliqué dans la physiopathologie de l'HTAP, peut réguler l'expression protéique, mais pas la transcription du canal Orai1. Cette action traductionnelle/post-traductionnelle est liée à l'expression de MEK1/2, NFAT et NFκB, leur inhibition diminuant l'augmentation produite par la déficience en KCNK3. Une étude plus approfondie permettrait de dévoiler les précisions sur ces mécanismes régulant Orai1. Il serait également intéressant d'étudier l'impact des gènes mutés dans l'HTAP sur les canaux SOC

Par ailleurs, il est également possible que d'autres mécanismes dysfonctionnels dans l'HTAP aient un rôle dans la régulation d'Orai1. La voie du NO, qui est diminuée dans l'HTAP, est capable d'aboutir à la production de GMPc et ainsi l'activation de la protéine kinase G (PKG). Il a déjà été montré que la PKG est capable de phosphoryler Orai1 au niveau de la Ser34 et ainsi activer la CDI (la mutation de ce site de phosphorylation empêche la CDI) [634,635]. Nous pouvons donc supposer que la diminution de la voie du NO-PKG dans l'HTAP induit une diminution de la phosphorylation d'Orai1 et ainsi modifie sa stabilité à la membrane dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP. De plus, il a été montré dans des cellules de cancer du sein que le collagène 1 est capable d'augmenter la présence d'Orai1 à la membrane par un mécanisme lié à ERK1/2 [636].

Il est donc possible que l'augmentation du collagène dans l'HTAP puisse provoquer l'augmentation d'Orai1 dans les CML-AP. Plusieurs études ont démontré une influence des ROS sur le SOCE, en agissant directement sur l'influx ou par un effet sur les réserves calciques du RE [637]. La production de ROS par les CML-AP de patients atteints d'HTAP pourrait donc réguler le SOCE. Même si nous n'avons pas retrouvé d'effet de siOrai1 sur la glycolyse ou la phosphorylation oxydative des CML-AP de patients HTAP, nous n'avons pas testé l'impact de ces ROS et de ce déséquilibre métabolique sur le SOCE. Le tester permettrait de savoir si cela influe sur l'augmentation du SOCE.

D'autre part, le SOCE peut être directement régulé par différentes protéines en ayant un effet sur la stabilité du complexe SOC, les jonctions membrane plasmique-RE ou l'insertion et recyclage des canaux à la membrane. Le rôle et l'implication de ces protéines liées à l'influx SOCE sont très peu étudiés dans le développement de l'HTAP. Parmi ces protéines, il a été décrit en 2019 une mutation biallélique du gène de CRACR2A chez un patient atteint d'HTAP. L'étude du rôle de CRACR2A est nécessaire afin de comprendre son implication et la pathogénicité de la mutation observée. De plus, Homer1 est augmentée dans la néointima d'artères carotides de rats après une blessure par ballonnet [638]. L'expression de  $\alpha$ -SNAP est également augmentée lors du développement de l'HTAP dans les poumons de rats exposés à la MCT [639]. Ces résultats suggèrent un potentiel rôle de ces protéines sur le SOCE, mais leur rôle est encore méconnu dans l'HTAP. Étudier l'expression et l'interaction entre le canal potassique SK3 et Orai1 en condition pathologique pourrait également permettre de trouver un mécanisme similaire à celui retrouvé dans des cellules cancéreuses (formation d'un complexe Orai1-SK3 provoquant l'augmentation du SOCE). Par ailleurs, nous n'avons pas mesuré la signature calcique des CML-AP après induction de l'apoptose par la staurosporine. Les oscillations calciques retrouvées dans des cellules cancéreuses, reliant Orai1 aux canaux SK2 et SK3 et à la protéine SigmaR1 pourraient être similaires dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP.

Il serait intéressant de comprendre pleinement l'origine de l'augmentation de ces canaux dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP. En effet, cela permettrait de mieux comprendre leur rôle dans le développement de l'HTAP et si leurs dérégulations est une résultante de la dysfonction d'autres voies de signalisation ou de protéines régulatrices comme CRACR2A. Connaître l'expression de ces régulateurs au cours du développement de l'HTAP, par exemple grâce aux modèles animaux, permettrait aussi d'apporter de nouveaux éléments afin de répondre à cette question.

### 1.3 Les autres isoformes d'Orai1 : Orai2 et Orai3

Lors de ma première étude, je n'ai pas constaté de différence d'expression d'Orai2 entre CML-AP des patients contrôles de patients atteints d'HTAP. Cependant, l'expression d'Orai3 est diminuée dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP. De ce fait, étudier l'origine de la diminution d'Orai3 pourrait permettre d'apporter de nouvelles informations mécanistiques. Dans des lignées cellulaires de cancer du sein, il a été retrouvé que l'hypoxie induit une augmentation de l'expression d'Orai3 via HIF-1 $\alpha$  [640]. La dérégulation d'HIF-1 $\alpha$  dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP pourrait donc être à l'origine de cette diminution d'expression.

Il a déjà été mis en évidence qu'une modification du ratio Orai1/Orai3 via la sous-expression de Orai3 par siARN pouvait induire une augmentation du SOCE [641]. Ainsi, la diminution de l'expression d'Orai3 dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP pourrait, d'une part diminuer la présence de canaux ARC/LRC à la membrane, mais aussi augmenter la disponibilité de canaux Orai1 à la membrane et ainsi contribuer à l'augmentation du SOCE. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP, notamment en étudiant l'interaction entre Orai1 et Orai3 ainsi que l'influx ARC/LRC.

### 1.4 Rôle du SOCE dans le phénotype pathologique des CML-AP de patients atteints d'HTAP

Lors de mes études, nous montrons que le canal Orai1 et les canaux TRPC contribuent à la dysfonction des CML-AP, à travers un effet sur la prolifération et migration excessive ainsi que la résistance à l'apoptose. Quelques études ont déjà révélé le rôle des canaux SOC dans ces fonctions cellulaires.

Nous montrons que le calcium entrant par Orai1 a notamment un rôle sur la prolifération à travers l'inhibiteur du cycle cellulaire P21 (réprimé dans l'HTAP), la phosphorylation de P38 ou le clivage de la Caspase 9. Il est retrouvé un effet similaire concernant P38 pour TRPC3 et TRPC4, et pour TRPC1 et TRPC6 concernant caspase 9. Nous montrons également que Orai1, TRPC1 et TRPC4 contribuent à la migration excessive des CML-AP de patients atteints d'HTAP. Il est probable que la contribution des canaux TRPC1 et TRPC4 à la migration s'effectue par le biais de canaux hétéromères TRPC1/C4, la sous expression des canaux TRPC3 et TRPC6 n'ayant pas d'effet sur la migration. De plus, il a été démontré que l'endothéline-1 favorise la migration des

CMLV à travers la paroi artérielle, et j'ai montré, parmi les canaux TRPC, qu'uniquement le canal TRPC1 est impliqué dans l'influx calcique provoqué par l'endothéline-1 [642]. Cela pourrait potentiellement expliquer le rôle de TRPC1 et TRPC4 sur la migration.

Ces fonctions cellulaires peuvent être régulées par l'activité de la calcineurine, dont l'activité est augmentée dans l'HTAP. Nous avons montré que Orai1 et TRPC3 peuvent contribuer à cette augmentation d'activité de la calcineurine. Outre ces protéines, dans plusieurs types cellulaires le SOCE peut également avoir un effet sur les protéines d'adhésion focale comme les *focal adhesion kinase* (FAK) et ainsi jouer sur la migration [643]. Nous montrons que l'inhibition d'Orai1 et des TRPC promeut l'apoptose des CML-AP de patients atteints d'HTAP, par une activation de la caspase 9, connu pour faciliter l'apoptose [644].

De plus, étudier les interactions entre les différents canaux permettrait de mieux comprendre le déclenchement des voies de signalisation provoquant ces effets sur les fonctions cellulaires. Par exemple, l'inhibition des canaux Orai1 et TRPC3 provoque une diminution de l'activité de la calcineurine, mais pas l'inhibition de TRPC1, TRPC4 ou TRPC6. Il est donc probable que les canaux Orai1 et TRPC3 soient retrouvés en interaction plus étroite ou soient présents dans des microdomaines provoquant l'activation de la calcineurine.

### 1.5 Rôle du SOCE dans vasoconstriction des AP de patients atteints d'HTAP

Lors de ces études, nous montrons également qu'Orai1 et TRPC3 contribuent à la contraction des AP contrôles induite par un mimétique du TXA2. Le TXA2 pulmonaire étant augmenté dans l'HTAP, le SOCE pourrait participer à la vasoconstriction excessive dans cette pathologie. En plus, de l'effet direct de l'entrée de calcium par le SOCE, l'activation de ces canaux peut également avoir des effets secondaires sur d'autres canaux, affectant ainsi la contraction. Dans les CMLV de souris, Orai1 et TRPC1 colocalisent avec Cav1.2, et le SOCE déclenché par la 5-HT conduit à l'activation du CCDV secondaire à l'entrée du SOCE, entraînant une augmentation massive de  $[Ca^{2+}]$  qui contribue à la contraction. Il est possible qu'un mécanisme similaire soit retrouvé dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP.

## 2 L'INHIBITION DU CANAL ORAI1 : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS L'HTAP ?

L'ensemble des résultats obtenus durant ma thèse apportent de nouvelles connaissances sur la dérégulation de l'homéostasie calcique observée dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP. Les études effectuées montrent que l'inhibition du canal Orai1 peut être considérée comme une cible thérapeutique contre l'HTAP.

### 2.1 Le SOCE dans les autres types cellulaires impliqués dans l'HTAP

Cependant, même si les avancées technologiques peuvent permettre de cibler plus spécifiquement les cellules concernées, il est important de connaître le rôle du SOCE dans les autres types cellulaires du lit vasculaire pulmonaire (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules immunitaires).

#### 2.1.1 Cellules endothéliales

Nous n'avons pas trouvé de modification du SOCE dans les CE-AP de patients HTAP durant notre première étude. Cependant, il est important de connaître l'effet de l'inhibition du SOCE sur les CE-AP, le SOCE pouvant réguler de nombreuses fonctions dérégulées dans l'HTAP. Cette régulation peut se faire via le contrôle de facteurs de transcription comme NFAT. Le SOCE peut ainsi réguler la prolifération, migration ou survie des CE.

Le calcium et le SOCE peuvent réguler l'activité de la eNOS. Dans les CE de veines ombilicales, il a été démontré que Orai1 et Orai2 participent à la régulation de la production du NO par la eNOS [645]. Il a également été montré que le NO, de manière autocrine, peut provoquer la diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  basal, mais peut aussi potentialiser le SOCE pour maintenir une production de NO [646,647]. Dans les CE aortique de bovins, l'inhibition de Orai1 ou TRPC1/C4/C6 n'a pas modifié l'activation de la eNOS [648]. Néanmoins, l'inhibition de TRPC3 a diminué l'activation de la eNOS induite par une stimulation à l'ATP. Il serait donc intéressant de s'intéresser à l'effet de l'inhibition du SOCE sur la production de NO des CE-AP dans l'HTAP.

De ce fait, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition d'Orai1 sur les mécanismes cellulaires dysfonctionnels (prolifération/apoptose, migration, capacité à former des tubes, productions de facteurs) dans l'HTAP. Cela pourrait être fait par analyse directe sur les CE-AP (mesure de l'ARN) ou de la sécrétion via une analyse du milieu de culture

*in vitro*, par méthode d'immunodosage. De plus, il pourrait être intéressant d'observer les effets de ces sécrétions sur la prolifération des CML-AP : soit par une méthode de co-culture, soit en transposant du milieu de CE en culture à des CML. Eddahibi *et al.* ont déjà démontré que les CML-AP exposées à un milieu de culture provenant de CE-AP de patients HTAP proliféraient plus vite que lorsque le milieu provenait de CE-AP des patients contrôles [217]. Il serait ainsi possible d'évaluer l'impact de l'inhibition des canaux Orai et TRPC sur le rôle paracrine des CE.

### 2.1.2 Fibroblastes

La fonction et l'impact pathophysiologique du SOCE sur les fibroblastes n'ont pas encore été étudiés dans l'HTAP. Orai1 et STIM1 sont des acteurs majeurs du SOCE dans différentes souches de fibroblastes [488,535–537]. Le SOCE a été décrit comme régulant le métabolisme lipidique des fibroblastes. En effet, Maus *et al.* ont décrit une augmentation des gouttelettes lipidiques dans les fibroblastes de patients avec une mutation perte de fonction Orai1 ou STIM1. De plus, dans les fibroblastes pulmonaires, la régulation du calcium intracellulaire est importante pour le contrôle de la prolifération, production de protéines du remodelage matriciel ou encore différenciation en myofibroblastes [652]. Ainsi, l'inhibition du SOCE pourrait éventuellement modifier le remodelage vasculaire et la rigidité des artères. Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition du SOCE sur les fibroblastes isolés d'AP humaines. Par ailleurs, il pourrait être intéressant d'analyser l'expression/activité des enzymes protéolytiques et leurs inhibiteurs endogènes dérégulés dans les modèles animaux d'HTAP, avec ou sans inhibition du canal Orai1.

### 2.1.3 Cellules immunitaires

Actuellement, aucune étude ne décrit le rôle du SOCE sur les cellules immunitaires de patients atteints d'HTAP. Les signaux  $Ca^{2+}$  et notamment l'influx SOC sont des régulateurs essentiels de l'immunité contre l'infection, l'inflammation et l'auto-immunité [653,654]. Il a déjà été démontré que le SOCE peut réguler la prolifération des lymphocytes B et T [655]. De plus, il est aussi impliqué dans la production de différentes cytokines et du TNF- $\alpha$  [656]. L'inhibition du SOCE pourrait permettre de réduire l'inflammation et la production de cytokines pro-inflammatoires. En outre, il a déjà été décrit que l'inhibition d'Orai1 permettrait d'atténuer les réponses inflammatoires, et ainsi prévenir l'auto-immunité, sans pour autant obtenir une immunosuppression totale ou excessive prédisposant aux infections [657]. Cependant,

le rôle complexe des différents types cellulaires reste encore à étudier, surtout dans la pathophysiologie de l'HTAP.

Dans des CE de veines ombilicales humaines, il est observé que la surexpression d'Orai1 augmente l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) induite par le TNF- $\alpha$  [658]. À l'inverse, l'inhibition d'Orai1 diminue l'expression de ces molécules. L'expression de ces molécules d'adhésion est accrue dans l'endothélium pulmonaire. Inhiber le SOCE dans l'endothélium pourrait donc conduire à une diminution des molécules d'adhésion permettant aux cellules immunitaires de s'attacher et migrer dans le tissu pulmonaire, limitant potentiellement le phénomène inflammatoire dans l'HTAP. En outre, Orai1 régule l'expression et la sécrétion d'IL-6 dans différents types cellulaires (cellules du cancer du col de l'utérus, cellules glomérulaires mésangiales, cellules T du côlon humain) [659]. L'inhibition du SOCE pourrait ainsi permettre une potentielle diminution de l'expression d'IL-6 dans les CE-AP. Cela pourrait être effectué sur les CE-AP humaines, mais aussi dans les AP des modèles animaux, avec ou sans inhibition d'Orai1. En plus de ces protéines, s'intéresser à la production de cytokines et chimiokines permettrait de connaître également le rôle d'Orai1 sur l'inflammation. Une première analyse pourrait être de quantifier les cellules immunitaires au sein du poumon et des AP, dans les modèles animaux traités ou non avec un inhibiteur d'Orai, par exemple par immunomarquage.

#### 2.1.4 Cardiomyocytes

Au niveau cardiaque, le SOCE est également présent dans les cardiomyocytes. Au vu du manque d'études sur l'implication des canaux SOC dans l'hypertrophie du VD, il serait intéressant d'étudier l'effet d'une inhibition du SOCE sur le cœur. Cette étude pourrait être menée grâce au modèle de cerclage de l'AP, chez le rat, afin d'étudier l'adaptation du VD sans prendre en compte le remodelage vasculaire. De plus, une analyse plus fine en isolant des cardiomyocytes, en condition pathologique, pourrait permettre une meilleure compréhension du SOCE et de l'effet de l'inhibition d'Orai1.

#### 2.1.5 Autres types cellulaires

Il a également été montré que le SOCE peut réguler la libération de TXA2 dans les plaquettes humaines [660]. L'inhibition du SOCE pourrait donc avoir un rôle bénéfique sur la production de TXA2. Cela pourrait être testé par analyse du sérum des modèles animaux traités ou non avec un inhibiteur d'Orai.

Le SOCE est également un régulateur majeur du  $[Ca^{2+}]_i$  des péricytes, pouvant ainsi probablement réguler leur prolifération [661,662].

## 2.2 L'inhibition du canal Orai1 dans l'HTAP : vers un futur traitement ?

Les résultats que nous avons obtenus démontrent l'intérêt thérapeutique du canal Orai1. Cependant, la plupart des inhibiteurs actuellement disponibles ne sont pas assez sélectifs ou alors ont une demi-vie trop courte pour une utilisation en clinique.

Les études réalisées ont également mis en évidence le potentiel thérapeutique des canaux TRPC. Cependant, la pharmacologie de ces canaux n'est pas aussi développée que celle pour Orai1 et les essais cliniques menés restent limités. De plus, inhiber l'ensemble des acteurs du SOCE représente éventuellement une solution trop drastique et risquerait de déclencher des effets secondaires.

Actuellement, la société américaine CalciMedica (<https://calcimedica.com/>) dispose d'un inhibiteur du canal Orai1 qui fait l'objet d'essai clinique en utilisant une formulation intraveineuse. Ils ont également développé un dérivé de cet inhibiteur, avec une formulation orale plus adaptée à la recherche préclinique et plus adaptée pour les études cliniques, le CM5480. Cet inhibiteur sélectif d'Orai1 a démontré qu'il pouvait efficacement inhiber le canal afin de prévenir la progression de la pancréatite chronique [663]. Nous sommes actuellement en collaboration avec CalciMedica afin de tester le CM5480 dans un modèle d'HTAP chez le rat. Confirmer les résultats obtenus avec le BTP2, le JP111 ou le 5J4 permettrait de démontrer que cet inhibiteur pourrait être testé chez les patients atteints d'HTAP.

Il serait également intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition d'Orai1 sur d'autres modèles d'HTAP. Les patients atteints de MVOP, une forme rare d'HTAP caractérisée par l'obstruction des petites veines pulmonaires, n'ont actuellement pas accès à une thérapie et la seule option curative est la transplantation pulmonaire. Les lésions pathologiques de cette maladie sont les lésions veinulaires, caractérisées par une fibrose intimale, mais aussi une atteinte capillaire (prolifération excessive des CE) ainsi qu'une atteinte artérielle avec une hypertrophie médiale. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de l'inhibition d'Orai1 sur cette pathologie, de façon à atténuer les lésions artérielles et potentiellement les lésions veinulaires et capillaires. Cela pourrait être effectué grâce au modèle mitomycine C développé au sein du laboratoire, qui induit un remodelage des petites veines associé à des foyers de prolifération des CE du lit capillaire [664].

De la même manière, la fibrose pulmonaire est une pathologie, souvent idiopathique, caractérisée par une fibrose progressive pouvant conduire à une insuffisance respiratoire et une issue fatale. Cette fibrose pulmonaire peut mener à une HTAP de groupe 3. Il serait donc intéressant d'analyser l'effet de l'inhibition d'Orai1 dans un modèle d'HTAP secondaire à la fibrose pulmonaire. Pour cela, le modèle bléomycine pourrait être utilisé, car il est connu pour induire une fibrose pulmonaire, un remodelage parenchymateux et artériel pulmonaire, associé à une hypertrophie du VD chez le rat [665].

Mon projet de thèse comprenait également une partie sur l'étude *in vivo* du rôle d'Orai1 dans la pathophysiologie de l'HTAP grâce à la génération de rats avec une déficience inductible pour Orai1. Grâce à la technique de recombinaison Cre-LoxP, la délétion d'Orai1 peut être déclenchée par le tamoxifène, évitant ainsi l'implication dans le développement embryonnaire [666]. De plus, cela permet de ne cibler qu'uniquement les cellules exprimant l'*actin alpha 2* (ACTA2), une protéine seulement retrouvée dans les CML. Néanmoins, la pandémie de Covid-19 ainsi que le déménagement de l'animalerie utilisée par le laboratoire nous a contraint à retarder le projet, je n'ai donc pas eu la possibilité de les utiliser. L'étude de ce modèle de rat permettrait d'apporter des précisions sur l'implication d'Orai1 dans la pathophysiologie de l'HTAP, spécifiquement sur son importance dans les CML-AP en condition saine ou pathologique.

Les deux études présentées dans ma thèse nous permettent de considérer l'inhibition du canal Orai1 comme un outil thérapeutique potentiel pour le traitement de l'HTAP. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires afin d'envisager une inhibition d'Orai1 comme traitement de l'HTAP et apporter une meilleure compréhension du SOCE et de sa fonction globale dans la pathogenèse de l'HTAP.

# CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des travaux menés au cours de ma thèse a contribué à l'avancement de la compréhension du rôle et l'implication des canaux SOC dans la physiopathologie de l'HTAP. L'HTAP est une maladie rare et sévère. Lors de cette pathologie, le remodelage obstructif des AP de petits calibres provoque l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires conduisant à une insuffisance ventriculaire droite. L'obstruction de ces artères pulmonaires est multifactorielle, associée à la dérégulation des médiateurs vasoactifs sécrétés par les CE induisant une vasoconstriction excessive, la dérégulation de la balance prolifération/apoptose des CML ainsi qu'une inflammation et une activation des fibroblastes. À l'heure actuelle, les traitements de l'HTAP ciblent principalement la dysfonction endothéliale et ne sont pas suffisants. Mes travaux de thèse ont mis en évidence l'intérêt thérapeutique des canaux SOC afin de corriger la dysfonction des CML-AP.

Effectivement, j'ai montré que le SOCE est augmenté dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP, associé à une augmentation de l'expression d'Orai1, TRPC3 et TRPC6. Ces canaux calciques, qui sont tous impliqués dans le SOCE, régulent la balance prolifération/apoptose des CML-AP. Orai1 régule également, avec TRPC1 et TRPC4, la migration de ces cellules. *In vivo*, nos travaux réalisés sur différents modèles d'HTAP ont mis en avant l'implication d'Orai1 et TRPC3 dans le remodelage vasculaire pulmonaire. En condition HTAP, l'inhibition pharmacologique de ces canaux, et ainsi du SOCE, a réduit ce remodelage, conduisant à une amélioration des paramètres hémodynamiques associée à un bénéfice sur l'hypertrophie du VD.

L'ensemble de ces travaux démontre l'importance de rééquilibrer l'homéostasie calcique et le SOCE dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP. Ils démontrent également qu'Orai1 ainsi que les canaux TRPC peuvent être considérés comme de potentielles cibles pour une thérapie innovante ciblant principalement les dysfonctions des CML-AP.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Cherif, P.D. D'Ibn Nafis à William Harvey. **2016**.
2. Pugsley, M.K.; Tabrizchi, R. The Vascular System: An Overview of Structure and Function. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2000**, *44*, 333–340, doi:10.1016/S1056-8719(00)00125-8.
3. Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* **1980**, *288*, 373–376, doi:10.1038/288373a0.
4. Vanhoutte, P.M.; Shimokawa, H.; Feletou, M.; Tang, E.H.C. Endothelial Dysfunction and Vascular Disease - a 30th Anniversary Update. *Acta Physiol* **2017**, *219*, 22–96, doi:10.1111/apha.12646.
5. Hahn, C.; Schwartz, M.A. Mechanotransduction in Vascular Physiology and Atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2009**, *10*, 53–62, doi:10.1038/nrm2596.
6. Clark, J.M.; Glagov, S. Transmural Organization of the Arterial Media. The Lamellar Unit Revisited. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.* **1985**, *5*, 19–34, doi:10.1161/01.ATV.5.1.19.
7. Smooth Muscle | Anatomy and Physiology I Available online: <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap1/chapter/smooth-muscle/> (accessed on 19 July 2023).
8. Majesky, M.W.; Dong, X.R.; Hoglund, V.; Daum, G.; Mahoney, W.M. The Adventitia: A Progenitor Cell Niche for the Vessel Wall. *Cells Tissues Organs* **2011**, *195*, 73–81, doi:10.1159/000331413.
9. Maiellaro, K.; Taylor, W.R. The Role of the Adventitia in Vascular Inflammation. *Cardiovascular Research* **2007**, *75*, 640–648, doi:10.1016/j.cardiores.2007.06.023.
10. Silver, F.H.; Horvath, I.; Foran, D.J. Viscoelasticity of the Vessel Wall: The Role of Collagen and Elastic Fibers. *Crit Rev Biomed Eng* **2001**, *29*, 279–302, doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v29.i3.10.
11. Mulligan-Kehoe, M.J. The Vasa Vasorum in Diseased and Nondiseased Arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2010**, *298*, H295-305, doi:10.1152/ajpheart.00884.2009.
12. Stenmark, K.R.; Yeager, M.E.; El Kasmi, K.C.; Nozik-Grayck, E.; Gerasimovskaya, E.V.; Li, M.; Riddle, S.R.; Frid, M.G. The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu Rev Physiol* **2013**, *75*, 23–47, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183802.
13. Humbert, M.; Kovacs, G.; Hoeper, M.M.; Badagliacca, R.; Berger, R.M.F.; Brida, M.; Carlsen, J.; Coats, A.J.S.; Escribano-Subias, P.; Ferrari, P.; et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: Developed by the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS). Endorsed by the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) and the European Reference Network on Rare Respiratory Diseases (ERN-LUNG). *European Heart Journal* **2022**, *43*, 3618–3731, doi:10.1093/eurheartj/ehac237.
14. Soubrier, F.; Chung, W.K.; Machado, R.; Gr, ünig E.; Aldred, M.; Geraci, M.; Loyd, J.E.; Elliott, C.G.; Trembath, R.C.; Newman, J.H.; et al. Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **2013**, *62*, D13–D21, doi:10.1016/j.jacc.2013.10.035.
15. Aldred, M.A.; Morrell, N.W.; Guignabert, C. New Mutations and Pathogenesis of Pulmonary Hypertension: Progress and Puzzles in Disease Pathogenesis. *Circulation Research* **2022**, *130*, 1365–1381, doi:10.1161/CIRCRESAHA.122.320084.

16. Larkin, E.K.; Newman, J.H.; Austin, E.D.; Hemnes, A.R.; Wheeler, L.; Robbins, I.M.; West, J.D.; Phillips, J.A.; Hamid, R.; Loyd, J.E. Longitudinal Analysis Casts Doubt on the Presence of Genetic Anticipation in Heritable Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2012**, *186*, 892–896, doi:10.1164/rccm.201205-0886OC.
17. Bohnen, M.S.; Ma, L.; Zhu, N.; Qi, H.; McClenaghan, C.; Gonzaga-Jauregui, C.; Dewey, F.E.; Overton, J.D.; Reid, J.G.; Shuldiner, A.R.; et al. Loss-of-Function ABCC8 Mutations in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Genom Precis Med* **2018**, *11*, e002087, doi:10.1161/CIRCGEN.118.002087.
18. Cooper, P.E.; Reutter, H.; Woelfle, J.; Engels, H.; Grange, D.K.; van Haaften, G.; van Bon, B.W.; Hoischen, A.; Nichols, C.G. Cantú Syndrome Resulting from Activating Mutation in the KCNJ8 Gene. *Hum Mutat* **2014**, *35*, 809–813, doi:10.1002/humu.22555.
19. Chida, A.; Shintani, M.; Yagi, H.; Fujiwara, M.; Kojima, Y.; Sato, H.; Imamura, S.; Yokozawa, M.; Onodera, N.; Horigome, H.; et al. Outcomes of Childhood Pulmonary Arterial Hypertension in BMPR2 and ALK1 Mutation Carriers. *Am J Cardiol* **2012**, *110*, 586–593, doi:10.1016/j.amjcard.2012.04.035.
20. Gräf, S.; Haimel, M.; Bleda, M.; Hadinnapola, C.; Southgate, L.; Li, W.; Hodgson, J.; Liu, B.; Salmon, R.M.; Southwood, M.; et al. Identification of Rare Sequence Variation Underlying Heritable Pulmonary Arterial Hypertension. *Nat Commun* **2018**, *9*, 1416, doi:10.1038/s41467-018-03672-4.
21. Machado, R.D.; Welch, C.L.; Haimel, M.; Bleda, M.; Colglazier, E.; Coulson, J.D.; Debeljak, M.; Ekstein, J.; Fineman, J.R.; Golden, W.C.; et al. Biallelic Variants of ATP13A3 Cause Dose-Dependent Childhood-Onset Pulmonary Arterial Hypertension Characterised by Extreme Morbidity and Mortality. *J Med Genet* **2022**, *59*, 906–911, doi:10.1136/jmedgenet-2021-107831.
22. Barozzi, C.; Galletti, M.; Tomasi, L.; De Fanti, S.; Palazzini, M.; Manes, A.; Sazzini, M.; Galiè, N. A Combined Targeted and Whole Exome Sequencing Approach Identified Novel Candidate Genes Involved in Heritable Pulmonary Arterial Hypertension. *Sci Rep* **2019**, *9*, 753, doi:10.1038/s41598-018-37277-0.
23. Eyries, M.; Montani, D.; Nadaud, S.; Girerd, B.; Levy, M.; Bourdin, A.; Trésorier, R.; Chaouat, A.; Cottin, V.; Sanfiorenzo, C.; et al. Widening the Landscape of Heritable Pulmonary Hypertension Mutations in Paediatric and Adult Cases. *European Respiratory Journal* **2019**, *53*, doi:10.1183/13993003.01371-2018.
24. International PPH Consortium; Lane, K.B.; Machado, R.D.; Pauciulo, M.W.; Thomson, J.R.; Phillips, J.A.; Loyd, J.E.; Nichols, W.C.; Trembath, R.C. Heterozygous Germline Mutations in BMPR2, Encoding a TGF-Beta Receptor, Cause Familial Primary Pulmonary Hypertension. *Nat Genet* **2000**, *26*, 81–84, doi:10.1038/79226.
25. Garg, A.; Kircher, M.; Del Campo, M.; Amato, R.S.; Agarwal, A.K.; University of Washington Center for Mendelian Genomics Whole Exome Sequencing Identifies de Novo Heterozygous CAV1 Mutations Associated with a Novel Neonatal Onset Lipodystrophy Syndrome. *Am J Med Genet A* **2015**, *167A*, 1796–1806, doi:10.1002/ajmg.a.37115.
26. Eyries, M.; Montani, D.; Girerd, B.; Perret, C.; Leroy, A.; Lonjou, C.; Chelghoum, N.; Coulet, F.; Bonnet, D.; Dorfmueller, P.; et al. EIF2AK4 Mutations Cause Pulmonary Venous Occlusive Disease, a Recessive Form of Pulmonary Hypertension. *Nat Genet* **2014**, *46*, 65–69, doi:10.1038/ng.2844.
27. Kurdyukov, S.; Eccles, C.A.; Desai, A.A.; Gonzalez-Garay, M.; Yuan, J.X.-J.; Garcia, J.G.N.; Rafikova, O.; Rafikov, R. New Cases of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS One* **2018**, *13*, e0203493, doi:10.1371/journal.pone.0203493.
28. Zhu, N.; Pauciulo, M.W.; Welch, C.L.; Lutz, K.A.; Coleman, A.W.; Gonzaga-Jauregui,

- C.; Wang, J.; Grimes, J.M.; Martin, L.J.; He, H.; et al. Novel Risk Genes and Mechanisms Implicated by Exome Sequencing of 2572 Individuals with Pulmonary Arterial Hypertension. *Genome Medicine* **2019**, *11*, 69, doi:10.1186/s13073-019-0685-z.
29. Vera-Zambrano, A.; Lago-Docampo, M.; Gallego, N.; Franco-Gonzalez, J.F.; Morales-Cano, D.; Cruz-Utrilla, A.; Villegas-Esguevillas, M.; Fernández-Malavé, E.; Escribano-Subías, P.; Tenorio-Castaño, J.A.; et al. Novel Loss of Function KCNA5 Variants in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2023**, doi:10.1165/rcmb.2022-0245OC.
  30. Ma, L.; Roman-Campos, D.; Austin, E.D.; Eyries, M.; Sampson, K.S.; Soubrier, F.; Germain, M.; Tréguët, D.-A.; Borczuk, A.; Rosenzweig, E.B.; et al. A Novel Channelopathy in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **2013**, *369*, 351–361, doi:10.1056/NEJMoa1211097.
  31. Swietlik, E.M.; Greene, D.; Zhu, N.; Megy, K.; Cogliano, M.; Rajaram, S.; Pandya, D.; Tilly, T.; Lutz, K.A.; Welch, C.C.L.; et al. Bayesian Inference Associates Rare KDR Variants with Specific Phenotypes in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Genom Precis Med* **2020**, *14*, e003155, doi:10.1161/CIRCGEN.120.003155.
  32. Nasim, M.T.; Ogo, T.; Ahmed, M.; Randall, R.; Chowdhury, H.M.; Snape, K.M.; Bradshaw, T.Y.; Southgate, L.; Lee, G.J.; Jackson, I.; et al. Molecular Genetic Characterization of SMAD Signaling Molecules in Pulmonary Arterial Hypertension. *Hum Mutat* **2011**, *32*, 1385–1389, doi:10.1002/humu.21605.
  33. Kerstjens-Frederikse, W.S.; Bongers, E.M.H.F.; Roofthoof, M.T.R.; Leter, E.M.; Douwes, J.M.; Van Dijk, A.; Vonk-Noordegraaf, A.; Dijk-Bos, K.K.; Hoefsloot, L.H.; Hoendermis, E.S.; et al. TBX4 Mutations (Small Patella Syndrome) Are Associated with Childhood-Onset Pulmonary Arterial Hypertension. *J Med Genet* **2013**, *50*, 500–506, doi:10.1136/jmedgenet-2012-101152.
  34. Coghlan, J.G.; Denton, C.P.; Grünig, E.; Bonderman, D.; Distler, O.; Khanna, D.; Müller-Ladner, U.; Pope, J.E.; Vonk, M.C.; Doelberg, M.; et al. Evidence-Based Detection of Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis: The DETECT Study. *Ann Rheum Dis* **2014**, *73*, 1340–1349, doi:10.1136/annrheumdis-2013-203301.
  35. Immunosuppressive Therapy in Lupus- and Mixed Connective Tissue Disease–Associated Pulmonary Arterial Hypertension: A Retrospective Analysis of Twenty-three Cases., doi:10.1002/art.23303.
  36. Hachulla, E.; Jais, X.; Cinquetti, G.; Clerson, P.; Rottat, L.; Launay, D.; Cottin, V.; Habib, G.; Prevot, G.; Chabanne, C.; et al. Pulmonary Arterial Hypertension Associated With Systemic Lupus Erythematosus: Results From the French Pulmonary Hypertension Registry. *Chest* **2018**, *153*, 143–151, doi:10.1016/j.chest.2017.08.014.
  37. Sanges, S.; Yelnik, C.M.; Sitbon, O.; Benveniste, O.; Mariampillai, K.; Phillips-Houlbracq, M.; Pison, C.; Deligny, C.; Inamo, J.; Cottin, V.; et al. Pulmonary Arterial Hypertension in Idiopathic Inflammatory Myopathies: Data from the French Pulmonary Hypertension Registry and Review of the Literature. *Medicine (Baltimore)* **2016**, *95*, e4911, doi:10.1097/MD.0000000000004911.
  38. Wang, J.; Li, M.; Wang, Q.; Zhang, X.; Qian, J.; Zhao, J.; Xu, D.; Tian, Z.; Wei, W.; Zuo, X.; et al. Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Primary Sjögren’s Syndrome: A Multicentre Cohort Study from China. *Eur Respir J* **2020**, *56*, 1902157, doi:10.1183/13993003.02157-2019.
  39. Lapa, M.; Dias, B.; Jardim, C.; Fernandes, C.J.C.; Dourado, P.M.M.; Figueiredo, M.; Farias, A.; Tsutsui, J.; Terra-Filho, M.; Humbert, M.; et al. Cardiopulmonary Manifestations of Hepatosplenic Schistosomiasis. *Circulation* **2009**, *119*, 1518–1523, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.803221.
  40. Thomas, C.; Glinskii, V.; de Jesus Perez, V.; Sahay, S. Portopulmonary Hypertension:

- From Bench to Bedside. *Frontiers in Medicine* **2020**, *7*.
41. Brida, M.; Gatzoulis, M.A. Pulmonary Arterial Hypertension in Adult Congenital Heart Disease. *Heart* **2018**, *104*, 1568–1574, doi:10.1136/heartjnl-2017-312106.
  42. Montani, D.; Dorfmüller, P.; Maitre, S.; Jaïs, X.; Sitbon, O.; Simonneau, G.; Humbert, M. Maladie veino-occlusive et hémangiomasose capillaire pulmonaire. *La Presse Médicale* **2010**, *39*, 134–143, doi:10.1016/j.lpm.2009.09.013.
  43. Montani, D.; Girerd, B.; Jaïs, X.; Levy, M.; Amar, D.; Savale, L.; Dorfmüller, P.; Seferian, A.; Lau, E.M.; Eyries, M.; et al. Clinical Phenotypes and Outcomes of Heritable and Sporadic Pulmonary Venous-Occlusive Disease: A Population-Based Study. *The Lancet Respiratory Medicine* **2017**, *5*, 125–134, doi:10.1016/S2213-2600(16)30438-6.
  44. Lakshminrusimha, S.; Keszler, M. Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *Neoreviews* **2015**, *16*, e680–e692, doi:10.1542/neo.16-12-e680.
  45. Leber, L.; Beaudet, A.; Müller, A. Epidemiology of Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Identification of the Most Accurate Estimates from a Systematic Literature Review. *Pulmonary Circulation* **2021**, *11*, 2045894020977300, doi:10.1177/2045894020977300.
  46. Anderson, J.J.; Lau, E.M. Pulmonary Hypertension Definition, Classification, and Epidemiology in Asia. *JACC: Asia* **2022**, *2*, 538–546, doi:10.1016/j.jacasi.2022.04.008.
  47. Rich, S.; Dantzker, D.R.; Ayres, S.M.; Bergofsky, E.H.; Brundage, B.H.; Detre, K.M.; Fishman, A.P.; Goldring, R.M.; Groves, B.M.; Koerner, S.K. Primary Pulmonary Hypertension. A National Prospective Study. *Ann Intern Med* **1987**, *107*, 216–223, doi:10.7326/0003-4819-107-2-216.
  48. Boucly, A.; Savale, L.; Jaïs, X.; Bauer, F.; Bergot, E.; Bertoletti, L.; Beurnier, A.; Bourdin, A.; Bouvaist, H.; Bulifon, S.; et al. Association between Initial Treatment Strategy and Long-Term Survival in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2021**, *204*, 842–854, doi:10.1164/rccm.202009-3698OC.
  49. Hoepfer, M.M.; Pausch, C.; Olsson, K.M.; Huscher, D.; Pittrow, D.; Grünig, E.; Staehler, G.; Vizza, C.D.; Gall, H.; Distler, O.; et al. COMPERA 2.0: A Refined Four-Stratum Risk Assessment Model for Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* **2022**, *60*, doi:10.1183/13993003.02311-2021.
  50. Hoepfer, M.M.; Huscher, D.; Ghofrani, H.A.; Delcroix, M.; Distler, O.; Schweiger, C.; Grünig, E.; Staehler, G.; Rosenkranz, S.; Halank, M.; et al. Elderly Patients Diagnosed with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension: Results from the COMPERA Registry. *Int J Cardiol* **2013**, *168*, 871–880, doi:10.1016/j.ijcard.2012.10.026.
  51. Girerd, B.; Weatherald, J.; Montani, D.; Humbert, M. Heritable Pulmonary Hypertension: From Bench to Bedside. *European Respiratory Review* **2017**, *26*, doi:10.1183/16000617.0037-2017.
  52. Humbert, M.; Sitbon, O.; Chaouat, A.; Bertocchi, M.; Habib, G.; Gressin, V.; Yaïci, A.; Weitzenblum, E.; Cordier, J.-F.; Chabot, F.; et al. Survival in Patients with Idiopathic, Familial, and Anorexigen-Associated Pulmonary Arterial Hypertension in the Modern Management Era. *Circulation* **2010**, *122*, 156–163, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.911818.
  53. Cheron, C.; McBride, S.A.; Antigny, F.; Girerd, B.; Chouchana, M.; Chaumais, M.-C.; Jaïs, X.; Bertoletti, L.; Sitbon, O.; Weatherald, J.; et al. Sex and Gender in Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Review* **2021**, *30*, doi:10.1183/16000617.0330-2020.
  54. Zelt, J.G.E.; Weatherald, J. Mortality Trends in Pulmonary Arterial Hypertension: Are We Just Spinning Our Wheels? *Pulmonary Circulation* **2022**, *12*, e12162, doi:10.1002/pul2.12162.
  55. Hendriks, P.M.; Staal, D.P.; van de Groep, L.D.; van den Toorn, L.M.; Chandoesing, P.P.;

- Kauling, R.M.; Mager, H.-J.; van den Bosch, A.E.; Post, M.C.; Boomars, K.A. The Evolution of Survival of Pulmonary Arterial Hypertension over 15 Years. *Pulmonary Circulation* **2022**, *12*, e12137, doi:10.1002/pul2.12137.
56. Barst, R.J.; McGoon, M.; Torbicki, A.; Sitbon, O.; Krowka, M.J.; Olschewski, H.; Gaine, S. Diagnosis and Differential Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **2004**, *43*, S40–S47, doi:10.1016/j.jacc.2004.02.032.
  57. Warwick, G.; Thomas, P.S.; Yates, D.H. Biomarkers in Pulmonary Hypertension. *Eur Respir J* **2008**, *32*, 503–512, doi:10.1183/09031936.00160307.
  58. Humbert, M.; Guignabert, C.; Bonnet, S.; Dorfmueller, P.; Klinger, J.R.; Nicolls, M.R.; Olschewski, A.J.; Pullamsetti, S.S.; Schermuly, R.T.; Stenmark, K.R.; et al. Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension: State of the Art and Research Perspectives. *European Respiratory Journal* **2019**, *53*, doi:10.1183/13993003.01887-2018.
  59. Montani, D.; Günther, S.; Dorfmueller, P.; Perros, F.; Girerd, B.; Garcia, G.; Jaïs, X.; Savale, L.; Artaud-Macari, E.; Price, L.C.; et al. Pulmonary Arterial Hypertension. *Orphanet J Rare Dis* **2013**, *8*, 97, doi:10.1186/1750-1172-8-97.
  60. Tuder, R.M.; Chacon, M.; Alger, L.; Wang, J.; Taraseviciene-Stewart, L.; Kasahara, Y.; Cool, C.D.; Bishop, A.E.; Geraci, M.; Semenza, G.L.; et al. Expression of Angiogenesis-Related Molecules in Plexiform Lesions in Severe Pulmonary Hypertension: Evidence for a Process of Disordered Angiogenesis. *J Pathol* **2001**, *195*, 367–374, doi:10.1002/path.953.
  61. Pietra, G.G.; Capron, F.; Stewart, S.; Leone, O.; Humbert, M.; Robbins, I.M.; Reid, L.M.; Tuder, R.M. Pathologic Assessment of Vasculopathies in Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **2004**, *43*, S25–S32, doi:10.1016/j.jacc.2004.02.033.
  62. Kay, J.M.; Harris, P.; Heath, D. Pulmonary Hypertension Produced in Rats by Ingestion of *Crotalaria Spectabilis* Seeds. *Thorax* **1967**, *22*, 176–179.
  63. Molteni, A.; Ward, W.F.; Ts'ao, C.H.; Solliday, N.H. Monocrotaline Pneumotoxicity in Mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **1989**, *57*, 149–155, doi:10.1007/BF02899076.
  64. Czer, G.T.; Marsh, J.; Konopka, R.; Moser, K.M. Low-Dose PGI<sub>2</sub> Prevents Monocrotaline-Induced Thromboxane Production and Lung Injury. *Journal of Applied Physiology* **1986**, *60*, 464–471, doi:10.1152/jappl.1986.60.2.464.
  65. Chesney, C.F.; Allen, J.R. Endocardial Fibrosis Associated with Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Nonhuman Primates (*Macaca Arctoides*). *Am J Vet Res* **1973**, *34*, 1577–1581.
  66. Gomez-Arroyo, J.G.; Farkas, L.; Alhussaini, A.A.; Farkas, D.; Kraskauskas, D.; Voelkel, N.F.; Bogaard, H.J. The Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension in Perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2012**, *302*, L363-369, doi:10.1152/ajplung.00212.2011.
  67. Kolettis, T.; Vlahos, A.P.; Louka, M.; Hatzistergos, K.E.; Baltogiannis, G.G.; Agelaki, M.M.; Mitsi, A.; Malamou-Mitsi, V. Characterisation of a Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *Hellenic J Cardiol* **2007**, *48*, 206–210.
  68. Dahal, B.K.; Kosanovic, D.; Kaulen, C.; Cornitescu, T.; Savai, R.; Hoffmann, J.; Reiss, I.; Ghofrani, H.A.; Weissmann, N.; Kuebler, W.M.; et al. Involvement of Mast Cells in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Respir Res* **2011**, *12*, 60, doi:10.1186/1465-9921-12-60.
  69. Henriques-Coelho, T.; Oliveira, S.M.; Moura, R.S.; Roncon-Albuquerque, R.; Neves, A.L.; Santos, M.; Nogueira-Silva, C.; La Fuente Carvalho, F.; Brandão-Nogueira, A.; Correia-Pinto, J.; et al. Thymulin Inhibits Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension Modulating Interleukin-6 Expression and Suppressing P38 Pathway.

- Endocrinology* **2008**, *149*, 4367–4373, doi:10.1210/en.2008-0018.
70. Shah, M.; Patel, K.; Sehgal, P.B. Monocrotaline Pyrrole-Induced Endothelial Cell Megalocytosis Involves a Golgi Blockade Mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* **2005**, *288*, C850-862, doi:10.1152/ajpcell.00327.2004.
  71. Roth, R.A.; Dotzlaf, L.A.; Baranyi, B.; Kuo, C.H.; Hook, J.B. Effect of Monocrotaline Ingestion on Liver, Kidney, and Lung of Rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **1981**, *60*, 193–203, doi:10.1016/0041-008x(91)90223-2.
  72. Maarman, G.; Lecour, S.; Butrous, G.; Thienemann, F.; Sliwa, K. A Comprehensive Review: The Evolution of Animal Models in Pulmonary Hypertension Research; Are We There Yet? *Pulm Circ* **2013**, *3*, 739–756, doi:10.1086/674770.
  73. Heath, D.; Castillo, Y.; Arias-Stella, J.; Harris, P. The Small Pulmonary Arteries of the Llama and Other Domestic Animals Native to High Altitudes. *Cardiovascular Research* **1969**, *3*, 75–78, doi:10.1093/cvr/3.1.75.
  74. Wagenvoort, C.A.; Wagenvoort, N.; Vogel, J.H. The Pulmonary Vasculature in Cattle at an Altitude of 1,600 Metres with and without One-Sided Pulmonary Arterial Ligation. *J Comp Pathol* **1969**, *79*, 517–523, doi:10.1016/0021-9975(69)90072-3.
  75. Naeye, R.L. Polycythemia and Hypoxia. Individual Effects on Heart and Pulmonary Arteries. *Am J Pathol* **1967**, *50*, 1027–1033.
  76. Voelkel, N.F.; Tuder, R.M. Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling: A Model for What Human Disease? *J Clin Invest* **2000**, *106*, 733–738.
  77. Meyrick, B.O.; Perrett, E.A. The Sequence of Cellular and Hemodynamic Changes of Chronic Pulmonary Hypertension Induced by Hypoxia and Other Stimuli. *Am Rev Respir Dis* **1989**, *140*, 1486–1489, doi:10.1164/ajrccm/140.5.1486.
  78. Burke, D.L.; Frid, M.G.; Kunrath, C.L.; Karoor, V.; Anwar, A.; Wagner, B.D.; Strassheim, D.; Stenmark, K.R. Sustained Hypoxia Promotes the Development of a Pulmonary Artery-Specific Chronic Inflammatory Microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2009**, *297*, L238-250, doi:10.1152/ajplung.90591.2008.
  79. Dignam, J.P.; Scott, T.E.; Kemp-Harper, B.K.; Hobbs, A.J. Animal Models of Pulmonary Hypertension: Getting to the Heart of the Problem. *Br J Pharmacol* **2022**, *179*, 811–837, doi:10.1111/bph.15444.
  80. Kasahara, Y.; Tuder, R.M.; Taraseviciene-Stewart, L.; Le Cras, T.D.; Abman, S.; Hirth, P.K.; Waltenberger, J.; Voelkel, N.F. Inhibition of VEGF Receptors Causes Lung Cell Apoptosis and Emphysema. *J Clin Invest* **2000**, *106*, 1311–1319.
  81. Taraseviciene-Stewart, L.; Kasahara, Y.; Alger, L.; Hirth, P.; Mc Mahon, G.; Waltenberger, J.; Voelkel, N.F.; Tuder, R.M. Inhibition of the VEGF Receptor 2 Combined with Chronic Hypoxia Causes Cell Death-Dependent Pulmonary Endothelial Cell Proliferation and Severe Pulmonary Hypertension. *FASEB J* **2001**, *15*, 427–438, doi:10.1096/fj.00-0343com.
  82. Abe, K.; Toba, M.; Alzoubi, A.; Ito, M.; Fagan, K.A.; Cool, C.D.; Voelkel, N.F.; McMurtry, I.F.; Oka, M. Formation of Plexiform Lesions in Experimental Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2010**, *121*, 2747–2754, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.927681.
  83. Toba, M.; Alzoubi, A.; O'Neill, K.D.; Gairhe, S.; Matsumoto, Y.; Oshima, K.; Abe, K.; Oka, M.; McMurtry, I.F. Temporal Hemodynamic and Histological Progression in Sugen5416/Hypoxia/Normoxia-Exposed Pulmonary Arterial Hypertensive Rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2014**, *306*, H243–H250, doi:10.1152/ajpheart.00728.2013.
  84. Ciuculan, L.; Bonneau, O.; Hussey, M.; Duggan, N.; Holmes, A.M.; Good, R.; Stringer, R.; Jones, P.; Morrell, N.W.; Jarai, G.; et al. A Novel Murine Model of Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**, *184*, 1171–1182,

- doi:10.1164/rccm.201103-0412OC.
85. Raaf, M.A. de; Schaliij, I.; Gomez-Arroyo, J.; Rol, N.; Happé, C.; Man, F.S. de; Vonk-Noordegraaf, A.; Westerhof, N.; Voelkel, N.F.; Bogaard, H.J. SuHx Rat Model: Partly Reversible Pulmonary Hypertension and Progressive Intima Obstruction. *European Respiratory Journal* **2014**, *44*, 160–168, doi:10.1183/09031936.00204813.
  86. Kojonazarov, B.; Hadzic, S.; Ghofrani, H.A.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Weissmann, N.; Schermuly, R.T. Severe Emphysema in the SU5416/Hypoxia Rat Model of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2019**, *200*, 515–518, doi:10.1164/rccm.201902-0390LE.
  87. Bogaard, H.J.; Legchenko, E.; Chaudhary, K.R.; Sun, X.-Q.; Stewart, D.J.; Hansmann, G. Emphysema Is—at the Most—Only a Mild Phenotype in the Sugen/Hypoxia Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2019**, *200*, 1447–1450, doi:10.1164/rccm.201906-1200LE.
  88. Morimatsu, Y.; Sakashita, N.; Komohara, Y.; Ohnishi, K.; Masuda, H.; Dahan, D.; Takeya, M.; Guibert, C.; Marthan, R. Development and Characterization of an Animal Model of Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *J Vasc Res* **2012**, *49*, 33–42, doi:10.1159/000329594.
  89. Coste, F.; Guibert, C.; Magat, J.; Abell, E.; Vaillant, F.; Dubois, M.; Courtois, A.; Diolez, P.; Quesson, B.; Marthan, R.; et al. Chronic Hypoxia Aggravates Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension: A Rodent Relevant Model to the Human Severe Form of the Disease. *Respir Res* **2017**, *18*, 47, doi:10.1186/s12931-017-0533-x.
  90. Tanaka, Y.; Schuster, D.P.; Davis, E.C.; Patterson, G.A.; Botney, M.D. The Role of Vascular Injury and Hemodynamics in Rat Pulmonary Artery Remodeling. *J Clin Invest* **1996**, *98*, 434–442, doi:10.1172/JCI118809.
  91. Okada, K.; Tanaka, Y.; Bernstein, M.; Zhang, W.; Patterson, G.A.; Botney, M.D. Pulmonary Hemodynamics Modify the Rat Pulmonary Artery Response to Injury. A Neointimal Model of Pulmonary Hypertension. *Am J Pathol* **1997**, *151*, 1019–1025.
  92. Nishimura, T.; Faul, J.L.; Berry, G.J.; Vaszar, L.T.; Qiu, D.; Pearl, R.G.; Kao, P.N. Simvastatin Attenuates Smooth Muscle Neointimal Proliferation and Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, *166*, 1403–1408, doi:10.1164/rccm.200203-268OC.
  93. Happé, C.M.; de Raaf, M.A.; Rol, N.; Schaliij, I.; Vonk-Noordegraaf, A.; Westerhof, N.; Voelkel, N.F.; de Man, F.S.; Bogaard, H.J. Pneumonectomy Combined with SU5416 Induces Severe Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2016**, *310*, L1088-1097, doi:10.1152/ajplung.00023.2016.
  94. Katz, M.G.; Fargnoli, A.S.; Gubara, S.M.; Bissierier, M.; Sassi, Y.; Bridges, C.R.; Hajjar, R.J.; Hadri, L. The Left Pneumonectomy Combined with Monocrotaline or Sugen as a Model of Pulmonary Hypertension in Rats. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* **2019**, e59050, doi:10.3791/59050.
  95. LekanneDeprez, R.H.; van den Hoff, M.J.B.; de Boer, P.A.J.; Ruijter, J.M.; Maas, A.A.W.; Chamuleau, R.A.F.M.; Lamers, W.H.; Moorman, A.F.M. Changing Patterns of Gene Expression in the Pulmonary Trunk-Banded Rat Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1998**, *30*, 1877–1888, doi:10.1006/jmcc.1998.0753.
  96. Akazawa, Y.; Okumura, K.; Ishii, R.; Slorach, C.; Hui, W.; Ide, H.; Honjo, O.; Sun, M.; Kabir, G.; Connelly, K.; et al. Pulmonary Artery Banding Is a Relevant Model to Study the Right Ventricular Remodeling and Dysfunction That Occurs in Pulmonary Arterial Hypertension. *J Appl Physiol (1985)* **2020**, *129*, 238–246, doi:10.1152/jappphysiol.00148.2020.
  97. Masri, F.A.; Xu, W.; Comhair, S.A.A.; Asosingh, K.; Koo, M.; VasANJI, A.; Drazba, J.; Anand-Apte, B.; Erzurum, S.C. Hyperproliferative Apoptosis-Resistant Endothelial Cells

- in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2007**, *293*, L548-554, doi:10.1152/ajplung.00428.2006.
98. Perros, F.; Sentenac, P.; Boulate, D.; Manaud, G.; Kotsimbos, T.; Lecerf, F.; Lamrani, L.; Fadel, E.; Mercier, O.; Londono-Vallejo, A.; et al. Smooth Muscle Phenotype in Idiopathic Pulmonary Hypertension: Hyper-Proliferative but Not Cancerous. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 3575, doi:10.3390/ijms20143575.
99. Evans, C.E.; Cober, N.D.; Dai, Z.; Stewart, D.J.; Zhao, Y.-Y. Endothelial Cells in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur Respir J* **2021**, *58*, 2003957, doi:10.1183/13993003.03957-2020.
100. Morrell, N.W.; Adnot, S.; Archer, S.L.; Dupuis, J.; Jones, P.L.; MacLean, M.R.; McMurtry, I.F.; Stenmark, K.R.; Thistlethwaite, P.A.; Weissmann, N.; et al. Cellular and Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* **2009**, *54*, S20–S31, doi:10.1016/j.jacc.2009.04.018.
101. Zeisberg, E.M.; Tarnavski, O.; Zeisberg, M.; Dorfman, A.L.; McMullen, J.R.; Gustafsson, E.; Chandraker, A.; Yuan, X.; Pu, W.T.; Roberts, A.B.; et al. Endothelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Cardiac Fibrosis. *Nat Med* **2007**, *13*, 952–961, doi:10.1038/nm1613.
102. Arciniegas, E.; Frid, M.G.; Douglas, I.S.; Stenmark, K.R. Perspectives on Endothelial-to-Mesenchymal Transition: Potential Contribution to Vascular Remodeling in Chronic Pulmonary Hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2007**, *293*, L1–L8, doi:10.1152/ajplung.00378.2006.
103. Frid, M.G.; Kale, V.A.; Stenmark, K.R. Mature Vascular Endothelium Can Give Rise to Smooth Muscle Cells via Endothelial-Mesenchymal Transdifferentiation. *Circulation Research* **2002**, *90*, 1189–1196, doi:10.1161/01.RES.0000021432.70309.28.
104. Ranchoux, B.; Antigny, F.; Rucker-Martin, C.; Hautefort, A.; Pécoux, C.; Bogaard, H.J.; Dorfmueller, P.; Remy, S.; Lecerf, F.; Planté, S.; et al. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension. *Circulation* **2015**, *131*, 1006–1018, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008750.
105. Cho, J.G.; Lee, A.; Chang, W.; Lee, M.-S.; Kim, J. Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Frontiers in Immunology* **2018**, *9*.
106. Paulin, R.; Meloche, J.; Courboulain, A.; Lambert, C.; Haromy, A.; Courchesne, A.; Bonnet, P.; Provencher, S.; Michelakis, E.D.; Bonnet, S. Targeting Cell Motility in Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* **2014**, *43*, 531–544, doi:10.1183/09031936.00181312.
107. He, S.; Zhu, T.; Fang, Z. The Role and Regulation of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension. *Int J Hypertens* **2020**, *2020*, 1478291, doi:10.1155/2020/1478291.
108. Sankhe, S.; Manousakidi, S.; Antigny, F.; Arthur Ataam, J.; Bentebbal, S.; Ruchon, Y.; Lecerf, F.; Sabourin, J.; Price, L.; Fadel, E.; et al. T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Elicit pro-Proliferative and Anti-Apoptotic Responses through Impaired PP2A/Akt1 Signaling in PSMCs from Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2017**, *1864*, 1631–1641, doi:10.1016/j.bbamcr.2017.06.018.
109. El Kasmi, K.C.; Pugliese, S.C.; Riddle, S.R.; Poth, J.M.; Anderson, A.L.; Frid, M.G.; Li, M.; Pullamsetti, S.S.; Savai, R.; Nagel, M.A.; et al. Adventitial Fibroblasts Induce a Distinct Pro-Inflammatory/Pro-Fibrotic Macrophage Phenotype in Pulmonary Hypertension. *J Immunol* **2014**, *193*, 597–609, doi:10.4049/jimmunol.1303048.
110. Li, M.; Riddle, S.; Zhang, H.; D’Alessandro, A.; Flockton, A.; Serkova, N.J.; Hansen, K.C.; Moldvan, R.; McKeon, B.A.; Frid, M.; et al. Metabolic Reprogramming Regulates

- the Proliferative and Inflammatory Phenotype of Adventitial Fibroblasts in Pulmonary Hypertension Through the Transcriptional Co-Repressor C-Terminal Binding Protein-1. *Circulation* **2016**, *134*, 1105–1121, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023171.
111. Ricard, N.; Tu, L.; Le Hires, M.; Huertas, A.; Phan, C.; Thuillet, R.; Sattler, C.; Fadel, E.; Seferian, A.; Montani, D.; et al. Increased Pericyte Coverage Mediated by Endothelial-Derived Fibroblast Growth Factor-2 and Interleukin-6 Is a Source of Smooth Muscle-Like Cells in Pulmonary Hypertension. *Circulation* **2014**, *129*, 1586–1597, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007469.
  112. Toshner, M.; Voswinckel, R.; Southwood, M.; Al-Lamki, R.; Howard, L.S.G.; Marchesan, D.; Yang, J.; Suntharalingam, J.; Soon, E.; Exley, A.; et al. Evidence of Dysfunction of Endothelial Progenitors in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2009**, *180*, 780–787, doi:10.1164/rccm.200810-1662OC.
  113. Jiang, D.-M.; Han, J.; Zhu, J.-H.; Fu, G.-S.; Zhou, B.-Q. Paracrine Effects of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells: Cyclooxygenase-2/Prostacyclin Pathway in Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS One* **2013**, *8*, e79215, doi:10.1371/journal.pone.0079215.
  114. Dierick, F.; Solinc, J.; Bignard, J.; Soubrier, F.; Nadaud, S. Progenitor/Stem Cells in Vascular Remodeling during Pulmonary Arterial Hypertension. *Cells* **2021**, *10*, 1338, doi:10.3390/cells10061338.
  115. Palmer, R.M.; Ashton, D.S.; Moncada, S. Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide from L-Arginine. *Nature* **1988**, *333*, 664–666, doi:10.1038/333664a0.
  116. Schmidt, H.H.; Pollock, J.S.; Nakane, M.; Förstermann, U.; Murad, F. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Regulated Nitric Oxide Synthases. *Cell Calcium* **1992**, *13*, 427–434, doi:10.1016/0143-4160(92)90055-w.
  117. Fish, J.E.; Matouk, C.C.; Rachlis, A.; Lin, S.; Tai, S.C.; D’Abreo, C.; Marsden, P.A. The Expression of Endothelial Nitric-Oxide Synthase Is Controlled by a Cell-Specific Histone Code. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 24824–24838, doi:10.1074/jbc.M502115200.
  118. Ignarro, L.J.; Buga, G.M.; Wei, L.H.; Bauer, P.M.; Wu, G.; del Soldato, P. Role of the Arginine-Nitric Oxide Pathway in the Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 4202–4208, doi:10.1073/pnas.071054698.
  119. Giaid, A.; Saleh, D. Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* **1995**, *333*, 214–221, doi:10.1056/NEJM199507273330403.
  120. Kaneko, F.T.; Arroliga, A.C.; Dweik, R.A.; Comhair, S.A.; Laskowski, D.; Oppedisano, R.; Thomassen, M.J.; Erzurum, S.C. Biochemical Reaction Products of Nitric Oxide as Quantitative Markers of Primary Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, *158*, 917–923, doi:10.1164/ajrccm.158.3.9802066.
  121. Girgis, R.E.; Champion, H.C.; Diette, G.B.; Johns, R.A.; Permutt, S.; Sylvester, J.T. Decreased Exhaled Nitric Oxide in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2005**, *172*, 352–357, doi:10.1164/rccm.200412-1684OC.
  122. Zhao, Y.-Y.; Zhao, Y.D.; Mirza, M.K.; Huang, J.H.; Potula, H.-H.S.K.; Vogel, S.M.; Brovkovich, V.; Yuan, J.X.-J.; Wharton, J.; Malik, A.B. Persistent ENOS Activation Secondary to Caveolin-1 Deficiency Induces Pulmonary Hypertension in Mice and Humans through PKG Nitration. *Journal of Clinical Investigation* **2009**, *119*, 2009–2018, doi:10.1172/JCI33338.
  123. Mason, N.A.; Springall, D.R.; Burke, M.; Pollock, J.; Mikhail, G.; Yacoub, M.H.; Polak, J.M. High Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Plexiform Lesions of Pulmonary Hypertension. *J Pathol* **1998**, *185*, 313–318, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199807)185:3<313::AID-PATH93>3.0.CO;2-8.

124. Murata, T.; Kinoshita, K.; Hori, M.; Kuwahara, M.; Tsubone, H.; Karaki, H.; Ozaki, H. Statin Protects Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2005**, *25*, 2335–2342, doi:10.1161/01.ATV.0000186184.33537.48.
125. Le Cras, T.D.; Xue, C.; Rengasamy, A.; Johns, R.A. Chronic Hypoxia Upregulates Endothelial and Inducible NO Synthase Gene and Protein Expression in Rat Lung. *Am J Physiol* **1996**, *270*, L164–170, doi:10.1152/ajplung.1996.270.1.L164.
126. Pei, Y.; Ma, P.; Wang, X.; Zhang, W.; Zhang, X.; Zheng, P.; Yan, L.; Xu, Q.; Dai, G. Rosuvastatin Attenuates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension via Regulation of Akt/ENOS Signaling and Asymmetric Dimethylarginine Metabolism. *Eur J Pharmacol* **2011**, *666*, 165–172, doi:10.1016/j.ejphar.2011.05.035.
127. Ghosh, S.; Gupta, M.; Xu, W.; Mavrakis, D.A.; Janocha, A.J.; Comhair, S.A.A.; Haque, M.M.; Stuehr, D.J.; Yu, J.; Polgar, P.; et al. Phosphorylation Inactivation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2016**, *310*, L1199–L1205, doi:10.1152/ajplung.00092.2016.
128. Rybalkin, S.D.; Yan, C.; Bornfeldt, K.E.; Beavo, J.A. Cyclic GMP Phosphodiesterases and Regulation of Smooth Muscle Function. *Circulation Research* **2003**, *93*, 280–291, doi:10.1161/01.RES.0000087541.15600.2B.
129. Maurice, D.H.; Ke, H.; Ahmad, F.; Wang, Y.; Chung, J.; Manganiello, V.C. Advances in Targeting Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13*, 290–314, doi:10.1038/nrd4228.
130. Corbin, J.D.; Beasley, A.; Blount, M.A.; Francis, S.H. High Lung PDE5: A Strong Basis for Treating Pulmonary Hypertension with PDE5 Inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *334*, 930–938, doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.183.
131. Wharton, J.; Strange, J.W.; Møller, G.M.O.; Growcott, E.J.; Ren, X.; Franklyn, A.P.; Phillips, S.C.; Wilkins, M.R. Antiproliferative Effects of Phosphodiesterase Type 5 Inhibition in Human Pulmonary Artery Cells. *Am J Respir Crit Care Med* **2005**, *172*, 105–113, doi:10.1164/rccm.200411-1587OC.
132. Tsai, B.M.; Turrentine, M.W.; Sheridan, B.C.; Wang, M.; Fiore, A.C.; Brown, J.W.; Meldrum, D.R. Differential Effects of Phosphodiesterase-5 Inhibitors on Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Pulmonary Artery Cytokine Expression. *Ann Thorac Surg* **2006**, *81*, 272–278, doi:10.1016/j.athoracsur.2005.06.040.
133. Nagendran, J.; Archer, S.L.; Soliman, D.; Gurtu, V.; Moudgil, R.; Haromy, A.; St. Aubin, C.; Webster, L.; Rebeyka, I.M.; Ross, D.B.; et al. Phosphodiesterase Type 5 Is Highly Expressed in the Hypertrophied Human Right Ventricle, and Acute Inhibition of Phosphodiesterase Type 5 Improves Contractility. *Circulation* **2007**, *116*, 238–248, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655266.
134. Sebki, A.; Strange, J.W.; Phillips, S.C.; Wharton, J.; Wilkins, M.R. Phosphodiesterase Type 5 as a Target for the Treatment of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* **2003**, *107*, 3230–3235, doi:10.1161/01.CIR.0000074226.20466.B1.
135. Evgenov, O.V.; Busch, C.J.; Evgenov, N.V.; Liu, R.; Petersen, B.; Falkowski, G.E.; Pethő, B.; Vas, Á.; Bloch, K.D.; Zapol, W.M.; et al. Inhibition of Phosphodiesterase 1 Augments the Pulmonary Vasodilator Response to Inhaled Nitric Oxide in Awake Lambs with Acute Pulmonary Hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2006**, *290*, L723–L729, doi:10.1152/ajplung.00485.2004.
136. Rybalkin, S.D.; Bornfeldt, K.E.; Sonnenburg, W.K.; Rybalkina, I.G.; Kwak, K.S.; Hanson, K.; Krebs, E.G.; Beavo, J.A. Calmodulin-Stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE1C) Is Induced in Human Arterial Smooth Muscle Cells of the Synthetic, Proliferative Phenotype. *J Clin Invest* **1997**, *100*, 2611–2621, doi:10.1172/JCI119805.

137. Rybalkin, S.D.; Rybalkina, I.; Beavo, J.A.; Bornfeldt, K.E. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 1C Promotes Human Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circulation Research* **2002**, *90*, 151–157, doi:10.1161/hh0202.104108.
138. Murray, F.; Patel, H.H.; Suda, R.Y.S.; Zhang, S.; Thistlethwaite, P.A.; Yuan, J.X.-J.; Insel, P.A. Expression and Activity of CAMP Phosphodiesterase Isoforms in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Pulmonary Hypertension: Role for PDE1. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2007**, *292*, L294–L303, doi:10.1152/ajplung.00190.2006.
139. Schermuly, R.T.; Pullamsetti, S.S.; Kwapiszewska, G.; Dumitrascu, R.; Tian, X.; Weissmann, N.; Ghofrani, H.A.; Kaulen, C.; Dunkern, T.; Schudt, C.; et al. Phosphodiesterase 1 Upregulation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2007**, *115*, 2331–2339, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676809.
140. Murray, F.; MacLean, M.R.; Pyne, N.J. Increased Expression of the CGMP-Inhibited CAMP-Specific (PDE3) and CGMP Binding CGMP-Specific (PDE5) Phosphodiesterases in Models of Pulmonary Hypertension. *Br J Pharmacol* **2002**, *137*, 1187–1194, doi:10.1038/sj.bjp.0704984.
141. Izikki, M.; Raffestin, B.; Klar, J.; Hatzelmann, A.; Marx, D.; Tenor, H.; Zadigue, P.; Adnot, S.; Eddahibi, S. Effects of Roflumilast, a Phosphodiesterase-4 Inhibitor, on Hypoxia- and Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, *330*, 54–62, doi:10.1124/jpet.108.148742.
142. Tian, X.; Vroom, C.; Ghofrani, H.A.; Weissmann, N.; Bieniek, E.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Schermuly, R.T.; Pullamsetti, S.S. Phosphodiesterase 10A Upregulation Contributes to Pulmonary Vascular Remodeling. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e18136, doi:10.1371/journal.pone.0018136.
143. Gautier-Veyret, E.; Van Noolen, L.; Lévy, P.; Pepin, J.L.; Stanke-Labesque, F. Could the Thromboxane A2 Pathway Be a Therapeutic Target for the Treatment of Obstructive Sleep Apnea-Induced Atherosclerosis? *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **2015**, *121*, 97–104, doi:10.1016/j.prostaglandins.2015.05.005.
144. Ogata, S.; Kubota, Y.; Satoh, S.; Ito, S.; Takeuchi, H.; Ashizuka, M.; Shirasuna, K. Ca<sup>2+</sup> Stimulates COX-2 Expression through Calcium-Sensing Receptor in Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *351*, 808–814, doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.098.
145. Clapp, L.H.; Gurung, R. The Mechanistic Basis of Prostacyclin and Its Stable Analogues in Pulmonary Arterial Hypertension: Role of Membrane versus Nuclear Receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **2015**, *120*, 56–71, doi:10.1016/j.prostaglandins.2015.04.007.
146. Hoang, K.G.; Allison, S.; Murray, M.; Petrovic, N. Prostanoids Regulate Angiogenesis Acting Primarily on IP and EP4 Receptors. *Microvasc Res* **2015**, *101*, 127–134, doi:10.1016/j.mvr.2015.07.004.
147. Christman, B.W.; McPherson, C.D.; Newman, J.H.; King, G.A.; Bernard, G.R.; Groves, B.M.; Loyd, J.E. An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* **1992**, *327*, 70–75, doi:10.1056/NEJM199207093270202.
148. Tuder, R.M.; Cool, C.D.; Geraci, M.W.; Wang, J.; Abman, S.H.; Wright, L.; Badesch, D.; Voelkel, N.F. Prostacyclin Synthase Expression Is Decreased in Lungs from Patients with Severe Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**, *159*, 1925–1932, doi:10.1164/ajrccm.159.6.9804054.
149. Nagata, T.; Uehara, Y.; Hara, K.; Igarashi, K.; Hazama, H.; Hisada, T.; Kimura, K.; Goto, A.; Omata, M. Thromboxane Inhibition and Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Respirology* **1997**, *2*, 283–289, doi:10.1111/j.1440-1843.1997.tb00090.x.

150. Langleben, D.; Christman, B.W.; Barst, R.J.; Dias, V.C.; Galiè, N.; Higenbottam, T.W.; Kneussl, M.; Korducki, L.; Naeije, R.; Riedel, A.; et al. Effects of the Thromboxane Synthetase Inhibitor and Receptor Antagonist Terbogrel in Patients with Primary Pulmonary Hypertension. *American Heart Journal* **2002**, *143*, 4A-10A, doi:10.1067/mhj.2002.121806.
151. Mulvaney, E.P.; Reid, H.M.; Bialesova, L.; Bouchard, A.; Salvail, D.; Kinsella, B.T. NTP42, a Novel Antagonist of the Thromboxane Receptor, Attenuates Experimentally Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *BMC Pulmonary Medicine* **2020**, *20*, 85, doi:10.1186/s12890-020-1113-2.
152. Mulvaney, E.P.; Reid, H.M.; Bialesova, L.; Mendes-Ferreira, P.; Adão, R.; Brás-Silva, C.; Kinsella, B.T. Efficacy of the Thromboxane Receptor Antagonist NTP42 Alone, or in Combination with Sildenafil, in the Sugen/Hypoxia-Induced Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur J Pharmacol* **2020**, *889*, 173658, doi:10.1016/j.ejphar.2020.173658.
153. Mulvaney, E.P.; Renzo, F.; Adão, R.; Dupre, E.; Bialesova, L.; Salvatore, V.; Reid, H.M.; Conceição, G.; Grynblat, J.; Llucà-Valldeperas, A.; et al. The Thromboxane Receptor Antagonist NTP42 Promotes Beneficial Adaptation and Preserves Cardiac Function in Experimental Models of Right Heart Overload. *Front Cardiovasc Med* **2022**, *9*, 1063967, doi:10.3389/fcvm.2022.1063967.
154. Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of NTP42:KVA4 - Full Text View - ClinicalTrials.gov Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04919863> (accessed on 23 June 2023).
155. Barst, R.J.; Rubin, L.J.; Long, W.A.; McGoon, M.D.; Rich, S.; Badesch, D.B.; Groves, B.M.; Tapson, V.F.; Bourge, R.C.; Brundage, B.H.; et al. A Comparison of Continuous Intravenous Epoprostenol (Prostacyclin) with Conventional Therapy for Primary Pulmonary Hypertension. *New England Journal of Medicine* **1996**, *334*, 296–301, doi:10.1056/NEJM199602013340504.
156. Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; Masaki, T. A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells. *Nature* **1988**, *332*, 411–415, doi:10.1038/332411a0.
157. Kedzierski, R.M.; Yanagisawa, M. Endothelin System: The Double-Edged Sword in Health and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2001**, *41*, 851–876, doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.851.
158. Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwat, Y.; Miyazakit, H.; Kimura, S.; Goto, K.; Masaki, T. Cloning of a cDNA Encoding a Non-Isopeptide-Selective Subtype of the Endothelin Receptor. *Nature* **1990**, *348*, 732–735, doi:10.1038/348732a0.
159. Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S. Cloning and Expression of a cDNA Encoding an Endothelin Receptor. *Nature* **1990**, *348*, 730–732, doi:10.1038/348730a0.
160. Saito, Y.; Mizuno, T.; Itakura, M.; Suzuki, Y.; Ito, T.; Hagiwara, H.; Hirose, S. Primary Structure of Bovine Endothelin ETB Receptor and Identification of Signal Peptidase and Metal Proteinase Cleavage Sites. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 23433–23437, doi:10.1016/S0021-9258(18)54515-4.
161. Sakamoto, A.; Yanagisawa, M.; Sakurai, T.; Takuwa, Y.; Yanagisawa, H.; Masaki, T. Cloning and Functional Expression of Human cDNA for the ETB Endothelin Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *178*, 656–663, doi:10.1016/0006-291X(91)90158-4.
162. Galiè, N.; Manes, A.; Branzi, A. The Endothelin System in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiovasc Res* **2004**, *61*, 227–237, doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.026.
163. Chen, Q.; Edvinsson, L.; Xu, C.-B. Role of ERK/MAPK in Endothelin Receptor Signaling in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *BMC Cell Biol* **2009**, *10*, 52, doi:10.1186/1471-

2121-10-52.

164. Dupuis, J.; Goresky, C.A.; Fournier, A. Pulmonary Clearance of Circulating Endothelin-1 in Dogs in Vivo: Exclusive Role of ETB Receptors. *Journal of Applied Physiology* **1996**, *81*, 1510–1515, doi:10.1152/jappl.1996.81.4.1510.
165. Seo, B.; Oemar, B.S.; Siebenmann, R.; von Segesser, L.; Lüscher, T.F. Both ETA and ETB Receptors Mediate Contraction to Endothelin-1 in Human Blood Vessels. *Circulation* **1994**, *89*, 1203–1208, doi:10.1161/01.cir.89.3.1203.
166. Lüscher, T.F.; Barton, M. Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists: Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs. *Circulation* **2000**, *102*, 2434–2440, doi:10.1161/01.CIR.102.19.2434.
167. Nootens, M.; Kaufmann, E.; Rector, T.; Toher, C.; Judd, D.; Francis, G.S.; Rich, S. Neurohormonal Activation in Patients with Right Ventricular Failure from Pulmonary Hypertension: Relation to Hemodynamic Variables and Endothelin Levels. *J Am Coll Cardiol* **1995**, *26*, 1581–1585, doi:10.1016/0735-1097(95)00399-1.
168. Cacoub, P.; Dorent, R.; Maistre, G.; Nataf, P.; Carayon, A.; Piette, C.; Godeau, P.; Cabrol, C.; Gandjbakhch, I. Endothelin-1 in Primary Pulmonary Hypertension and the Eisenmenger Syndrome. *Am J Cardiol* **1993**, *71*, 448–450, doi:10.1016/0002-9149(93)90452-i.
169. Giaid, A.; Yanagisawa, M.; Langleben, D.; Michel, R.P.; Levy, R.; Shennib, H.; Kimura, S.; Masaki, T.; Duguid, W.P.; Stewart, D.J. Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* **1993**, *328*, 1732–1739, doi:10.1056/NEJM199306173282402.
170. Jasmin, J.-F.; Lucas, M.; Cernacek, P.; Dupuis, J. Effectiveness of a Nonselective ETA/B and a Selective ETA Antagonist in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* **2001**, *103*, 314–318, doi:10.1161/01.CIR.103.2.314.
171. Chester, A.H.; Yacoub, M.H. The Role of Endothelin-1 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Glob Cardiol Sci Pract* **2014**, *2014*, 62–78, doi:10.5339/gcsp.2014.29.
172. Abraham, W.T.; Raynolds, M.V.; Badesch, D.B.; Wynne, K.M.; Groves, B.M.; Roden, R.L.; Robertson, A.D.; Lowes, B.D.; Zisman, L.S.; Voelkel, N.F.; et al. Angiotensin-Converting Enzyme DD Genotype in Patients with Primary Pulmonary Hypertension: Increased Frequency and Association with Preserved Haemodynamics. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **2003**, *4*, 27–30, doi:10.3317/jraas.2003.003.
173. Chung, W.K.; Deng, L.; Carroll, J.S.; Mallory, N.; Diamond, B.; Rosenzweig, E.B.; Barst, R.J.; Morse, J.H. Polymorphism in the Angiotensin II Type 1 Receptor (AGTR1) Is Associated with Age at Diagnosis in Pulmonary Arterial Hypertension. *J Heart Lung Transplant* **2009**, *28*, 373–379, doi:10.1016/j.healun.2009.01.016.
174. Orte, C.; Polak, J.M.; Haworth, S.G.; Yacoub, M.H.; Morrell, N.W. Expression of Pulmonary Vascular Angiotensin-Converting Enzyme in Primary and Secondary Plexiform Pulmonary Hypertension. *J Pathol* **2000**, *192*, 379–384, doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH715>3.0.CO;2-Q.
175. De Man, F.; Tu, L.; Handoko, L.; Rain, S.; Ruiter, G.; François, C.; Schalij, I.; Dorfmueller, P.; Simonneau, G.; Fadel, E.; et al. Dysregulated Renin-Angiotensin-Aldosterone System Contributes to Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2012**, *186*, 780–789, doi:10.1164/rccm.201203-0411OC.
176. Morrell, N.W.; Morris, K.G.; Stenmark, K.R. Role of Angiotensin-Converting Enzyme and Angiotensin II in Development of Hypoxic Pulmonary Hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **1995**, *269*, H1186–H1194, doi:10.1152/ajpheart.1995.269.4.H1186.
177. Morrell, N.W.; Atochina, E.N.; Morris, K.G.; Danilov, S.M.; Stenmark, K.R. Angiotensin Converting Enzyme Expression Is Increased in Small Pulmonary Arteries of Rats with

- Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *J Clin Invest* **1995**, *96*, 1823–1833.
178. Lu, Q.; Davel, A.P.; McGraw, A.P.; Rao, S.P.; Newfell, B.G.; Jaffe, I.Z. PKC $\delta$  Mediates Mineralocorticoid Receptor Activation by Angiotensin II to Modulate Smooth Muscle Cell Function. *Endocrinology* **2019**, *160*, 2101–2114, doi:10.1210/en.2019-00258.
179. Preston, I.R.; Sagliani, K.D.; Warburton, R.R.; Hill, N.S.; Fanburg, B.L.; Jaffe, I.Z. Mineralocorticoid Receptor Antagonism Attenuates Experimental Pulmonary Hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2013**, *304*, L678–L688, doi:10.1152/ajplung.00300.2012.
180. Boehm, M.; Arnold, N.; Braithwaite, A.; Pickworth, J.; Lu, C.; Novoyatleva, T.; Kiely, D.G.; Grimminger, F.; Ghofrani, H.A.; Weissmann, N.; et al. Eplerenone Attenuates Pathological Pulmonary Vascular Rather than Right Ventricular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *BMC Pulmonary Medicine* **2018**, *18*, 41, doi:10.1186/s12890-018-0604-x.
181. Tu, L.; Thuillet, R.; Perrot, J.; Ottaviani, M.; Ponsardin, E.; Kolkhof, P.; Humbert, M.; Viengchareun, S.; Lombès, M.; Guignabert, C. Mineralocorticoid Receptor Antagonism by Finerenone Attenuates Established Pulmonary Hypertension in Rats. *Hypertension* **2022**, *79*, 2262–2273, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.19207.
182. de Caestecker, M. The Transforming Growth Factor-Beta Superfamily of Receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **2004**, *15*, 1–11, doi:10.1016/j.cytogfr.2003.10.004.
183. Rol, N.; Kurakula, K.B.; Happé, C.; Bogaard, H.J.; Goumans, M.-J. TGF- $\beta$  and BMPRII Signaling in PAH: Two Black Sheep in One Family. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 2585, doi:10.3390/ijms19092585.
184. Dituri, F.; Cossu, C.; Mancarella, S.; Giannelli, G. The Interactivity between TGF $\beta$  and BMP Signaling in Organogenesis, Fibrosis, and Cancer. *Cells* **2019**, *8*, 1130, doi:10.3390/cells8101130.
185. Tielemans, B.; Delcroix, M.; Belge, C.; Quarcq, R. TGF $\beta$  and BMPRII Signalling Pathways in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Drug Discov Today* **2019**, *24*, 703–716, doi:10.1016/j.drudis.2018.12.001.
186. Guignabert, C.; Humbert, M. Targeting Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors in Pulmonary Hypertension. *European Respiratory Journal* **2021**, *57*, doi:10.1183/13993003.02341-2020.
187. Jonigk, D.; Golpon, H.; Bockmeyer, C.L.; Maegel, L.; Hoeper, M.M.; Gottlieb, J.; Nickel, N.; Hussein, K.; Maus, U.; Lehmann, U.; et al. Plexiform Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension Composition, Architecture, and Microenvironment. *Am J Pathol* **2011**, *179*, 167–179, doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.040.
188. Hautefort, A.; Mendes-Ferreira, P.; Sabourin, J.; Manaud, G.; Bertero, T.; Rucker-Martin, C.; Riou, M.; Adão, R.; Manoury, B.; Lambert, M.; et al. Bmpr2 Mutant Rats Develop Pulmonary and Cardiac Characteristics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2019**, *139*, 932–948, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033744.
189. Ross, R.; Glomset, J.; Kariya, B.; Harker, L. A Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, *71*, 1207–1210.
190. Reigstad, L.J.; Varhaug, J.E.; Lillehaug, J.R. Structural and Functional Specificities of PDGF-C and PDGF-D, the Novel Members of the Platelet-Derived Growth Factors Family. *FEBS J* **2005**, *272*, 5723–5741, doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04989.x.
191. Heldin, C.-H.; Westermark, B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiological Reviews* **1999**, *79*, 1283–1316, doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1283.
192. Humbert, M.; Monti, G.; Fartoukh, M.; Magnan, A.; Brenot, F.; Rain, B.; Capron, F.; Galanaud, P.; Duroux, P.; Simonneau, G.; et al. Platelet-Derived Growth Factor

- Expression in Primary Pulmonary Hypertension: Comparison of HIV Seropositive and HIV Seronegative Patients. *Eur Respir J* **1998**, *11*, 554–559, doi:10.1183/09031936.98.11030554.
193. Perros, F.; Montani, D.; Dorfmueller, P.; Durand-Gasselien, I.; Tcherakian, C.; Le Pavec, J.; Mazmanian, M.; Fadel, E.; Mussot, S.; Mercier, O.; et al. Platelet-Derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**, *178*, 81–88, doi:10.1164/rccm.200707-1037OC.
  194. Saygin, D.; Tabib, T.; Bittar, H.E.T.; Valenzi, E.; Sembrat, J.; Chan, S.Y.; Rojas, M.; Lafyatis, R. Transcriptional Profiling of Lung Cell Populations in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulm Circ* **2020**, *10*, ???, doi:10.1177/2045894020908782.
  195. Selimovic, N.; Bergh, C.-H.; Andersson, B.; Sakiniene, E.; Carlsten, H.; Rundqvist, B. Growth Factors and Interleukin-6 across the Lung Circulation in Pulmonary Hypertension. *Eur Respir J* **2009**, *34*, 662–668, doi:10.1183/09031936.00174908.
  196. Ogawa, A.; Firth, A.L.; Smith, K.A.; Maliakal, M.V.; Yuan, J.X.-J. PDGF Enhances Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry by Upregulating STIM1/Orai1 via Activation of Akt/MTOR in Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2011**, *302*, C405–C411, doi:10.1152/ajpcell.00337.2011.
  197. Yu, Y.; Sweeney, M.; Zhang, S.; Platoshyn, O.; Landsberg, J.; Rothman, A.; Yuan, J.X.-J. PDGF Stimulates Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Upregulating TRPC6 Expression. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2003**, *284*, C316–C330, doi:10.1152/ajpcell.00125.2002.
  198. Zhao, F.-Y.; Xu, S.-L.; Zhang, C.-F.; Liu, J.; Zhang, Y.; Yang, J.; Xing, X.-Q. PDGF Mediates Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Regulating NFATc2. *Mol Med Rep* **2021**, *23*, 39, doi:10.3892/mmr.2020.11677.
  199. Solinc, J.; Ribot, J.; Soubrier, F.; Pavoine, C.; Dierick, F.; Nadaud, S. The Platelet-Derived Growth Factor Pathway in Pulmonary Arterial Hypertension: Still an Interesting Target? *Life (Basel)* **2022**, *12*, 658, doi:10.3390/life12050658.
  200. Dahal, B.K.; Heuchel, R.; Pullamsetti, S.S.; Wilhelm, J.; Ghofrani, H.A.; Weissmann, N.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Schermuly, R.T. Hypoxic Pulmonary Hypertension in Mice with Constitutively Active Platelet-Derived Growth Factor Receptor- $\beta$ . *Pulm Circ* **2011**, *1*, 259–268, doi:10.4103/2045-8932.83448.
  201. Solinc, J.; Raimbault-Machado, J.; Dierick, F.; El Bernoussi, L.; Tu, L.; Thuillet, R.; Mougenot, N.; Hoareau-Coudert, B.; Monceau, V.; Pavoine, C.; et al. Platelet-Derived Growth Factor Receptor Type  $\alpha$  Activation Drives Pulmonary Vascular Remodeling Via Progenitor Cell Proliferation and Induces Pulmonary Hypertension. *J Am Heart Assoc* **2022**, *11*, e023021, doi:10.1161/JAHA.121.023021.
  202. Schermuly, R.T.; Dony, E.; Ghofrani, H.A.; Pullamsetti, S.; Savai, R.; Roth, M.; Sydykov, A.; Lai, Y.J.; Weissmann, N.; Seeger, W.; et al. Reversal of Experimental Pulmonary Hypertension by PDGF Inhibition. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 2811–2821, doi:10.1172/JCI24838.
  203. Novartis Pharmaceuticals A 24-Week Randomized Placebo-Controlled, Double-Blind Multi-Center Clinical Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Oral QTI571 as an Add-on Therapy in the Treatment of Severe Pulmonary Arterial Hypertension: Imatinib in Pulmonary Arterial Hypertension, a Randomized, Efficacy Study (IMPRES); clinicaltrials.gov, 2016;
  204. Hoepfer, M.M.; Barst, R.J.; Bourge, R.C.; Feldman, J.; Frost, A.E.; Galié, N.; Gómez-Sánchez, M.A.; Grimminger, F.; Grünig, E.; Hassoun, P.M.; et al. Imatinib Mesylate as Add-on Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: Results of the Randomized IMPRES Study. *Circulation* **2013**, *127*, 1128–1138, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000765.

205. Shah, A.M.; Campbell, P.; Rocha, G.Q.; Peacock, A.; Barst, R.J.; Quinn, D.; Solomon, S.D.; IMPRES Investigators Effect of Imatinib as Add-on Therapy on Echocardiographic Measures of Right Ventricular Function in Patients with Significant Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur Heart J* **2015**, *36*, 623–632, doi:10.1093/eurheartj/ehu035.
206. Weatherald, J.; Chaumais, M.-C.; Savale, L.; Jaïs, X.; Seferian, A.; Canuet, M.; Bouvaist, H.; Magro, P.; Bergeron, A.; Guignabert, C.; et al. Long-Term Outcomes of Dasatinib-Induced Pulmonary Arterial Hypertension: A Population-Based Study. *Eur Respir J* **2017**, *50*, 1700217, doi:10.1183/13993003.00217-2017.
207. Guignabert, C.; Phan, C.; Seferian, A.; Huertas, A.; Tu, L.; Thuillet, R.; Sattler, C.; Le Hiress, M.; Tamura, Y.; Jutant, E.-M.; et al. Dasatinib Induces Lung Vascular Toxicity and Predisposes to Pulmonary Hypertension. *J Clin Invest* **126**, 3207–3218, doi:10.1172/JCI86249.
208. Nagaraj, C.; Tang, B.; Bálint, Z.; Wygrecka, M.; Hrzenjak, A.; Kwapiszewska, G.; Stacher, E.; Lindenmann, J.; Weir, E.K.; Olschewski, H.; et al. Src Tyrosine Kinase Is Crucial for Potassium Channel Function in Human Pulmonary Arteries. *Eur Respir J* **2013**, *41*, 85–95, doi:10.1183/09031936.00211811.
209. El-Dabh, A.; Acharya, D. Pulmonary Hypertension with Dasatinib and Other Tyrosine Kinase Inhibitors. *Pulm Circ* **2019**, *9*, 2045894019865704, doi:10.1177/2045894019865704.
210. Gillies, H.; Niven, R.; Dake, B.T.; Chakinala, M.M.; Feldman, J.P.; Hill, N.S.; Hooper, M.M.; Humbert, M.; McLaughlin, V.V.; Kankam, M. AV-101, a Novel Inhaled Dry Powder Formulation of Imatinib, in Healthy Adult Participants: A Phase 1 Single and Multiple Ascending Dose Study. *ERJ Open Research* **2022**, doi:10.1183/23120541.00433-2022.
211. Benisty, J.I.; McLaughlin, V.V.; Landzberg, M.J.; Rich, J.D.; Newburger, J.W.; Rich, S.; Folkman, J. Elevated Basic Fibroblast Growth Factor Levels in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **2004**, *126*, 1255–1261, doi:10.1378/chest.126.4.1255.
212. Arcot, S.S.; Fagerland, J.A.; Lipke, D.W.; Gillespie, M.N.; Olson, J.W. Basic Fibroblast Growth Factor Alterations during Development of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Growth Factors* **1995**, *12*, 121–130, doi:10.3109/08977199509028958.
213. Wedgwood, S.; Devol, J.M.; Grobe, A.; Benavidez, E.; Azakie, A.; Fineman, J.R.; Black, S.M. Fibroblast Growth Factor-2 Expression Is Altered in Lambs With Increased Pulmonary Blood Flow and Pulmonary Hypertension. *Pediatr Res* **2007**, *61*, 32–36, doi:10.1203/01.pdr.0000250013.77008.28.
214. Izikki, M.; Guignabert, C.; Fadel, E.; Humbert, M.; Tu, L.; Zadigue, P.; Dartevelle, P.; Simonneau, G.; Adnot, S.; Maitre, B.; et al. Endothelial-Derived FGF2 Contributes to the Progression of Pulmonary Hypertension in Humans and Rodents. *J Clin Invest* **2009**, *119*, 512–523, doi:10.1172/JCI35070.
215. Tu, L.; Dewachter, L.; Gore, B.; Fadel, E.; Dartevelle, P.; Simonneau, G.; Humbert, M.; Eddahibi, S.; Guignabert, C. Autocrine Fibroblast Growth Factor-2 Signaling Contributes to Altered Endothelial Phenotype in Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2011**, *45*, 311–322, doi:10.1165/rcmb.2010-0317OC.
216. Woo, K.V.; Shen, I.Y.; Weinheimer, C.J.; Kovacs, A.; Nigro, J.; Lin, C.-Y.; Chakinala, M.; Byers, D.E.; Ornitz, D.M. Endothelial FGF Signaling Is Protective in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *J Clin Invest* **131**, e141467, doi:10.1172/JCI141467.
217. Eddahibi, S.; Guignabert, C.; Barlier-Mur, A.-M.; Dewachter, L.; Fadel, E.; Dartevelle, P.; Humbert, M.; Simonneau, G.; Hanoun, N.; Saurini, F.; et al. Cross Talk between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension: Critical Role for Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia. *Circulation* **2006**, *113*, 1857–1864,

doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.591321.

218. Hervé, P.; Launay, J.M.; Scrobohaci, M.L.; Brenot, F.; Simonneau, G.; Petitpretz, P.; Poubau, P.; Cerrina, J.; Duroux, P.; Drouet, L. Increased Plasma Serotonin in Primary Pulmonary Hypertension. *Am J Med* **1995**, *99*, 249–254, doi:10.1016/s0002-9343(99)80156-9.
219. MacLean, M.R. Pulmonary Hypertension and the Serotonin Hypothesis: Where Are We Now?: Serotonin and Pulmonary Hypertension. *International Journal of Clinical Practice* **2007**, *61*, 27–31, doi:10.1111/j.1742-1241.2007.01497.x.
220. Lee, S.L.; Wang, W.W.; Finlay, G.A.; Fanburg, B.L. Serotonin Stimulates Mitogen-Activated Protein Kinase Activity through the Formation of Superoxide Anion. *Am J Physiol* **1999**, *277*, L282-291, doi:10.1152/ajplung.1999.277.2.L282.
221. Lawrie, A.; Spiekerkoetter, E.; Martinez, E.C.; Ambartsumian, N.; Sheward, W.J.; MacLean, M.R.; Harmar, A.J.; Schmidt, A.-M.; Lukanidin, E.; Rabinovitch, M. Interdependent Serotonin Transporter and Receptor Pathways Regulate S100A4/Mts1, a Gene Associated with Pulmonary Vascular Disease. *Circ Res* **2005**, *97*, 227–235, doi:10.1161/01.RES.0000176025.57706.1e.
222. Wallace, E.; Morrell, N.W.; Yang, X.D.; Long, L.; Stevens, H.; Nilsen, M.; Loughlin, L.; Mair, K.M.; Baker, A.H.; MacLean, M.R. A Sex-Specific MicroRNA-96/5-Hydroxytryptamine 1B Axis Influences Development of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2015**, *191*, 1432–1442, doi:10.1164/rccm.201412-2148OC.
223. Hironaka, E.; Hongo, M.; Sakai, A.; Mawatari, E.; Terasawa, F.; Okumura, N.; Yamazaki, A.; Ushiyama, Y.; Yazaki, Y.; Kinoshita, O. Serotonin Receptor Antagonist Inhibits Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension and Prolongs Survival in Rats. *Cardiovascular Research* **2003**, *60*, 692–699, doi:10.1016/j.cardiores.2003.09.023.
224. Marcos, E.; Adnot, S.; Pham, M.H.; Nosjean, A.; Raffestin, B.; Hamon, M.; Eddahibi, S. Serotonin Transporter Inhibitors Protect against Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**, *168*, 487–493, doi:10.1164/rccm.200210-1212OC.
225. Guignabert, C.; Raffestin, B.; Benferhat, R.; Raoul, W.; Zadigue, P.; Rideau, D.; Hamon, M.; Adnot, S.; Eddahibi, S. Serotonin Transporter Inhibition Prevents and Reverses Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Circulation* **2005**, *111*, 2812–2819, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.524926.
226. Morecroft, I.; White, K.; Caruso, P.; Nilsen, M.; Loughlin, L.; Alba, R.; Reynolds, P.N.; Danilov, S.M.; Baker, A.H.; MacLean, M.R. Gene Therapy by Targeted Adenovirus-Mediated Knockdown of Pulmonary Endothelial Tph1 Attenuates Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Mol Ther* **2012**, *20*, 1516–1528, doi:10.1038/mt.2012.70.
227. Ciuculan, L.; Hussey, M.J.; Burton, V.; Good, R.; Duggan, N.; Beach, S.; Jones, P.; Fox, R.; Clay, I.; Bonneau, O.; et al. Imatinib Attenuates Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Pathology via Reduction in 5-Hydroxytryptamine through Inhibition of Tryptophan Hydroxylase 1 Expression. *Am J Respir Crit Care Med* **2013**, *187*, 78–89, doi:10.1164/rccm.201206-1028OC.
228. Aiello, R.J.; Bourassa, P.-A.; Zhang, Q.; Dubins, J.; Goldberg, D.R.; De Lombaert, S.; Humbert, M.; Guignabert, C.; Cavaasin, M.A.; McKinsey, T.A.; et al. Tryptophan Hydroxylase 1 Inhibition Impacts Pulmonary Vascular Remodeling in Two Rat Models of Pulmonary Hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* **2017**, *360*, 267–279, doi:10.1124/jpet.116.237933.
229. Sadoughi, A.; Roberts, K.E.; Preston, I.R.; Lai, G.P.; McCollister, D.H.; Farber, H.W.; Hill, N.S. Use of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Outcomes in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **2013**, *144*, 531–541, doi:10.1378/chest.12-2081.
230. Morecroft, I.; Loughlin, L.; Nilsen, M.; Colston, J.; Dempsie, Y.; Sheward, J.; Harmar, A.; MacLean, M.R. Functional Interactions between 5-Hydroxytryptamine Receptors and

- the Serotonin Transporter in Pulmonary Arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, *313*, 539–548, doi:10.1124/jpet.104.081182.
231. Shah, T.G.; Bartolome, S.D.; Chin, K.M. Anorexigen-Associated Pulmonary Arterial Hypertension and the Serotonin Hypothesis: A Story Worth Telling. *Advances in Pulmonary Hypertension* **2018**, *17*, 63–68, doi:10.21693/1933-088X-17.2.63.
  232. Freund-Michel, V.; Khoyrattee, N.; Savineau, J.-P.; Muller, B.; Guibert, C. Mitochondria: Roles in Pulmonary Hypertension. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2014**, *55*, 93–97, doi:10.1016/j.biocel.2014.08.012.
  233. Archer, S.L.; Fang, Y.-H.; Ryan, J.J.; Piao, L. Metabolism and Bioenergetics in the Right Ventricle and Pulmonary Vasculature in Pulmonary Hypertension. *Pulm Circ* **2013**, *3*, 144–152, doi:10.4103/2045-8932.109960.
  234. Dromparis, P.; Sutendra, G.; Michelakis, E.D. The Role of Mitochondria in Pulmonary Vascular Remodeling. *J Mol Med* **2010**, *88*, 1003–1010, doi:10.1007/s00109-010-0670-x.
  235. Peng, H.; Xiao, Y.; Deng, X.; Luo, J.; Hong, C.; Qin, X. The Warburg Effect: A New Story in Pulmonary Arterial Hypertension. *Clinica Chimica Acta* **2016**, *461*, 53–58, doi:10.1016/j.cca.2016.07.017.
  236. Archer, S.L. Pyruvate Kinase and Warburg Metabolism in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2017**, *136*, 2486–2490, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031655.
  237. Dromparis, P.; Michelakis, E.D. Mitochondria in Vascular Health and Disease. *Annual Review of Physiology* **2013**, *75*, 95–126, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183804.
  238. Piao, L.; Marsboom, G.; Archer, S.L. Mitochondrial Metabolic Adaptation in Right Ventricular Hypertrophy and Failure. *J Mol Med* **2010**, *88*, 1011–1020, doi:10.1007/s00109-010-0679-1.
  239. Labrousse-Arias, D.; Castillo-González, R.; Rogers, N.M.; Torres-Capelli, M.; Barreira, B.; Aragonés, J.; Cogolludo, Á.; Isenberg, J.S.; Calzada, M.J. HIF-2 $\alpha$ -Mediated Induction of Pulmonary Thrombospondin-1 Contributes to Hypoxia-Driven Vascular Remodelling and Vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **2016**, *109*, 115–130, doi:10.1093/cvr/cvv243.
  240. Lei, W.; He, Y.; Shui, X.; Li, G.; Yan, G.; Zhang, Y.; Huang, S.; Chen, C.; Ding, Y. Expression and Analyses of the HIF-1 Pathway in the Lungs of Humans with Pulmonary Arterial Hypertension. *Molecular Medicine Reports* **2016**, *14*, 4383–4390, doi:10.3892/mmr.2016.5752.
  241. Pullamsetti, S.S.; Mamazhakypov, A.; Weissmann, N.; Seeger, W.; Savai, R. Hypoxia-Inducible Factor Signaling in Pulmonary Hypertension. *J Clin Invest* **130**, 5638–5651, doi:10.1172/JCI137558.
  242. Michelakis, E.D.; Gurtu, V.; Webster, L.; Barnes, G.; Watson, G.; Howard, L.; Cupitt, J.; Paterson, I.; Thompson, R.B.; Chow, K.; et al. Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Improves Pulmonary Arterial Hypertension in Genetically Susceptible Patients. *Science Translational Medicine* **2017**, *9*, eaao4583, doi:10.1126/scitranslmed.aao4583.
  243. Michelakis, E.D.; McMurtry, M.S.; Wu, X.-C.; Dyck, J.R.B.; Moudgil, R.; Hopkins, T.A.; Lopaschuk, G.D.; Puttagunta, L.; Waite, R.; Archer, S.L. Dichloroacetate, a Metabolic Modulator, Prevents and Reverses Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats. *Circulation* **2002**, *105*, 244–250, doi:10.1161/hc0202.101974.
  244. McMurtry, M.S.; Bonnet, S.; Wu, X.; Dyck, J.R.B.; Haromy, A.; Hashimoto, K.; Michelakis, E.D. Dichloroacetate Prevents and Reverses Pulmonary Hypertension by Inducing Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Apoptosis. *Circulation Research* **2004**, *95*, 830–840, doi:10.1161/01.RES.0000145360.16770.9f.
  245. Liang, S.; Yegambaram, M.; Wang, T.; Wang, J.; Black, S.M.; Tang, H. Mitochondrial Metabolism, Redox, and Calcium Homeostasis in Pulmonary Arterial Hypertension.

- Biomedicines* **2022**, *10*, 341, doi:10.3390/biomedicines10020341.
246. Marsboom, G.; Toth, P.T.; Ryan, J.J.; Hong, Z.; Wu, X.; Fang, Y.-H.; Thenappan, T.; Piao, L.; Zhang, H.J.; Pogoriler, J.; et al. Dynamin-Related Protein 1–Mediated Mitochondrial Mitotic Fission Permits Hyperproliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Offers a Novel Therapeutic Target in Pulmonary Hypertension. *Circulation Research* **2012**, *110*, 1484–1497, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.263848.
247. Pak, O.; Sommer, N.; Hoeres, T.; Bakr, A.; Waisbrod, S.; Sydykov, A.; Haag, D.; Esfandiary, A.; Kojonazarov, B.; Veit, F.; et al. Mitochondrial Hyperpolarization in Pulmonary Vascular Remodeling. Mitochondrial Uncoupling Protein Deficiency as Disease Model. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2013**, *49*, 358–367, doi:10.1165/rcmb.2012-0361OC.
248. Feng, S.; Li, H.; Tai, Y.; Huang, J.; Su, Y.; Abramowitz, J.; Zhu, M.X.; Birnbaumer, L.; Wang, Y. Canonical Transient Receptor Potential 3 Channels Regulate Mitochondrial Calcium Uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 11011–11016, doi:10.1073/pnas.1309531110.
249. Hong, Z.; Chen, K.-H.; DasGupta, A.; Potus, F.; Dunham-Snary, K.; Bonnet, S.; Tian, L.; Fu, J.; Breuils-Bonnet, S.; Provencher, S.; et al. MicroRNA-138 and MicroRNA-25 Down-Regulate Mitochondrial Calcium Uniporter, Causing the Pulmonary Arterial Hypertension Cancer Phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* **2017**, *195*, 515–529, doi:10.1164/rccm.201604-0814OC.
250. Schieber, M.; Chandel, N.S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol* **2014**, *24*, R453–R462, doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.
251. Bowers, R.; Cool, C.; Murphy, R.C.; Tudor, R.M.; Hopken, M.W.; Flores, S.C.; Voelkel, N.F. Oxidative Stress in Severe Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2004**, *169*, 764–769, doi:10.1164/rccm.200301-147OC.
252. Bonnet, S.; Michelakis, E.D.; Porter, C.J.; Andrade-Navarro, M.A.; Thébaud, B.; Bonnet, S.; Haromy, A.; Harry, G.; Moudgil, R.; McMurtry, M.S.; et al. An Abnormal Mitochondrial–Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ –Kv Channel Pathway Disrupts Oxygen Sensing and Triggers Pulmonary Arterial Hypertension in Fawn Hooded Rats. *Circulation* **2006**, *113*, 2630–2641, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008.
253. Dennis, K.E.; Aschner, J.L.; Milatovic, D.; Schmidt, J.W.; Aschner, M.; Kaplowitz, M.R.; Zhang, Y.; Fike, C.D. NADPH Oxidases and Reactive Oxygen Species at Different Stages of Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Newborn Piglets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2009**, *297*, L596–607, doi:10.1152/ajplung.90568.2008.
254. Ramiro-Diaz, J.M.; Nitta, C.H.; Maston, L.D.; Codianni, S.; Giermakowska, W.; Resta, T.C.; Gonzalez Bosc, L.V. NFAT Is Required for Spontaneous Pulmonary Hypertension in Superoxide Dismutase 1 Knockout Mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2013**, *304*, L613–625, doi:10.1152/ajplung.00408.2012.
255. Yan, Y.; He, Y.-Y.; Jiang, X.; Wang, Y.; Chen, J.-W.; Zhao, J.-H.; Ye, J.; Lian, T.-Y.; Zhang, X.; Zhang, R.-J.; et al. DNA Methyltransferase 3B Deficiency Unveils a New Pathological Mechanism of Pulmonary Hypertension. *Sci Adv* **2020**, *6*, eaba2470, doi:10.1126/sciadv.aba2470.
256. Archer, S.L.; Marsboom, G.; Kim, G.H.; Zhang, H.J.; Toth, P.T.; Svensson, E.C.; Dyck, J.R.B.; Gomberg-Maitland, M.; Thébaud, B.; Husain, A.N.; et al. Epigenetic Attenuation of Mitochondrial Superoxide Dismutase 2 (SOD2) in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2010**, *121*, 2661–2671, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916098.
257. Zhao, L.; Chen, C.-N.; Hajji, N.; Oliver, E.; Cotroneo, E.; Wharton, J.; Wang, D.; Li, M.; McKinsey, T.A.; Stenmark, K.R.; et al. Histone Deacetylation Inhibition in Pulmonary Hypertension: Therapeutic Potential of Valproic Acid (VPA) and Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA). *Circulation* **2012**, *126*, 455–467,

- doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.103176.
258. Bissierier, M.; Janostiak, R.; Lezoualc'h, F.; Hadri, L. Targeting Epigenetic Mechanisms as an Emerging Therapeutic Strategy in Pulmonary Hypertension Disease. *Vasc Biol* **2019**, *2*, R17–R34, doi:10.1530/VB-19-0030.
259. Boucherat, O.; Chabot, S.; Paulin, R.; Trinh, I.; Bourgeois, A.; Potus, F.; Lampron, M.-C.; Lambert, C.; Breuils-Bonnet, S.; Nadeau, V.; et al. HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension. *Sci Rep* **2017**, *7*, 4546, doi:10.1038/s41598-017-04874-4.
260. Brock, M.; Trenkmann, M.; Gay, R.E.; Michel, B.A.; Gay, S.; Fischler, M.; Ulrich, S.; Speich, R.; Huber, L.C. Interleukin-6 Modulates the Expression of the Bone Morphogenic Protein Receptor Type II through a Novel STAT3-MicroRNA Cluster 17/92 Pathway. *Circ Res* **2009**, *104*, 1184–1191, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.197491.
261. Parikh, V.N.; Jin, R.C.; Rabello, S.; Gulbahce, N.; White, K.; Hale, A.; Cottrill, K.A.; Shaik, R.S.; Waxman, A.B.; Zhang, Y.-Y.; et al. MicroRNA-21 Integrates Pathogenic Signaling to Control Pulmonary Hypertension: Results of a Network Bioinformatics Approach. *Circulation* **2012**, *125*, 1520–1532, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.060269.
262. Mondejar-Parreño, G.; Callejo, M.; Barreira, B.; Morales-Cano, D.; Esquivel-Ruiz, S.; Moreno, L.; Cogolludo, A.; Perez-Vizcaino, F. MiR-1 Is Increased in Pulmonary Hypertension and Downregulates Kv1.5 Channels in Rat Pulmonary Arteries. *J Physiol* **2019**, *597*, 1185–1197, doi:10.1113/JP276054.
263. Courboulin, A.; Paulin, R.; Giguère, N.J.; Saksouk, N.; Perreault, T.; Meloche, J.; Paquet, E.R.; Biardel, S.; Provencher, S.; Côté, J.; et al. Role for MiR-204 in Human Pulmonary Arterial Hypertension. *J Exp Med* **2011**, *208*, 535–548, doi:10.1084/jem.20101812.
264. Chelladurai, P.; Seeger, W.; Pullamsetti, S.S. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Pulmonary Hypertension. *European Respiratory Journal* **2012**, *40*, 766–782, doi:10.1183/09031936.00209911.
265. Thompson, K.; Rabinovitch, M. Exogenous Leukocyte and Endogenous Elastases Can Mediate Mitogenic Activity in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells by Release of Extracellular Matrix-Bound Basic Fibroblast Growth Factor. *Journal of Cellular Physiology* **1996**, *166*, 495–505, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<495::AID-JCP4>3.0.CO;2-K.
266. Hoffmann, J.; Marsh, L.M.; Pieper, M.; Stacher, E.; Ghanim, B.; Kovacs, G.; König, P.; Wilkens, H.; Haitchi, H.M.; Hoefler, G.; et al. Compartment-Specific Expression of Collagens and Their Processing Enzymes in Intrapulmonary Arteries of IPAH Patients. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2015**, *308*, L1002–L1013, doi:10.1152/ajplung.00383.2014.
267. Lepetit, H.; Eddahibi, S.; Fadel, E.; Frisdal, E.; Munaut, C.; Noel, A.; Humbert, M.; Adnot, S.; D'Ortho, M.-P.; Lafuma, C. Smooth Muscle Cell Matrix Metalloproteinases in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* **2005**, *25*, 834–842, doi:10.1183/09031936.05.00072504.
268. Ye, C.L.; Rabinovitch, M. Inhibition of Elastolysis by SC-37698 Reduces Development and Progression of Monocrotaline Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol* **1991**, *261*, H1255–H1267, doi:10.1152/ajpheart.1991.261.4.H1255.
269. Zaidi, S.H.E.; You, X.-M.; Ciura, S.; Husain, M.; Rabinovitch, M. Overexpression of the Serine Elastase Inhibitor Elafin Protects Transgenic Mice from Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Circulation* **2002**, *105*, 516–521, doi:10.1161/hc0402.102866.
270. Kerr, J.S.; Ruppert, C.L.; Tozzi, C.A.; Neubauer, J.A.; Frankel, H.M.; Yu, S.Y.; Riley, D.J. Reduction of Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension in the Rat by an Inhibitor of Collagen Production. *Am Rev Respir Dis* **1987**, *135*, 300–306,

doi:10.1164/arrd.1987.135.2.300.

271. Shi, Y.; Ma, X.; Fang, G.; Tian, X.; Ge, C. Matrix Metalloproteinase Inhibitors (MMPIs) as Attractive Therapeutic Targets: Recent Progress and Current Challenges. *NanoImpact* **2021**, *21*, 100293, doi:10.1016/j.impact.2021.100293.
272. Humbert, M.; Monti, G.; Brenot, F.; Sitbon, O.; Portier, A.; Grangeot-Keros, L.; Duroux, P.; Galanaud, P.; Simonneau, G.; Emilie, D. Increased Interleukin-1 and Interleukin-6 Serum Concentrations in Severe Primary Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **1995**, *151*, 1628–1631, doi:10.1164/ajrccm.151.5.7735624.
273. Itoh, A.; Nishihira, J.; Makita, H.; Miyamoto, K.; Yamaguchi, E.; Nishimura, M. Effects of IL-1beta, TNF-Alpha, and Macrophage Migration Inhibitory Factor on Prostacyclin Synthesis in Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Respirology* **2003**, *8*, 467–472, doi:10.1046/j.1440-1843.2003.00491.x.
274. Prins, K.W.; Archer, S.L.; Pritzker, M.; Rose, L.; Weir, E.K.; Sharma, A.; Thenappan, T. Interleukin-6 Is Independently Associated with Right Ventricular Function in Pulmonary Arterial Hypertension. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **2018**, *37*, 376–384, doi:10.1016/j.healun.2017.08.011.
275. Tamura, Y.; Phan, C.; Tu, L.; Thuillet, R.; Hiress, M.L.; Huertas, A.; Fadel, E.; Simonneau, G.; Humbert, M.; Guignabert, C. IL-6 Receptor Overexpression in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells in Idiopathic Pulmonary Hypertension. *European Respiratory Journal* **2015**, *46*, doi:10.1183/13993003.congress-2015.PA2436.
276. Steiner, M.K.; Syrkina, O.L.; Kolliputi, N.; Mark, E.J.; Hales, C.A.; Waxman, A.B. Interleukin-6 Overexpression Induces Pulmonary Hypertension. *Circulation Research* **2009**, *104*, 236–244, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182014.
277. Savale, L.; Tu, L.; Rideau, D.; Izziki, M.; Maitre, B.; Adnot, S.; Eddahibi, S. Impact of Interleukin-6 on Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension and Lung Inflammation in Mice. *Respiratory Research* **2009**, *10*, 6, doi:10.1186/1465-9921-10-6.
278. Hashimoto-Kataoka, T.; Hosen, N.; Sonobe, T.; Arita, Y.; Yasui, T.; Masaki, T.; Minami, M.; Inagaki, T.; Miyagawa, S.; Sawa, Y.; et al. Interleukin-6/Interleukin-21 Signaling Axis Is Critical in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112*, E2677–E2686, doi:10.1073/pnas.1424774112.
279. *Lung Inflammation in Health and Disease, Volume I*; Wang, Y.-X., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2021; Vol. 1303; ISBN 978-3-030-63045-4.
280. Ross, D.J.; Strieter, R.M.; Fishbein, M.C.; Ardehali, A.; Belperio, J.A. Type I Immune Response Cytokine-Chemokine Cascade Is Associated with Pulmonary Arterial Hypertension. *J Heart Lung Transplant* **2012**, *31*, 865–873, doi:10.1016/j.healun.2012.04.008.
281. Wang, R.; Yuan, T.; Wang, J.; Chen, Y.; Zhao, J.; Li, M.; Fang, L.; Du, G. Immunity and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension: From Pathophysiology Mechanisms to Treatment Perspective. *Pharmacological Research* **2022**, *180*, 106238, doi:10.1016/j.phrs.2022.106238.
282. Sanchez, O.; Marcos, E.; Perros, F.; Fadel, E.; Tu, L.; Humbert, M.; Dartevielle, P.; Simonneau, G.; Adnot, S.; Eddahibi, S. Role of Endothelium-Derived CC Chemokine Ligand 2 in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**, *176*, 1041–1047, doi:10.1164/rccm.200610-1559OC.
283. Dorfmueller, P.; Zarka, V.; Durand-Gasselino, I.; Monti, G.; Balabanian, K.; Garcia, G.; Capron, F.; Coulomb-Lherminé, A.; Marfaing-Koka, A.; Simonneau, G.; et al. Chemokine RANTES in Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, *165*, 534–539, doi:10.1164/ajrccm.165.4.2012112.

284. Price, L.C.; Caramori, G.; Perros, F.; Meng, C.; Gambaryan, N.; Dorfmüller, P.; Montani, D.; Casolari, P.; Zhu, J.; Dimopoulos, K.; et al. Nuclear Factor  $\kappa$ -B Is Activated in the Pulmonary Vessels of Patients with End-Stage Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS One* **2013**, *8*, e75415, doi:10.1371/journal.pone.0075415.
285. Ikeda, Y.; Yonemitsu, Y.; Kataoka, C.; Kitamoto, S.; Yamaoka, T.; Nishida, K.-I.; Takeshita, A.; Egashira, K.; Sueishi, K. Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Attenuates Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2002**, *283*, H2021-2028, doi:10.1152/ajpheart.00919.2001.
286. Nie, X.; Tan, J.; Dai, Y.; Liu, Y.; Zou, J.; Sun, J.; Ye, S.; Shen, C.; Fan, L.; Chen, J.; et al. CCL5 Deficiency Rescues Pulmonary Vascular Dysfunction, and Reverses Pulmonary Hypertension via Caveolin-1-Dependent BMPR2 Activation. *J Mol Cell Cardiol* **2018**, *116*, 41–56, doi:10.1016/j.yjmcc.2018.01.016.
287. McCullagh, B.N.; Costello, C.M.; Li, L.; O’Connell, C.; Codd, M.; Lawrie, A.; Morton, A.; Kiely, D.G.; Condliffe, R.; Elliot, C.; et al. Elevated Plasma CXCL12 $\alpha$  Is Associated with a Poorer Prognosis in Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS One* **2015**, *10*, e0123709, doi:10.1371/journal.pone.0123709.
288. Yang, T.; Li, Z.-N.; Chen, G.; Gu, Q.; Ni, X.-H.; Zhao, Z.-H.; Ye, J.; Meng, X.-M.; Liu, Z.-H.; Xiong, C.-M.; et al. Increased Levels of Plasma CXC-Chemokine Ligand 10, 12 and 16 Are Associated with Right Ventricular Function in Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Heart Lung* **2014**, *43*, 322–327, doi:10.1016/j.hrtlng.2014.04.016.
289. Perros, F.; Dorfmüller, P.; Souza, R.; Durand-Gasselin, I.; Godot, V.; Capel, F.; Adnot, S.; Eddahibi, S.; Mazmanian, M.; Fadel, E.; et al. Fractalkine-Induced Smooth Muscle Cell Proliferation in Pulmonary Hypertension. *European Respiratory Journal* **2007**, *29*, 937–943, doi:10.1183/09031936.00104706.
290. Zhang, J.; Hu, H.; Palma, N.L.; Harrison, J.K.; Mubarak, K.K.; Carrie, R.D.; Alnuaimat, H.; Shen, X.; Luo, D.; Patel, J.M. Hypoxia-Induced Endothelial CX3CL1 Triggers Lung Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Proliferative Expansion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2012**, *303*, L912-922, doi:10.1152/ajplung.00014.2012.
291. Dorfmüller, P.; Chaumais, M.-C.; Giannakouli, M.; Durand-Gasselin, I.; Raymond, N.; Fadel, E.; Mercier, O.; Charlotte, F.; Montani, D.; Simonneau, G.; et al. Increased Oxidative Stress and Severe Arterial Remodeling Induced by Permanent High-Flow Challenge in Experimental Pulmonary Hypertension. *Respiratory Research* **2011**, *12*, 119, doi:10.1186/1465-9921-12-119.
292. Farkas, D.; Kraskauskas, D.; Drake, J.I.; Alhussaini, A.A.; Kraskauskas, V.; Bogaard, H.J.; Cool, C.D.; Voelkel, N.F.; Farkas, L. CXCR4 Inhibition Ameliorates Severe Obliterative Pulmonary Hypertension and Accumulation of C-Kit<sup>+</sup> Cells in Rats. *PLoS One* **2014**, *9*, e89810, doi:10.1371/journal.pone.0089810.
293. Le Hiress, M.; Tu, L.; Ricard, N.; Phan, C.; Thuillet, R.; Fadel, E.; Dorfmüller, P.; Montani, D.; de Man, F.; Humbert, M.; et al. Proinflammatory Signature of the Dysfunctional Endothelium in Pulmonary Hypertension. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor/CD74 Complex. *Am J Respir Crit Care Med* **2015**, *192*, 983–997, doi:10.1164/rccm.201402-0322OC.
294. Huertas, A.; Phan, C.; Bordenave, J.; Tu, L.; Thuillet, R.; Le Hiress, M.; Avouac, J.; Tamura, Y.; Allanore, Y.; Jovan, R.; et al. Regulatory T Cell Dysfunction in Idiopathic, Heritable and Connective Tissue-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **2016**, *149*, 1482–1493, doi:10.1016/j.chest.2016.01.004.
295. Hassoun, P.M.; Mouthon, L.; Barberà, J.A.; Eddahibi, S.; Flores, S.C.; Grimminger, F.; Jones, P.L.; Maitland, M.L.; Michelakis, E.D.; Morrell, N.W.; et al. Inflammation, Growth Factors, and Pulmonary Vascular Remodeling. *Journal of the American College of*

- Cardiology* **2009**, *54*, S10–S19, doi:10.1016/j.jacc.2009.04.006.
296. Heath, D.; Yacoub, M. Lung Mast Cells in Plexogenic Pulmonary Arteriopathy. *J Clin Pathol* **1991**, *44*, 1003–1006, doi:10.1136/jcp.44.12.1003.
297. Tuder, R.M.; Groves, B.; Badesch, D.B.; Voelkel, N.F. Exuberant Endothelial Cell Growth and Elements of Inflammation Are Present in Plexiform Lesions of Pulmonary Hypertension. *Am J Pathol* **1994**, *144*, 275–285.
298. Perros, F.; Dorfmüller, P.; Souza, R.; Durand-Gasselin, I.; Mussot, S.; Mazmanian, M.; Hervé, P.; Emilie, D.; Simonneau, G.; Humbert, M. Dendritic Cell Recruitment in Lesions of Human and Experimental Pulmonary Hypertension. *Eur Respir J* **2007**, *29*, 462–468, doi:10.1183/09031936.00094706.
299. Farha, S.; Sharp, J.; Asosingh, K.; Park, M.; Comhair, S.A.A.; Tang, W.H.W.; Thomas, J.; Farver, C.; Hsieh, F.; Loyd, J.E.; et al. Mast Cell Number, Phenotype, and Function in Human Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulmonary Circulation* **2012**, *2*, 220–228, doi:10.4103/2045-8932.97609.
300. Cohen-Kaminsky, S.; Hautefort, A.; Price, L.; Humbert, M.; Perros, F. Inflammation in Pulmonary Hypertension: What We Know and What We Could Logically and Safely Target First. *Drug Discovery Today* **2014**, *19*, 1251–1256, doi:10.1016/j.drudis.2014.04.007.
301. Perros, F.; Dorfmüller, P.; Montani, D.; Hammad, H.; Waelput, W.; Girerd, B.; Raymond, N.; Mercier, O.; Mussot, S.; Cohen-Kaminsky, S.; et al. Pulmonary Lymphoid Neogenesis in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2012**, *185*, 311–321, doi:10.1164/rccm.201105-0927OC.
302. Kawut, S.M.; Bagiella, E.; Lederer, D.J.; Shimbo, D.; Horn, E.M.; Roberts, K.E.; Hill, N.S.; Barr, R.G.; Rosenzweig, E.B.; Post, W.; et al. Randomized Clinical Trial of Aspirin and Simvastatin for Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2011**, *123*, 2985–2993, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.015693.
303. Lambert, M.; Capuano, V.; Olschewski, A.; Sabourin, J.; Nagaraj, C.; Girerd, B.; Weatherald, J.; Humbert, M.; Antigny, F. Ion Channels in Pulmonary Hypertension: A Therapeutic Interest? *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19103162.
304. Jouen-Tachoire, T.R.H.; Tucker, S.J.; Tamaro, P. Ion Channels as Convergence Points in the Pathology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Biochemical Society Transactions* **2021**, *49*, 1855–1865, doi:10.1042/BST20210538.
305. Yuan, J.X.-J.; Aldinger, A.M.; Juhaszova, M.; Wang, J.; Conte, J.V.; Gaine, S.P.; Orens, J.B.; Rubin, L.J. Dysfunctional Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channels in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Patients With Primary Pulmonary Hypertension. *Circulation* **1998**, *98*, 1400–1406, doi:10.1161/01.CIR.98.14.1400.
306. Feng, J.; Wible, B.; Li, G.-R.; Wang, Z.; Nattel, S. Antisense Oligodeoxynucleotides Directed against Kv1.5 mRNA Specifically Inhibit Ultrarapid Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Current in Cultured Adult Human Atrial Myocytes. *Circulation Research* **1997**, *80*, 572–579, doi:10.1161/01.RES.80.4.572.
307. Boucherat, O.; Chabot, S.; Antigny, F.; Perros, F.; Provencher, S.; Bonnet, S. Potassium Channels in Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* **2015**, *46*, 1167–1177, doi:10.1183/13993003.00798-2015.
308. Cogolludo, A.; Frazziano, G.; Cobeño, L.; Moreno, L.; Lodi, F.; Villamor, E.; Tamargo, J.; Perez-Vizcaino, F. Role of Reactive Oxygen Species in Kv Channel Inhibition and Vasoconstriction Induced by TP Receptor Activation in Rat Pulmonary Arteries. *Ann NY Acad Sci* **2006**, *1091*, 41–51, doi:10.1196/annals.1378.053.
309. Whitman, E.M.; Pisarcik, S.; Luke, T.; Fallon, M.; Wang, J.; Sylvester, J.T.; Semenza, G.L.; Shimoda, L.A. Endothelin-1 Mediates Hypoxia-Induced Inhibition of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Expression in Pulmonary Arterial Myocytes. *Am J Physiol Lung Cell*

- Mol Physiol* **2008**, *294*, L309-318, doi:10.1152/ajplung.00091.2007.
310. Morales-Cano, D.; Menendez, C.; Moreno, E.; Moral-Sanz, J.; Barreira, B.; Galindo, P.; Pandolfi, R.; Jimenez, R.; Moreno, L.; Cogolludo, A.; et al. The Flavonoid Quercetin Reverses Pulmonary Hypertension in Rats. *PLoS One* **2014**, *9*, e114492, doi:10.1371/journal.pone.0114492.
311. Firth, A.L.; Platoshyn, O.; Brevnova, E.E.; Burg, E.D.; Powell, F.; Haddad, G.H.; Yuan, J.X.-J. Hypoxia Selectively Inhibits KCNA5 Channels in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, *1177*, 101–111, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05040.x.
312. Pozeg, Z.I.; Michelakis, E.D.; McMurtry, M.S.; Thébaud, B.; Wu, X.-C.; Dyck, J.R.B.; Hashimoto, K.; Wang, S.; Moudgil, R.; Harry, G.; et al. In Vivo Gene Transfer of the O<sub>2</sub>-Sensitive Potassium Channel Kv1.5 Reduces Pulmonary Hypertension and Restores Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction in Chronically Hypoxic Rats. *Circulation* **2003**, *107*, 2037–2044, doi:10.1161/01.CIR.0000062688.76508.B3.
313. Remillard, C.V.; Tigno, D.D.; Platoshyn, O.; Burg, E.D.; Brevnova, E.E.; Conger, D.; Nicholson, A.; Rana, B.K.; Channick, R.N.; Rubin, L.J.; et al. Function of Kv1.5 Channels and Genetic Variations of KCNA5 in Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* **2007**, *292*, C1837-1853, doi:10.1152/ajpcell.00405.2006.
314. Wipff, J.; Dieudé, P.; Guedj, M.; Ruiz, B.; Riemekasten, G.; Cracowski, J.L.; Matucci-Cerinic, M.; Melchers, I.; Humbert, M.; Hachulla, E.; et al. Association of a KCNA5 Gene Polymorphism with Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension in the European Caucasian Population. *Arthritis Rheum* **2010**, *62*, 3093–3100, doi:10.1002/art.27607.
315. Jiao, Y.-R.; Wang, W.; Lei, P.-C.; Jia, H.-P.; Dong, J.; Gou, Y.-Q.; Chen, C.-L.; Cao, J.; Wang, Y.-F.; Zhu, Y.-K. 5-HTT, BMPR2, EDN1, ENG, KCNA5 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Pulmonary Arterial Hypertension: A Meta-Analysis. *Gene* **2019**, *680*, 34–42, doi:10.1016/j.gene.2018.09.020.
316. Ribeiro Baptista, B.; Petitpain, N.; Gomez, E.; Yelehé-Okouma, M.; Valentin, S.; Guillaumot, A.; Chabot, F.; Chaouat, A. Pulmonary Arterial Hypertension in Patient Treated for Multiple Sclerosis with 4-Aminopyridine. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2019**, *33*, 127–129, doi:10.1111/fcp.12396.
317. Antigny, F.; Chaumais, M.-C.; Humbert, M.; Montani, D. Pulmonary Arterial Hypertension in Patient Treated for Multiple Sclerosis with 4-aminopyridine. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2019**, *33*, doi:10.1111/fcp.12489.
318. Gurney, A.M.; Osipenko, O.N.; MacMillan, D.; McFarlane, K.M.; Tate, R.J.; Kempson, F.E.J. Two-Pore Domain K Channel, TASK-1, in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Circ Res* **2003**, *93*, 957–964, doi:10.1161/01.RES.0000099883.68414.61.
319. Antigny, F.; Hautefort, A.; Meloche, J.; Belacel-Ouari, M.; Manoury, B.; Rucker-Martin, C.; Péchoux, C.; Potus, F.; Nadeau, V.; Tremblay, E.; et al. Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2016**, *133*, 1371–1385, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951.
320. Navas Tejedor, P.; Tenorio Castaño, J.; Palomino Doza, J.; Arias Lajara, P.; Gordo Trujillo, G.; López Meseguer, M.; Román Broto, A.; Lapunzina Abadía, P.; Escribano Subía, P. An Homozygous Mutation in KCNK3 Is Associated with an Aggressive Form of Hereditary Pulmonary Arterial Hypertension. *Clin Genet* **2017**, *91*, 453–457, doi:10.1111/cge.12869.
321. Best, D.H.; Sumner, K.L.; Smith, B.P.; Damjanovich-Colmenares, K.; Nakayama, I.; Brown, L.M.; Ha, Y.; Paul, E.; Morris, A.; Jama, M.A.; et al. EIF2AK4 Mutations in

- Patients Diagnosed With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **2017**, *151*, 821–828, doi:10.1016/j.chest.2016.11.014.
322. Le Ribeuz, H.; Capuano, V.; Girerd, B.; Humbert, M.; Montani, D.; Antigny, F. Implication of Potassium Channels in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1261, doi:10.3390/biom10091261.
  323. Lambert, M.; Capuano, V.; Boet, A.; Tesson, L.; Bertero, T.; Nakhleh, M.K.; Remy, S.; Anegon, I.; Pechoux, C.; Hautefort, A.; et al. Characterization of *Kcnk3* -Mutated Rat, a Novel Model of Pulmonary Hypertension. *Circ Res* **2019**, *125*, 678–695, doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.314793.
  324. Le Ribeuz, H.; Dumont, F.; Ruellou, G.; Lambert, M.; Balliau, T.; Quatre-deniers, M.; Girerd, B.; Cohen-Kaminsky, S.; Mercier, O.; Yen-Nicolaÿ, S.; et al. Proteomic Analysis of KCNK3 Loss of Expression Identified Dysregulated Pathways in Pulmonary Vascular Cells. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 7400, doi:10.3390/ijms21197400.
  325. Zhu, N.; Gonzaga-Jauregui, C.; Welch, C.L.; Ma, L.; Qi, H.; King, A.K.; Krishnan, U.; Rosenzweig, E.B.; Ivy, D.D.; Austin, E.D.; et al. Exome Sequencing in Children With Pulmonary Arterial Hypertension Demonstrates Differences Compared With Adults. *Circ Genom Precis Med* **2018**, *11*, e001887, doi:10.1161/CIRCGEN.117.001887.
  326. Lago-Docampo, M.; Tenorio, J.; Hernández-González, I.; Pérez-Olivares, C.; Escribano-Subías, P.; Pousada, G.; Baloira, A.; Arenas, M.; Lapunzina, P.; Valverde, D. Characterization of Rare ABCC8 Variants Identified in Spanish Pulmonary Arterial Hypertension Patients. *Sci Rep* **2020**, *10*, 15135, doi:10.1038/s41598-020-72089-1.
  327. Ribeuz, H.L.; Lambert, M.; Boet, A.; Montani, D.; Chung, W.K.; Humbert, M.; Antigny, F. SUR1/Kir6.2 Potassium Channel a New Actor Involved in Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* **2020**, *56*, doi:10.1183/13993003.congress-2020.3561.
  328. Gelinias, S.M.; Benson, C.E.; Khan, M.A.; Berger, R.M.F.; Trembath, R.C.; Machado, R.D.; Southgate, L. Whole Exome Sequence Analysis Provides Novel Insights into the Genetic Framework of Childhood-Onset Pulmonary Arterial Hypertension. *Genes (Basel)* **2020**, *11*, 1328, doi:10.3390/genes11111328.
  329. Harakalova, M.; van Harsseel, J.J.T.; Terhal, P.A.; van Lieshout, S.; Duran, K.; Renkens, I.; Amor, D.J.; Wilson, L.C.; Kirk, E.P.; Turner, C.L.S.; et al. Dominant Missense Mutations in ABCC9 Cause Cantú Syndrome. *Nat Genet* **2012**, *44*, 793–796, doi:10.1038/ng.2324.
  330. Le Ribeuz, H.; Masson, B.; Dutheil, M.; Boët, A.; Beauvais, A.; Sabourin, J.; De Montpreville, V.T.; Capuano, V.; Mercier, O.; Humbert, M.; et al. Involvement of SUR2/Kir6.1 Channel in the Physiopathology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Cardiovasc Med* **2023**, *9*, 1066047, doi:10.3389/fcvm.2022.1066047.
  331. Pedemonte, N.; Galiotta, L.J.V. Structure and Function of TMEM16 Proteins (Anoctamins). *Physiological Reviews* **2014**, *94*, 419–459, doi:10.1152/physrev.00039.2011.
  332. Leblanc, N.; Forrest, A.S.; Ayon, R.J.; Wiwchar, M.; Angermann, J.E.; Pritchard, H.A.T.; Singer, C.A.; Valencik, M.L.; Britton, F.; Greenwood, I.A. Molecular and Functional Significance of Ca<sup>2+</sup>-Activated Cl<sup>-</sup> Channels in Pulmonary Arterial Smooth Muscle. *Pulm Circ* **2015**, *5*, 244–268, doi:10.1086/680189.
  333. Papp, R.; Nagaraj, C.; Zabini, D.; Nagy, B.M.; Lengyel, M.; Maurer, D.S.; Sharma, N.; Egemnazarov, B.; Kovacs, G.; Kwapiszewska, G.; et al. Targeting TMEM16A to Reverse Vasoconstriction and Remodelling in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* **2019**, *53*, doi:10.1183/13993003.00965-2018.
  334. Skofic Maurer, D.; Zabini, D.; Nagaraj, C.; Sharma, N.; Lengyel, M.; Nagy, B.M.; Frank, S.; Klepetko, W.; Gschwandtner, E.; Enyedi, P.; et al. Endothelial Dysfunction Following

- Enhanced TMEM16A Activity in Human Pulmonary Arteries. *Cells* **2020**, *9*, 1984, doi:10.3390/cells9091984.
335. Ribeuz, H.L.; To, L.; Ghigna, M.-R.; Martin, C.; Nagaraj, C.; Dreano, E.; Rucker-Martin, C.; Girerd, B.; Bouligand, J.; Pechoux, C.; et al. Involvement of CFTR in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* **2021**, *58*, doi:10.1183/13993003.00653-2020.
336. Declercq, M.; Zeeuw, P. de; Conchinha, N.V.; Geldhof, V.; Ramalho, A.S.; García-Caballero, M.; Brepoels, K.; Ensink, M.; Carlon, M.S.; Bird, M.J.; et al. Transcriptomic Analysis of CFTR-Impaired Endothelial Cells Reveals a pro-Inflammatory Phenotype. *European Respiratory Journal* **2021**, *57*, doi:10.1183/13993003.00261-2020.
337. Antigny, F.; Ribeuz, H.L.; Humbert, M.; Montani, D. Comment on: Transcriptomic Analysis of CFTR-Impaired Endothelial Cells Reveals a pro-Inflammatory Phenotype. *European Respiratory Journal* **2021**, *58*, doi:10.1183/13993003.01365-2021.
338. Geraci, M.W.; Moore, M.; Gesell, T.; Yeager, M.E.; Alger, L.; Golpon, H.; Gao, B.; Loyd, J.E.; Tuder, R.M.; Voelkel, N.F. Gene Expression Patterns in the Lungs of Patients with Primary Pulmonary Hypertension: A Gene Microarray Analysis. *Circ Res* **2001**, *88*, 555–562, doi:10.1161/01.res.88.6.555.
339. Leggett, K.; Maylor, J.; Udem, C.; Lai, N.; Lu, W.; Schweitzer, K.; King, L.S.; Myers, A.C.; Sylvester, J.T.; Sidhaye, V.; et al. Hypoxia-Induced Migration in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells Requires Calcium-Dependent Upregulation of Aquaporin 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2012**, *303*, L343–353, doi:10.1152/ajplung.00130.2012.
340. Schuoler, C.; Haider, T.J.; Leuenberger, C.; Vogel, J.; Ostergaard, L.; Kwapiszewska, G.; Kohler, M.; Gassmann, M.; Huber, L.C.; Brock, M. Aquaporin 1 Controls the Functional Phenotype of Pulmonary Smooth Muscle Cells in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Basic Res Cardiol* **2017**, *112*, 30, doi:10.1007/s00395-017-0620-7.
341. Yun, X.; Philip, N.M.; Jiang, H.; Smith, Z.; Huetsch, J.C.; Damarla, M.; Suresh, K.; Shimoda, L.A. Upregulation of Aquaporin 1 Mediates Increased Migration and Proliferation in Pulmonary Vascular Cells From the Rat SU5416/Hypoxia Model of Pulmonary Hypertension. *Front Physiol* **2021**, *12*, 763444, doi:10.3389/fphys.2021.763444.
342. Vassiliou, A.G.; Keskinidou, C.; Kotanidou, A.; Frantzeskaki, F.; Dimopoulou, I.; Langleben, D.; Orfanos, S.E. Knockdown of Bone Morphogenetic Protein Type II Receptor Leads to Decreased Aquaporin 1 Expression and Function in Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells. *Can J Physiol Pharmacol* **2020**, *98*, 834–839, doi:10.1139/cjpp-2020-0185.
343. Sitbon, O.; Humbert, M.; Jaïs, X.; Iqbal, V.; Hamid, A.M.; Provencher, S.; Garcia, G.; Parent, F.; Hervé, P.; Simonneau, G. Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2005**, *111*, 3105–3111, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.488486.
344. Clozel, M.; Maresta, A.; Humbert, M. Endothelin Receptor Antagonists. In *Pharmacotherapy of Pulmonary Hypertension*; Humbert, M., Evgenov, O.V., Stasch, J.-P., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; Vol. 218, pp. 199–227 ISBN 978-3-642-38663-3.
345. Galiè, N.; Olschewski, H.; Oudiz, R.J.; Torres, F.; Frost, A.; Ghofrani, H.A.; Badesch, D.B.; McGoona, M.D.; McLaughlin, V.V.; Roecker, E.B.; et al. Ambrisentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2008**, *117*, 3010–3019, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.742510.
346. Pulido, T.; Adzerikho, I.; Channick, R.N.; Delcroix, M.; Galiè, N.; Ghofrani, H.-A.; Jansa, P.; Jing, Z.-C.; Le Brun, F.-O.; Mehta, S.; et al. Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **2013**, *369*, 809–818,

doi:10.1056/NEJMoa1213917.

347. Rubin, L.J.; Badesch, D.B.; Barst, R.J.; Galiè, N.; Black, C.M.; Keogh, A.; Pulido, T.; Frost, A.; Roux, S.; Leconte, I.; et al. Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine* **2002**, *346*, 896–903, doi:10.1056/NEJMoa012212.
348. Galiè, N.; Brundage, B.H.; Ghofrani, H.A.; Oudiz, R.J.; Simonneau, G.; Safdar, Z.; Shapiro, S.; White, R.J.; Chan, M.; Beardsworth, A.; et al. Tadalafil Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2009**, *119*, 2894–2903, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.839274.
349. Galiè, N.; Ghofrani, H.A.; Torbicki, A.; Barst, R.J.; Rubin, L.J.; Badesch, D.; Fleming, T.; Parpia, T.; Burgess, G.; Branzi, A.; et al. Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine* **2005**, *353*, 2148–2157, doi:10.1056/NEJMoa050010.
350. Schermuly, R.T.; Janssen, W.; Weissmann, N.; Stasch, J.-P.; Grimminger, F.; Ghofrani, H.A. Riociguat for the Treatment of Pulmonary Hypertension. *Expert Opin Investig Drugs* **2011**, *20*, 567–576, doi:10.1517/13543784.2011.565048.
351. Sitbon, O.; Delcroix, M.; Bergot, E.; Boonstra, A.B.; Granton, J.; Langleben, D.; Subías, P.E.; Galiè, N.; Pfister, T.; Lemarié, J.-C.; et al. EPITOME-2: An Open-Label Study Assessing the Transition to a New Formulation of Intravenous Epoprostenol in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Am Heart J* **2014**, *167*, 210–217, doi:10.1016/j.ahj.2013.08.007.
352. Simonneau, G.; Barst, R.J.; Galie, N.; Naeije, R.; Rich, S.; Bourge, R.C.; Keogh, A.; Oudiz, R.; Frost, A.; Blackburn, S.D.; et al. Continuous Subcutaneous Infusion of Treprostinil, a Prostacyclin Analogue, in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, *165*, 800–804, doi:10.1164/ajrccm.165.6.2106079.
353. Olschewski, H.; Simonneau, G.; Galiè, N.; Higenbottam, T.; Naeije, R.; Rubin, L.J.; Nikkho, S.; Speich, R.; Hoepfer, M.M.; Behr, J.; et al. Inhaled Iloprost for Severe Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* **2002**, *347*, 322–329, doi:10.1056/NEJMoa020204.
354. Simonneau, G.; Torbicki, A.; Hoepfer, M.M.; Delcroix, M.; Karlócai, K.; Galiè, N.; Degano, B.; Bonderman, D.; Kurzyna, M.; Efficace, M.; et al. Selexipag: An Oral, Selective Prostacyclin Receptor Agonist for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* **2012**, *40*, 874–880, doi:10.1183/09031936.00137511.
355. Torres, F.; Farber, H.; Ristic, A.; McLaughlin, V.; Adams, J.; Zhang, J.; Klassen, P.; Shanahan, W.; Grundy, J.; Hoffmann, I.; et al. Efficacy and Safety of Ralinepag, a Novel Oral IP Agonist, in PAH Patients on Mono or Dual Background Therapy: Results from a Phase 2 Randomised, Parallel Group, Placebo-Controlled Trial. *European Respiratory Journal* **2019**, *54*, doi:10.1183/13993003.01030-2019.
356. Humbert, M.; McLaughlin, V.; Gibbs, J.S.R.; Gomberg-Maitland, M.; Hoepfer, M.M.; Preston, I.R.; Souza, R.; Waxman, A.; Escribano Subias, P.; Feldman, J.; et al. Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **2021**, *384*, 1204–1215, doi:10.1056/NEJMoa2024277.
357. Hoepfer, M.M.; Badesch, D.B.; Ghofrani, H.A.; Gibbs, J.S.R.; Gomberg-Maitland, M.; McLaughlin, V.V.; Preston, I.R.; Souza, R.; Waxman, A.B.; Grünig, E.; et al. Phase 3 Trial of Sotatercept for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine* **2023**, *388*, 1478–1490, doi:10.1056/NEJMoa2213558.
358. Christie, J.D.; Edwards, L.B.; Kucheryavaya, A.Y.; Benden, C.; Dipchand, A.I.; Dobbels, F.; Kirk, R.; Rahmel, A.O.; Stehlik, J.; Hertz, M.I. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th Adult Lung and Heart-Lung Transplant

- Report—2012. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **2012**, *31*, 1073–1086, doi:10.1016/j.healun.2012.08.004.
359. Yusen, R.D.; Edwards, L.B.; Kucheryavaya, A.Y.; Benden, C.; Dipchand, A.I.; Goldfarb, S.B.; Levvey, B.J.; Lund, L.H.; Meiser, B.; Rossano, J.W.; et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-Second Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **2015**, *34*, 1264–1277, doi:10.1016/j.healun.2015.08.014.
360. Bootman, M.D.; Collins, T.J.; Peppiatt, C.M.; Prothero, L.S.; MacKenzie, L.; De Smet, P.; Travers, M.; Tovey, S.C.; Seo, J.T.; Berridge, M.J.; et al. Calcium Signalling--an Overview. *Semin Cell Dev Biol* **2001**, *12*, 3–10, doi:10.1006/scdb.2000.0211.
361. Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Roderick, H.L. Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, *4*, 517–529, doi:10.1038/nrm1155.
362. Clapham, D.E. Calcium Signaling. *Cell* **2007**, *131*, 1047–1058, doi:10.1016/j.cell.2007.11.028.
363. Stutzmann, G.E.; Mattson, M.P. Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Handling in Excitable Cells in Health and Disease. *Pharmacol Rev* **2011**, *63*, 700–727, doi:10.1124/pr.110.003814.
364. Reuter, H. The Dependence of Slow Inward Current in Purkinje Fibres on the Extracellular Calcium-Concentration. *The Journal of Physiology* **1967**, *192*, 479–492, doi:10.1113/jphysiol.1967.sp008310.
365. Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F.J. Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflugers Arch* **1981**, *391*, 85–100, doi:10.1007/BF00656997.
366. Fleckenstein, A. History of Calcium Antagonists. *Circ Res* **1983**, *52*, I3–16.
367. Snutch, T.P.; Peloquin, J.; Mathews, E.; McRory, J.E. Molecular Properties of Voltage-Gated Calcium Channels. In *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*; Landes Bioscience, 2013.
368. Catterall, W.A. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, *3*, a003947, doi:10.1101/cshperspect.a003947.
369. Moosmang, S.; Schulla, V.; Welling, A.; Feil, R.; Feil, S.; Wegener, J.W.; Hofmann, F.; Klugbauer, N. Dominant Role of Smooth Muscle L-Type Calcium Channel Cav1.2 for Blood Pressure Regulation. *EMBO J* **2003**, *22*, 6027–6034, doi:10.1093/emboj/cdg583.
370. McMurtry, I.F.; Davidson, A.B.; Reeves, J.T.; Grover, R.F. Inhibition of Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction by Calcium Antagonists in Isolated Rat Lungs. *Circulation Research* **1976**, *38*, 99–104, doi:10.1161/01.RES.38.2.99.
371. Luke, T.; Maylor, J.; Udem, C.; Sylvester, J.T.; Shimoda, L.A. Kinase-Dependent Activation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels by ET-1 in Pulmonary Arterial Myocytes during Chronic Hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2012**, *302*, L1128–1139, doi:10.1152/ajplung.00396.2011.
372. Ghosh, D.; Syed, A.U.; Prada, M.P.; Nystoriak, M.A.; Santana, L.F.; Nieves-Cintrón, M.; Navedo, M.F. Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Adv Pharmacol* **2017**, *78*, 49–87, doi:10.1016/bs.apha.2016.08.002.
373. Rodman, D.M.; Reese, K.; Harral, J.; Fouty, B.; Wu, S.; West, J.; Hoedt-Miller, M.; Tada, Y.; Li, K.-X.; Cool, C.; et al. Low-Voltage-Activated (T-Type) Calcium Channels Control Proliferation of Human Pulmonary Artery Myocytes. *Circ Res* **2005**, *96*, 864–872, doi:10.1161/01.RES.0000163066.07472.ff.
374. Wan, J.; Yamamura, A.; Zimnicka, A.M.; Voiriot, G.; Smith, K.A.; Tang, H.; Ayon, R.J.; Choudhury, M.S.R.; Ko, E.A.; Wang, J.; et al. Chronic Hypoxia Selectively Enhances L-

- and T-Type Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Activity in Pulmonary Artery by Upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2013**, *305*, L154-164, doi:10.1152/ajplung.00313.2012.
375. Chevalier, M.; Gilbert, G.; Roux, E.; Lory, P.; Marthan, R.; Savineau, J.-P.; Quignard, J.-F. T-Type Calcium Channels Are Involved in Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Cardiovasc Res* **2014**, *103*, 597–606, doi:10.1093/cvr/cvu166.
376. Gilbert, G.; Courtois, A.; Dubois, M.; Cussac, L.-A.; Ducret, T.; Lory, P.; Marthan, R.; Savineau, J.-P.; Quignard, J.-F. T-Type Voltage Gated Calcium Channels Are Involved in Endothelium-Dependent Relaxation of Mice Pulmonary Artery. *Biochem Pharmacol* **2017**, *138*, 61–72, doi:10.1016/j.bcp.2017.04.021.
377. Putney, J.W. A Model for Receptor-Regulated Calcium Entry. *Cell Calcium* **1986**, *7*, 1–12, doi:10.1016/0143-4160(86)90026-6.
378. Hoth, M.; Penner, R. Depletion of Intracellular Calcium Stores Activates a Calcium Current in Mast Cells. *Nature* **1992**, *355*, 353–356, doi:10.1038/355353a0.
379. Zweifach, A.; Lewis, R.S. Slow Calcium-Dependent Inactivation of Depletion-Activated Calcium Current. STORE-DEPENDENT AND -INDEPENDENT MECHANISMS \*. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 14445–14451, doi:10.1074/jbc.270.24.14445.
380. Roos, J.; DiGregorio, P.J.; Yeromin, A.V.; Ohlsen, K.; Lioudyno, M.; Zhang, S.; Safrina, O.; Kozak, J.A.; Wagner, S.L.; Cahalan, M.D.; et al. STIM1, an Essential and Conserved Component of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channel Function. *J Cell Biol* **2005**, *169*, 435–445, doi:10.1083/jcb.200502019.
381. Liou, J.; Kim, M.L.; Heo, W.D.; Jones, J.T.; Myers, J.W.; Ferrell, J.E.; Meyer, T. STIM Is a Ca<sup>2+</sup> Sensor Essential for Ca<sup>2+</sup>-Store-Depletion-Triggered Ca<sup>2+</sup> Influx. *Curr Biol* **2005**, *15*, 1235–1241, doi:10.1016/j.cub.2005.05.055.
382. Feske, S.; Gwack, Y.; Prakriya, M.; Srikanth, S.; Puppel, S.-H.; Tanasa, B.; Hogan, P.G.; Lewis, R.S.; Daly, M.; Rao, A. A Mutation in Orai1 Causes Immune Deficiency by Abrogating CRAC Channel Function. *Nature* **2006**, *441*, 179–185, doi:10.1038/nature04702.
383. Feske, S.; Prakriya, M.; Rao, A.; Lewis, R.S. A Severe Defect in CRAC Ca<sup>2+</sup> Channel Activation and Altered K<sup>+</sup> Channel Gating in T Cells from Immunodeficient Patients. *Journal of Experimental Medicine* **2005**, *202*, 651–662, doi:10.1084/jem.20050687.
384. Zhang, S.L.; Yeromin, A.V.; Zhang, X.H.-F.; Yu, Y.; Safrina, O.; Penna, A.; Roos, J.; Stauderman, K.A.; Cahalan, M.D. Genome-Wide RNAi Screen of Ca(2+) Influx Identifies Genes That Regulate Ca(2+) Release-Activated Ca(2+) Channel Activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 9357–9362, doi:10.1073/pnas.0603161103.
385. Yeromin, A.V.; Zhang, S.L.; Jiang, W.; Yu, Y.; Safrina, O.; Cahalan, M.D. Molecular Identification of the CRAC Channel by Altered Ion Selectivity in a Mutant of Orai. *Nature* **2006**, *443*, 226–229, doi:10.1038/nature05108.
386. Vig, M.; Peinelt, C.; Beck, A.; Koomoa, D.L.; Rabah, D.; Koblan-Huberson, M.; Kraft, S.; Turner, H.; Fleig, A.; Penner, R.; et al. CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Science* **2006**, *312*, 1220–1223, doi:10.1126/science.1127883.
387. Prakriya, M.; Feske, S.; Gwack, Y.; Srikanth, S.; Rao, A.; Hogan, P.G. Orai1 Is an Essential Pore Subunit of the CRAC Channel. *Nature* **2006**, *443*, 230–233, doi:10.1038/nature05122.
388. Parekh, A.B.; Penner, R. Store Depletion and Calcium Influx. *Physiol Rev* **1997**, *77*, 901–930, doi:10.1152/physrev.1997.77.4.901.
389. Williams, R.T.; Manji, S.S.; Parker, N.J.; Hancock, M.S.; Van Stekelenburg, L.; Eid, J.P.; Senior, P.V.; Kazenwadel, J.S.; Shandala, T.; Saint, R.; et al. Identification and Characterization of the STIM (Stromal Interaction Molecule) Gene Family: Coding for a

- Novel Class of Transmembrane Proteins. *Biochem J* **2001**, *357*, 673–685.
390. Stathopulos, P.B.; Li, G.-Y.; Plevin, M.J.; Ames, J.B.; Ikura, M. Stored Ca<sup>2+</sup> Depletion-Induced Oligomerization of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM Region. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 35855–35862, doi:10.1074/jbc.M608247200.
391. Spassova, M.A.; Soboloff, J.; He, L.-P.; Xu, W.; Dziadek, M.A.; Gill, D.L. STIM1 Has a Plasma Membrane Role in the Activation of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 4040–4045, doi:10.1073/pnas.0510050103.
392. Mercer, J.C.; DeHaven, W.I.; Smyth, J.T.; Wedel, B.; Boyles, R.R.; Bird, G.S.; Putney, J.W. LARGE STORE-OPERATED CALCIUM-SELECTIVE CURRENTS DUE TO CO-EXPRESSION OF ORAI1 OR ORAI2 WITH THE INTRACELLULAR CALCIUM SENSOR, STIM1. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 24979–24990, doi:10.1074/jbc.M604589200.
393. Stathopulos, P.B.; Zheng, L.; Ikura, M. Stromal Interaction Molecule (STIM) 1 and STIM2 Calcium Sensing Regions Exhibit Distinct Unfolding and Oligomerization Kinetics\*. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 728–732, doi:10.1074/jbc.C800178200.
394. Kim, C.A.; Bowie, J.U. SAM Domains: Uniform Structure, Diversity of Function. *Trends in Biochemical Sciences* **2003**, *28*, 625–628, doi:10.1016/j.tibs.2003.11.001.
395. Stathopulos, P.B.; Schindl, R.; Fahrner, M.; Zheng, L.; Gasmi-Seabrook, G.M.; Muik, M.; Romanin, C.; Ikura, M. STIM1/Orai1 Coiled-Coil Interplay in the Regulation of Store-Operated Calcium Entry. *Nat Commun* **2013**, *4*, doi:10.1038/ncomms3963.
396. Fahrner, M.; Muik, M.; Schindl, R.; Butorac, C.; Stathopulos, P.; Zheng, L.; Jardin, I.; Ikura, M.; Romanin, C. A Coiled-Coil Clamp Controls Both Conformation and Clustering of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1). *J Biol Chem* **2014**, *289*, 33231–33244, doi:10.1074/jbc.M114.610022.
397. Muik, M.; Fahrner, M.; Schindl, R.; Stathopulos, P.; Frischauf, I.; Derler, I.; Plenk, P.; Lackner, B.; Groschner, K.; Ikura, M.; et al. STIM1 Couples to ORAI1 via an Intramolecular Transition into an Extended Conformation. *The EMBO Journal* **2011**, *30*, 1678–1689, doi:10.1038/emboj.2011.79.
398. Kim, M.S.; Zeng, W.; Yuan, J.P.; Shin, D.M.; Worley, P.F.; Muallem, S. Native Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Influx Requires the Channel Function of Orai1 and TRPC1. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 9733–9741, doi:10.1074/jbc.M808097200.
399. Yuan, J.P.; Zeng, W.; Dorwart, M.R.; Choi, Y.-J.; Worley, P.F.; Muallem, S. SOAR and the Polybasic STIM1 Domains Gate and Regulate Orai Channels. *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, 337–343, doi:10.1038/ncb1842.
400. Park, C.Y.; Shcheglovitov, A.; Dolmetsch, R. The CRAC Channel Activator STIM1 Binds and Inhibits L-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Science* **2010**, *330*, 101–105, doi:10.1126/science.1191027.
401. Liou, J.; Fivaz, M.; Inoue, T.; Meyer, T. Live-Cell Imaging Reveals Sequential Oligomerization and Local Plasma Membrane Targeting of Stromal Interaction Molecule 1 after Ca<sup>2+</sup> Store Depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 9301–9306, doi:10.1073/pnas.0702866104.
402. Korzeniowski, M.K.; Manjarrés, I.M.; Varnai, P.; Balla, T. ACTIVATION OF STIM1-ORAI1 INVOLVES AN INTRAMOLECULAR SWITCHING MECHANISM. *Sci Signal* **2010**, *3*, ra82, doi:10.1126/scisignal.2001122.
403. Brandman, O.; Liou, J.; Park, W.S.; Meyer, T. STIM2 Is a Feedback Regulator That Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Levels. *Cell* **2007**, *131*, 1327–1339, doi:10.1016/j.cell.2007.11.039.
404. Zhou, Y.; Mancarella, S.; Wang, Y.; Yue, C.; Ritchie, M.; Gill, D.L.; Soboloff, J. The Short N-Terminal Domains of STIM1 and STIM2 Control the Activation Kinetics of

- Orai1 Channels. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 19164–19168, doi:10.1074/jbc.C109.010900.
405. Lewis, R.S. Store-Operated Calcium Channels: From Function to Structure and Back Again. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2020**, *12*, doi:10.1101/cshperspect.a035055.
406. Darbellay, B.; Arnaudeau, S.; Bader, C.R.; Konig, S.; Bernheim, L. STIM1L Is a New Actin-Binding Splice Variant Involved in Fast Repetitive Ca<sup>2+</sup> Release. *12*.
407. Saüc, S.; Bulla, M.; Nunes, P.; Orci, L.; Marchetti, A.; Antigny, F.; Bernheim, L.; Cosson, P.; Frieden, M.; Demaurex, N. STIM1L Traps and Gates Orai1 Channels without Remodeling the Cortical ER. *J Cell Sci* **2015**, *128*, 1568–1579, doi:10.1242/jcs.164228.
408. Antigny, F.; Sabourin, J.; Saüc, S.; Bernheim, L.; Koenig, S.; Frieden, M. TRPC1 and TRPC4 Channels Functionally Interact with STIM1L to Promote Myogenesis and Maintain Fast Repetitive Ca<sup>2+</sup> Release in Human Myotubes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2017**, *1864*, 806–813, doi:10.1016/j.bbamcr.2017.02.003.
409. Dyrda, A.; Koenig, S.; Frieden, M. STIM1 Long and STIM1 Gate Differently TRPC1 during Store-Operated Calcium Entry. *Cell Calcium* **2020**, *86*, 102134, doi:10.1016/j.ceca.2019.102134.
410. Ramesh, G.; Jarzembowski, L.; Schwarz, Y.; Poth, V.; Konrad, M.; Knapp, M.L.; Schwär, G.; Lauer, A.A.; Grimm, M.O.W.; Alansary, D.; et al. A Short Isoform of STIM1 Confers Frequency-Dependent Synaptic Enhancement. *Cell Reports* **2021**, *34*, doi:10.1016/j.celrep.2021.108844.
411. Miederer, A.-M.; Alansary, D.; Schwär, G.; Lee, P.-H.; Jung, M.; Helms, V.; Niemeyer, B.A. A STIM2 Splice Variant Negatively Regulates Store-Operated Calcium Entry. *Nat Commun* **2015**, *6*, doi:10.1038/ncomms7899.
412. Rana, A.; Yen, M.; Sadaghiani, A.M.; Malmersjö, S.; Park, C.Y.; Dolmetsch, R.E.; Lewis, R.S. Alternative Splicing Converts STIM2 from an Activator to an Inhibitor of Store-Operated Calcium Channels. *J Cell Biol* **2015**, *209*, 653–670, doi:10.1083/jcb.201412060.
413. Gwack, Y.; Srikanth, S.; Feske, S.; Cruz-Guilloty, F.; Oh-hora, M.; Neems, D.S.; Hogan, P.G.; Rao, A. Biochemical and Functional Characterization of Orai Proteins\*. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 16232–16243, doi:10.1074/jbc.M609630200.
414. Gross, S.A.; Wissenbach, U.; Philipp, S.E.; Freichel, M.; Cavalié, A.; Flockerzi, V. Murine ORAI2 Splice Variants Form Functional Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) Channels\*. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 19375–19384, doi:10.1074/jbc.M701962200.
415. Motiani, R.K.; Abdullaev, I.F.; Trebak, M. A Novel Native Store-Operated Calcium Channel Encoded by Orai3: SELECTIVE REQUIREMENT OF Orai3 VERSUS Orai1 IN ESTROGEN RECEPTOR-POSITIVE VERSUS ESTROGEN RECEPTOR-NEGATIVE BREAST CANCER CELLS\*. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 19173–19183, doi:10.1074/jbc.M110.102582.
416. Lis, A.; Peinelt, C.; Beck, A.; Parvez, S.; Monteilh-Zoller, M.; Fleig, A.; Penner, R. CRACM1, CRACM2, and CRACM3 Are Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels with Distinct Functional Properties. *Current Biology* **2007**, *17*, 794–800, doi:10.1016/j.cub.2007.03.065.
417. Hoth, M.; Niemeyer, B.A. Chapter Ten - The Neglected CRAC Proteins: Orai2, Orai3, and STIM2. In *Current Topics in Membranes*; Prakriya, M., Ed.; Store-Operated Calcium Channels; Academic Press, 2013; Vol. 71, pp. 237–271.
418. Fukushima, M.; Tomita, T.; Janoshazi, A.; Putney, J.W. Alternative Translation Initiation Gives Rise to Two Isoforms of Orai1 with Distinct Plasma Membrane Mobilities. *Journal of Cell Science* **2012**, *125*, 4354–4361, doi:10.1242/jcs.104919.
419. Desai, P.N.; Zhang, X.; Wu, S.; Janoshazi, A.; Bolimuntha, S.; Putney, J.W.; Trebak, M. Multiple Types of Calcium Channels Arising from Alternative Translation Initiation of the Orai1 Message. *Sci. Signal.* **2015**, *8*, ra74–ra74, doi:10.1126/scisignal.aaa8323.

420. Jardin, I.; Alvarado, S.; Sanchez-Collado, J.; Nieto-Felipe, J.; Lopez, J.J.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Functional Differences in Agonist-Induced Plasma Membrane Expression of Orai1 $\alpha$  and Orai1 $\beta$ . *Journal of Cellular Physiology* n/a, doi:10.1002/jcp.31055.
421. Hou, X.; Pedi, L.; Diver, M.M.; Long, S.B. Crystal Structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai. *Science* **2012**, 338, 1308–1313, doi:10.1126/science.1228757.
422. Derler, I.; Plenk, P.; Fahrner, M.; Muik, M.; Jardin, I.; Schindl, R.; Gruber, H.J.; Groschner, K.; Romanin, C. The Extended Transmembrane Orai1 N-Terminal (ETON) Region Combines Binding Interface and Gate for Orai1 Activation by STIM1 $\diamond$ . *J Biol Chem* **2013**, 288, 29025–29034, doi:10.1074/jbc.M113.501510.
423. Prakriya, M.; Lewis, R.S. Regulation of CRAC Channel Activity by Recruitment of Silent Channels to a High Open-Probability Gating Mode. *J Gen Physiol* **2006**, 128, 373–386, doi:10.1085/jgp.200609588.
424. McNally, B.A.; Yamashita, M.; Engh, A.; Prakriya, M. Structural Determinants of Ion Permeation in CRAC Channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, 22516–22521, doi:10.1073/pnas.0909574106.
425. Beck, A.; Fleig, A.; Penner, R.; Peinelt, C. Regulation of Endogenous and Heterologous Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Currents by PH\*. *Cell Calcium* **2014**, 56, 235–243, doi:10.1016/j.ceca.2014.07.011.
426. Bogeski, I.; Al-Ansary, D.; Qu, B.; Niemeyer, B.A.; Hoth, M.; Peinelt, C. Pharmacology of ORAI Channels as a Tool to Understand Their Physiological Functions. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **2010**, 3, 291–303, doi:10.1586/ecp.10.23.
427. He, L.-P.; Hewavitharana, T.; Soboloff, J.; Spassova, M.A.; Gill, D.L. A Functional Link between Store-Operated and TRPC Channels Revealed by the 3,5-Bis(Trifluoromethyl)Pyrazole Derivative, BTP2. *J Biol Chem* **2005**, 280, 10997–11006, doi:10.1074/jbc.M411797200.
428. Takezawa, R.; Cheng, H.; Beck, A.; Ishikawa, J.; Launay, P.; Kubota, H.; Kinet, J.-P.; Fleig, A.; Yamada, T.; Penner, R. A Pyrazole Derivative Potently Inhibits Lymphocyte Ca<sup>2+</sup> Influx and Cytokine Production by Facilitating Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Activity. *Mol Pharmacol* **2006**, 69, 1413–1420.
429. Ishikawa, J.; Ohga, K.; Yoshino, T.; Takezawa, R.; Ichikawa, A.; Kubota, H.; Yamada, T. A Pyrazole Derivative, YM-58483, Potently Inhibits Store-Operated Sustained Ca<sup>2+</sup> Influx and IL-2 Production in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* **2003**, 170, 4441–4449, doi:10.4049/jimmunol.170.9.4441.
430. Zitt, C.; Strauss, B.; Schwarz, E.C.; Spaeth, N.; Rast, G.; Hatzelmann, A.; Hoth, M. Potent Inhibition of Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels and T-Lymphocyte Activation by the Pyrazole Derivative BTP2\*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 12427–12437, doi:10.1074/jbc.M309297200.
431. Schleifer, H.; Doleschal, B.; Lichtenegger, M.; Oppenrieder, R.; Derler, I.; Frischauf, I.; Glasnov, T.; Kappe, C.; Romanin, C.; Groschner, K. Novel Pyrazole Compounds for Pharmacological Discrimination between Receptor-Operated and Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Pathways. *Br J Pharmacol* **2012**, 167, 1712–1722, doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02126.x.
432. Zhang, X.; Xin, P.; Yoast, R.E.; Emrich, S.M.; Johnson, M.T.; Pathak, T.; Benson, J.C.; Azimi, I.; Gill, D.L.; Monteith, G.R.; et al. Distinct Pharmacological Profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 Channels. *Cell Calcium* **2020**, 91, 102281, doi:10.1016/j.ceca.2020.102281.
433. Derler, I.; Schindl, R.; Fritsch, R.; Heftberger, P.; Riedl, M.C.; Begg, M.; House, D.; Romanin, C. The Action of Selective CRAC Channel Blockers Is Affected by the Orai Pore Geometry. *Cell Calcium* **2013**, 53, 139–151, doi:10.1016/j.ceca.2012.11.005.

434. Waldron, R.T.; Chen, Y.; Pham, H.; Go, A.; Su, H.-Y.; Hu, C.; Wen, L.; Husain, S.Z.; Sugar, C.A.; Roos, J.; et al. The Orai Ca<sup>2+</sup> Channel Inhibitor CM4620 Targets Both Parenchymal and Immune Cells to Reduce Inflammation in Experimental Acute Pancreatitis. *J Physiol* **2019**, *597*, 3085–3105, doi:10.1113/JP277856.
435. Shower, H.; Norman, K.; Cheng, C.W.; Foster, R.; Beech, D.J.; Bailey, M.A. Orai1 Ca<sup>2+</sup> Channel as a Therapeutic Target in Pathological Vascular Remodelling. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.653812.
436. Waldherr, L.; Tiffner, A.; Mishra, D.; Sallinger, M.; Schober, R.; Frischauf, I.; Schmidt, T.; Handl, V.; Sagmeister, P.; Köckinger, M.; et al. Blockage of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Influx by Synta66 Is Mediated by Direct Inhibition of the Ca<sup>2+</sup> Selective Orai1 Pore. *Cancers* **2020**, *12*, 2876, doi:10.3390/cancers12102876.
437. Ng, S.W.; di Capite, J.; Singaravelu, K.; Parekh, A.B. Sustained Activation of the Tyrosine Kinase Syk by Antigen in Mast Cells Requires Local Ca<sup>2+</sup> Influx through Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels\*. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 31348–31355, doi:10.1074/jbc.M804942200.
438. Sabatino, A.D.; Rovedatti, L.; Kaur, R.; Spencer, J.P.; Brown, J.T.; Morisset, V.D.; Biancheri, P.; Leakey, N.A.B.; Wilde, J.I.; Scott, L.; et al. Targeting Gut T Cell Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels Inhibits T Cell Cytokine Production and T-Box Transcription Factor T-Bet in Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Immunology* **2009**, *183*, 3454–3462, doi:10.4049/jimmunol.0802887.
439. Bartoli, F.; Bailey, M.A.; Rode, B.; Antigny, F.; Bedouet, K.; Gerbaud, P.; Gosain, R.; Plante, J.; Norman, K.; Gomez, S.; et al. Orai1 Channel Inhibition Preserves Left Ventricular Systolic Function and Normal Ca<sup>2+</sup> Handling after Pressure Overload. 44.
440. Trebak, M.; Earley, S. *Signal Transduction and Smooth Muscle*; CRC Press, 2018; ISBN 978-1-4987-7423-9.
441. Sadaghiani, A.M.; Lee, S.M.; Odegaard, J.I.; Leveson-Gower, D.B.; McPherson, O.M.; Novick, P.; Kim, M.R.; Koehler, A.N.; Negrin, R.; Dolmetsch, R.E.; et al. Identification of Orai1 Channel Inhibitors by Using Minimal Functional Domains to Screen Small Molecule Microarrays. *Chemistry & Biology* **2014**, *21*, 1278–1292, doi:10.1016/j.chembiol.2014.08.016.
442. Kim, K.-D.; Srikanth, S.; Tan, Y.-V.; Yee, K.; Jew, M.; Damoiseaux, R.; Jung, M.; Shimizu, S.; An, D.; Ribalet, B.; et al. Calcium Signaling via Orai1 Is Essential for Induction of the Nuclear Orphan Receptor Pathway To Drive Th17 Differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2013**, *192*, doi:10.4049/jimmunol.1302586.
443. Vazquez, G.; Wedel, B.J.; Aziz, O.; Trebak, M.; Putney, J.W. The Mammalian TRPC Cation Channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2004**, *1742*, 21–36, doi:10.1016/j.bbamcr.2004.08.015.
444. Tang, Q.; Guo, W.; Zheng, L.; Wu, J.-X.; Liu, M.; Zhou, X.; Zhang, X.; Chen, L. Structure of the Receptor-Activated Human TRPC6 and TRPC3 Ion Channels. *Cell Research* **2018**, *28*, 746–755, doi:10.1038/s41422-018-0038-2.
445. Wang, H.; Cheng, X.; Tian, J.; Xiao, Y.; Tian, T.; Xu, F.; Hong, X.; Zhu, M.X. TRPC Channels: Structure, Function, Regulation and Recent Advances in Small Molecular Probes. *Pharmacology & Therapeutics* **2020**, *209*, 107497, doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107497.
446. Lepage, P.K.; Lussier, M.P.; Barajas-Martinez, H.; Bousquet, S.M.; Blanchard, A.P.; Francoeur, N.; Dumaine, R.; Boulay, G. Identification of Two Domains Involved in the Assembly of Transient Receptor Potential Canonical Channels \*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 30356–30364, doi:10.1074/jbc.M603930200.
447. Gaudet, R. A Primer on Ankyrin Repeat Function in TRP Channels and Beyond.

- Mol Biosyst* **2008**, *4*, 372–379, doi:10.1039/b801481g.
448. Boulay, G.; Brown, D.M.; Qin, N.; Jiang, M.; Dietrich, A.; Zhu, M.X.; Chen, Z.; Birnbaumer, M.; Mikoshiba, K.; Birnbaumer, L. Modulation of Ca<sup>2+</sup> Entry by Polypeptides of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor (IP3R) That Bind Transient Receptor Potential (TRP): Evidence for Roles of TRP and IP3R in Store Depletion-Activated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 14955–14960.
449. Zhang, Z.; Tang, J.; Tikunova, S.; Johnson, J.D.; Chen, Z.; Qin, N.; Dietrich, A.; Stefani, E.; Birnbaumer, L.; Zhu, M.X. Activation of Trp3 by Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors through Displacement of Inhibitory Calmodulin from a Common Binding Domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 3168–3173, doi:10.1073/pnas.051632698.
450. Wedel, B.J.; Vazquez, G.; McKay, R.R.; St. J. Bird, G.; Putney, J.W. A Calmodulin/Inositol 1,4,5-Trisphosphate (IP3) Receptor-Binding Region Targets TRPC3 to the Plasma Membrane in a Calmodulin/IP3 Receptor-Independent Process\*. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 25758–25765, doi:10.1074/jbc.M303890200.
451. Salido, G.M.; Sage, S.O.; Rosado, J.A. TRPC Channels and Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2009**, *1793*, 223–230, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.11.001.
452. Zitt, C.; Zobel, A.; Obukhov, A.G.; Harteneck, C.; Kalkbrenner, F.; Lückhoff, A.; Schultz, G. Cloning and Functional Expression of a Human Ca<sup>2+</sup>-Permeable Cation Channel Activated by Calcium Store Depletion. *Neuron* **1996**, *16*, 1189–1196, doi:10.1016/S0896-6273(00)80145-2.
453. Maroto, R.; Raso, A.; Wood, T.G.; Kurosky, A.; Martinac, B.; Hamill, O.P. TRPC1 Forms the Stretch-Activated Cation Channel in Vertebrate Cells. *Nat Cell Biol* **2005**, *7*, 179–185, doi:10.1038/ncb1218.
454. Wes, P.D.; Chevesich, J.; Jeromin, A.; Rosenberg, C.; Stetten, G.; Montell, C. TRPC1, a Human Homolog of a Drosophila Store-Operated Channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 9652–9656.
455. Lucas, P.; Ukhanov, K.; Leinders-Zufall, T.; Zufall, F. A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction. *Neuron* **2003**, *40*, 551–561, doi:10.1016/S0896-6273(03)00675-5.
456. Antigny, F.; Jousset, H.; König, S.; Frieden, M. Thapsigargin Activates Ca<sup>2+</sup> Entry Both by Store-Dependent, STIM1/Orai1-Mediated, and Store-Independent, TRPC3/PLC/PKC-Mediated Pathways in Human Endothelial Cells. *Cell Calcium* **2011**, *49*, 115–127, doi:10.1016/j.ceca.2010.12.001.
457. Lemonnier, L.; Trebak, M.; Putney, J.W. Complex Regulation of the TRPC3,6,7 Channel Subfamily by Diacylglycerol and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Cell Calcium* **2008**, *43*, 506–514, doi:10.1016/j.ceca.2007.09.001.
458. Zitt, C.; Obukhov, A.G.; Strübing, C.; Zobel, A.; Kalkbrenner, F.; Lückhoff, A.; Schultz, G. Expression of TRPC3 in Chinese Hamster Ovary Cells Results in Calcium-Activated Cation Currents Not Related to Store Depletion. *J Cell Biol* **1997**, *138*, 1333–1341.
459. Hofmann, T.; Obukhov, A.G.; Schaefer, M.; Harteneck, C.; Gudermann, T.; Schultz, G. Direct Activation of Human TRPC6 and TRPC3 Channels by Diacylglycerol. *Nature* **1999**, *397*, 259–263, doi:10.1038/16711.
460. Kamouchi, M.; Philipp, S.; Flockerzi, V.; Wissenbach, U.; Mamin, A.; Raeymaekers, L.; Eggermont, J.; Droogmans, G.; Nilius, B. Properties of Heterologously Expressed HTRP3 Channels in Bovine Pulmonary Artery Endothelial Cells. *J Physiol* **1999**, *518*, 345–358, doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0345p.x.
461. Schaefer, M.; Plant, T.D.; Obukhov, A.G.; Hofmann, T.; Gudermann, T.; Schultz, G.

- Receptor-Mediated Regulation of the Nonselective Cation Channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 17517–17526, doi:10.1074/jbc.275.23.17517.
462. Kew, J.N.C.; Davies, C.H. *Ion Channels: From Structure to Function*; Oxford University Press, 2010; ISBN 978-0-19-929675-0.
463. Feng, S. TRPC Channel Structure and Properties. *Adv Exp Med Biol* **2017**, *976*, 9–23, doi:10.1007/978-94-024-1088-4\_2.
464. Jung, S.; Mühle, A.; Schaefer, M.; Strotmann, R.; Schultz, G.; Plant, T.D. Lanthanides Potentiate TRPC5 Currents by an Action at Extracellular Sites Close to the Pore Mouth\*. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 3562–3571, doi:10.1074/jbc.M211484200.
465. Kinoshita, M.; Akaike, A.; Satoh, M.; Kaneko, S. Positive Regulation of Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry by Intracellular Ca<sup>2+</sup> in Xenopus Oocytes Expressing Rat TRP4. *Cell Calcium* **2000**, *28*, 151–159, doi:10.1054/ceca.2000.0143.
466. Spassova, M.A.; Hewavitharana, T.; Xu, W.; Soboloff, J.; Gill, D.L. A Common Mechanism Underlies Stretch Activation and Receptor Activation of TRPC6 Channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 16586–16591, doi:10.1073/pnas.0606894103.
467. Owsianik, G.; Talavera, K.; Voets, T.; Nilius, B. Permeation and Selectivity of TRP Channels. *Annu Rev Physiol* **2006**, *68*, 685–717, doi:10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406.
468. Okada, T.; Inoue, R.; Yamazaki, K.; Maeda, A.; Kurosaki, T.; Yamakuni, T.; Tanaka, I.; Shimizu, S.; Ikenaka, K.; Imoto, K.; et al. Molecular and Functional Characterization of a Novel Mouse Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP7. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 27359–27370, doi:10.1074/jbc.274.39.27359.
469. Kiyonaka, S.; Kato, K.; Nishida, M.; Mio, K.; Numaga, T.; Sawaguchi, Y.; Yoshida, T.; Wakamori, M.; Mori, E.; Numata, T.; et al. Selective and Direct Inhibition of TRPC3 Channels Underlies Biological Activities of a Pyrazole Compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 5400–5405, doi:10.1073/pnas.0808793106.
470. Miller, M.; Shi, J.; Zhu, Y.; Kustov, M.; Tian, J.; Stevens, A.; Wu, M.; Xu, J.; Long, S.; Yang, P.; et al. Identification of ML204, a Novel Potent Antagonist That Selectively Modulates Native TRPC4/C5 Ion Channels. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 33436–33446, doi:10.1074/jbc.M111.274167.
471. Bauer, C.C.; Minard, A.; Pickles, I.B.; Simmons, K.J.; Chuntharpursat-Bon, E.; Burnham, M.P.; Kapur, N.; Beech, D.J.; Muench, S.P.; Wright, M.H.; et al. Xanthine-Based Photoaffinity Probes Allow Assessment of Ligand Engagement by TRPC5 Channels. *RSC Chem. Biol.* **2020**, *1*, 436–448, doi:10.1039/D0CB00126K.
472. Just, S.; Chenard, B.L.; Ceci, A.; Strassmaier, T.; Chong, J.A.; Blair, N.T.; Gallaschun, R.J.; del Camino, D.; Cantin, S.; D'Amours, M.; et al. Treatment with HC-070, a Potent Inhibitor of TRPC4 and TRPC5, Leads to Anxiolytic and Antidepressant Effects in Mice. *PLoS One* **2018**, *13*, e0191225, doi:10.1371/journal.pone.0191225.
473. Rubaiy, H.N.; Ludlow, M.J.; Henrot, M.; Gaunt, H.J.; Miteva, K.; Cheung, S.Y.; Tanahashi, Y.; Hamzah, N.; Musialowski, K.E.; Blythe, N.M.; et al. Picomolar, Selective, and Subtype-Specific Small-Molecule Inhibition of TRPC1/4/5 Channels. *J Biol Chem* **2017**, *292*, 8158–8173, doi:10.1074/jbc.M116.773556.
474. Minard, A.; Bauer, C.C.; Wright, D.J.; Rubaiy, H.N.; Muraki, K.; Beech, D.J.; Bon, R.S. Remarkable Progress with Small-Molecule Modulation of TRPC1/4/5 Channels: Implications for Understanding the Channels in Health and Disease. *Cells* **2018**, *7*, 52, doi:10.3390/cells7060052.
475. Yu, M.; Ledebor, M.W.; Daniels, M.; Malojcic, G.; Tibbitts, T.T.; Coeffet-Le Gal, M.; Pan-Zhou, X.-R.; Westerling-Bui, A.; Beconi, M.; Reilly, J.F.; et al. Discovery of a Potent and Selective TRPC5 Inhibitor, Efficacious in a Focal Segmental Glomerulosclerosis Model. *ACS Med Chem Lett* **2019**, *10*, 1579–1585, doi:10.1021/acsmchemlett.9b00430.

476. Vinayagam, D.; Quentin, D.; Yu-Strzelczyk, J.; Sitsel, O.; Merino, F.; Stabrin, M.; Hofnagel, O.; Yu, M.; Ledebor, M.W.; Nagel, G.; et al. Structural Basis of TRPC4 Regulation by Calmodulin and Pharmacological Agents. *eLife* **2020**, *9*, e60603, doi:10.7554/eLife.60603.
477. Maier, T.; Follmann, M.; Hessler, G.; Kleemann, H.-W.; Hachtel, S.; Fuchs, B.; Weissmann, N.; Linz, W.; Schmidt, T.; Löhn, M.; et al. Discovery and Pharmacological Characterization of a Novel Potent Inhibitor of Diacylglycerol-Sensitive TRPC Cation Channels. *Br J Pharmacol* **2015**, *172*, 3650–3660, doi:10.1111/bph.13151.
478. Washburn, D.G.; Holt, D.A.; Dodson, J.; McAtee, J.J.; Terrell, L.R.; Barton, L.; Manns, S.; Waszkiewicz, A.; Pritchard, C.; Gillie, D.J.; et al. The Discovery of Potent Blockers of the Canonical Transient Receptor Channels, TRPC3 and TRPC6, Based on an Anilino-Thiazole Pharmacophore. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, *23*, 4979–4984, doi:10.1016/j.bmcl.2013.06.047.
479. Seo, K.; Rainer, P.P.; Shalkey Hahn, V.; Lee, D.; Jo, S.-H.; Andersen, A.; Liu, T.; Xu, X.; Willette, R.N.; Lepore, J.J.; et al. Combined TRPC3 and TRPC6 Blockade by Selective Small-Molecule or Genetic Deletion Inhibits Pathological Cardiac Hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 1551–1556, doi:10.1073/pnas.1308963111.
480. Lin, B.L.; Matera, D.; Doerner, J.F.; Zheng, N.; del Camino, D.; Mishra, S.; Bian, H.; Zeveleva, S.; Zhen, X.; Blair, N.T.; et al. In Vivo Selective Inhibition of TRPC6 by Antagonist BI 749327 Ameliorates Fibrosis and Dysfunction in Cardiac and Renal Disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 10156–10161, doi:10.1073/pnas.1815354116.
481. Häfner, S.; Burg, F.; Kannler, M.; Urban, N.; Mayer, P.; Dietrich, A.; Trauner, D.; Broichhagen, J.; Schaefer, M. A (+)-Larixol Congener with High Affinity and Subtype Selectivity toward TRPC6. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1028–1035, doi:10.1002/cmdc.201800021.
482. Bai, Y.; Yu, X.; Chen, H.; Horne, D.; White, R.; Wu, X.; Lee, P.; Gu, Y.; Ghimire-Rijal, S.; Lin, D.C.-H.; et al. Structural Basis for Pharmacological Modulation of the TRPC6 Channel. *eLife* **9**, e53311, doi:10.7554/eLife.53311.
483. Merritt, J.E.; Armstrong, W.P.; Benham, C.D.; Hallam, T.J.; Jacob, R.; Jaxa-Chamiec, A.; Leigh, B.K.; McCarthy, S.A.; Moores, K.E.; Rink, T.J. SK&F 96365, a Novel Inhibitor of Receptor-Mediated Calcium Entry. *Biochem J* **1990**, *271*, 515–522, doi:10.1042/bj2710515.
484. Singh, A.; Hildebrand, M.; Garcia, E.; Snutch, T. The Transient Receptor Potential Channel Antagonist SKF96365 Is a Potent Blocker of Low-Voltage-Activated T-Type Calcium Channels. *Br J Pharmacol* **2010**, *160*, 1464–1475, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00786.x.
485. Berridge, M.J.; Irvine, R.F. Inositol Trisphosphate, a Novel Second Messenger in Cellular Signal Transduction. *Nature* **1984**, *312*, 315–321, doi:10.1038/312315a0.
486. Streb, H.; Irvine, R.F.; Berridge, M.J.; Schulz, I. Release of Ca<sup>2+</sup> from a Nonmitochondrial Intracellular Store in Pancreatic Acinar Cells by Inositol-1,4,5-Trisphosphate. *Nature* **1983**, *306*, 67–69, doi:10.1038/306067a0.
487. Luik, R.M.; Wang, B.; Prakriya, M.; Wu, M.M.; Lewis, R.S. Oligomerization of STIM1 Couples ER Calcium Depletion to CRAC Channel Activation. *Nature* **2008**, *454*, 538–542, doi:10.1038/nature07065.
488. Orci, L.; Ravazzola, M.; Le Coadic, M.; Shen, W.-W.; Demaurex, N.; Cosson, P. From the Cover: STIM1-Induced Precortical and Cortical Subdomains of the Endoplasmic Reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 19358–19362, doi:10.1073/pnas.0911280106.
489. Hoover, P.J.; Lewis, R.S. Stoichiometric Requirements for Trapping and Gating of Ca<sup>2+</sup>

- Release-Activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) Channels by Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1). *PNAS* **2011**, *108*, 13299–13304, doi:10.1073/pnas.1101664108.
490. Yen, M.; Lewis, R.S. Physiological CRAC Channel Activation and Pore Properties Require STIM1 Binding to All Six Orai1 Subunits. *Journal of General Physiology* **2018**, *150*, 1373–1385, doi:10.1085/jgp.201711985.
491. Srikanth, S.; Jung, H.-J.; Kim, K.-D.; Souda, P.; Whitelegge, J.; Gwack, Y. A Novel EF-Hand Protein, CRACR2A, Is a Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Sensor That Stabilizes CRAC Channels in T Cells. *Nat Cell Biol* **2010**, *12*, 436–446, doi:10.1038/ncb2045.
492. Berlansky, S.; Humer, C.; Sallinger, M.; Frischauf, I. More Than Just Simple Interaction between STIM and Orai Proteins: CRAC Channel Function Enabled by a Network of Interactions with Regulatory Proteins. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22010471.
493. Shalygin, A.; Ryazantseva, M.; Glushankova, L.; Mozhayeva, G.N.; Bezprozvanny, I.; Kaznacheeva, E. Homer Regulation of Native Plasma Membrane Calcium Channels in A431 Cells. *Cell Calcium* **2010**, *48*, 209–214, doi:10.1016/j.ceca.2010.09.002.
494. Jing, J.; He, L.; Sun, A.; Quintana, A.; Ding, Y.; Ma, G.; Tan, P.; Liang, X.; Zheng, X.; Chen, L.; et al. Proteomic Mapping of ER–PM Junctions Identifies STIMATE as a Regulator of Ca<sup>2+</sup> Influx. *Nat Cell Biol* **2015**, *17*, 1339–1347, doi:10.1038/ncb3234.
495. Hooper, R.; Soboloff, J. STIMATE Reveals a STIM1 Transitional State. *Nat Cell Biol* **2015**, *17*, 1232–1234, doi:10.1038/ncb3245.
496. Makowski, S.L.; Wang, Z.; Pomerantz, J.L. A Protease-Independent Function for SPPL3 in NFAT Activation. *Molecular and Cellular Biology* **2015**, *35*, 451–467, doi:10.1128/MCB.01124-14.
497. Maschalidi, S.; Nunes-Hasler, P.; Nascimento, C.R.; Sallent, I.; Lannoy, V.; Garfa-Traore, M.; Cagnard, N.; Sepulveda, F.E.; Vargas, P.; Lennon-Duménil, A.-M.; et al. UNC93B1 Interacts with the Calcium Sensor STIM1 for Efficient Antigen Cross-Presentation in Dendritic Cells. *Nat Commun* **2017**, *8*, 1640, doi:10.1038/s41467-017-01601-5.
498. Chantôme, A.; Potier-Cartreau, M.; Clarysse, L.; Fromont, G.; Marionneau-Lambot, S.; Guéguinou, M.; Pagès, J.-C.; Collin, C.; Oullier, T.; Girault, A.; et al. Pivotal Role of the Lipid Raft SK3–Orai1 Complex in Human Cancer Cell Migration and Bone Metastases. *Cancer Research* **2013**, *73*, 4852–4861, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4572.
499. Feng, J.-M.; Hu, Y.K.; Xie, L.-H.; Colwell, C.S.; Shao, X.M.; Sun, X.-P.; Chen, B.; Tang, H.; Campagnoni, A.T. Golli Protein Negatively Regulates Store Depletion-Induced Calcium Influx in T Cells. *Immunity* **2006**, *24*, 717–727, doi:10.1016/j.immuni.2006.04.007.
500. Walsh, C.M.; Doherty, M.K.; Tepikin, A.V.; Burgoyne, R.D. Evidence for an Interaction between Golli and STIM1 in Store-Operated Calcium Entry. *Biochem J* **2010**, *430*, 453–460, doi:10.1042/BJ20100650.
501. Jha, A.; Ahuja, M.; Maléth, J.; Moreno, C.M.; Yuan, J.P.; Kim, M.S.; Muallem, S. The STIM1 CTID Domain Determines Access of SARAF to SOAR to Regulate Orai1 Channel Function. *J Cell Biol* **2013**, *202*, 71–79, doi:10.1083/jcb.201301148.
502. Jardín, I.; Albarran, L.; Salido, G.M.; López, J.J.; Sage, S.O.; Rosado, J.A. Fine-Tuning of Store-Operated Calcium Entry by Fast and Slow Ca<sup>2+</sup>-Dependent Inactivation: Involvement of SARAF. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2018**, *1865*, 463–469, doi:10.1016/j.bbamcr.2017.12.001.
503. Marshall, C.B.; Nishikawa, T.; Osawa, M.; Stathopoulos, P.B.; Ikura, M. Calmodulin and STIM Proteins: Two Major Calcium Sensors in the Cytoplasm and Endoplasmic Reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *460*, 5–21, doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.106.
504. Mullins, F.M.; Park, C.Y.; Dolmetsch, R.E.; Lewis, R.S. STIM1 and Calmodulin Interact with Orai1 to Induce Ca<sup>2+</sup>-Dependent Inactivation of CRAC Channels. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A* **2009**, *106*, 15495–15500, doi:10.1073/pnas.0906781106.
505. Bhardwaj, R.; Augustynek, B.S.; Ercan-Herbst, E.; Kandasamy, P.; Seedorf, M.; Peinelt, C.; Hediger, M.A. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin Binding to STIM1 Hydrophobic Residues Facilitates Slow Ca<sup>2+</sup>-Dependent Inactivation of the Orai1 Channel. *Cell Physiol Biochem* **2020**, *54*, 252–270, doi:10.33594/000000218.
506. Srivats, S.; Balasuriya, D.; Pasche, M.; Vistal, G.; Edwardson, J.M.; Taylor, C.W.; Murrell-Lagnado, R.D. Sigma1 Receptors Inhibit Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry by Attenuating Coupling of STIM1 to Orai1. *Journal of Cell Biology* **2016**, *213*, 65–79, doi:10.1083/jcb.201506022.
507. Bassett, J.J.; Robitaille, M.; Peters, A.A.; Bong, A.H.L.; Taing, M.-W.; Wood, I.A.; Sadras, F.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. ORAI1 Regulates Sustained Cytosolic Free Calcium Fluctuations during Breast Cancer Cell Apoptosis and Apoptotic Resistance via a STIM1 Independent Pathway. *FASEB J* **2022**, *36*, e22108, doi:10.1096/fj.202002031RR.
508. Hodeify, R.; Nandakumar, M.; Own, M.; Courjaret, R.J.; Graumann, J.; Hubrack, S.Z.; Machaca, K. The CCT Chaperonin Is a Novel Regulator of Ca<sup>2+</sup> Signaling through Modulation of Orai1 Trafficking. *Science Advances* **2018**, *4*, eaau1935, doi:10.1126/sciadv.aau1935.
509. Honnappa, S.; Gouveia, S.M.; Weisbrich, A.; Damberger, F.F.; Bhavesh, N.S.; Jawhari, H.; Grigoriev, I.; Rijssel, F.J.A. van; Buey, R.M.; Lawera, A.; et al. An EB1-Binding Motif Acts as a Microtubule Tip Localization Signal. *Cell* **2009**, *138*, 366–376, doi:10.1016/j.cell.2009.04.065.
510. Pozo-Guisado, E.; Casas-Rua, V.; Tomas-Martin, P.; Lopez-Guerrero, A.M.; Alvarez-Barrientos, A.; Martin-Romero, F.J. Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 Target Sites Regulates Interaction with the Microtubule plus-End Binding Protein EB1. *Journal of Cell Science* **2013**, *126*, 3170–3180, doi:10.1242/jcs.125054.
511. Keil, J.M.; Shen, Z.; Briggs, S.P.; Patrick, G.N. Regulation of STIM1 and SOCE by the Ubiquitin-Proteasome System (UPS). *PLOS ONE* **2010**, *5*, e13465, doi:10.1371/journal.pone.0013465.
512. Zhu, H.; Weisleder, N.; Wu, P.; Cai, C.; Chen, J. Caveolae/Caveolin-1 Are Important Modulators of Store-Operated Calcium Entry in Hs578/T Breast Cancer Cells. *Journal of Pharmacological Sciences* **2008**, *106*, 287–294, doi:10.1254/jphs.FP0071192.
513. Prakash, Y.S.; Thompson, M.A.; Vaa, B.; Matabdin, I.; Peterson, T.E.; He, T.; Pabelick, C.M. Caveolins and Intracellular Calcium Regulation in Human Airway Smooth Muscle. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2007**, *293*, L1118–L1126, doi:10.1152/ajplung.00136.2007.
514. Bohórquez-Hernández, A.; Gratton, E.; Pacheco, J.; Asanov, A.; Vaca, L. Cholesterol Modulates the Cellular Localization of Orai1 Channels and Its Disposition among Membrane Domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2017**, *1862*, 1481–1490, doi:10.1016/j.bbalip.2017.09.005.
515. Yeh, Y.-C.; Parekh, A.B. Distinct Structural Domains of Caveolin-1 Independently Regulate Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels and Ca<sup>2+</sup> Microdomain-Dependent Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* **2015**, *35*, 1341–1349, doi:10.1128/MCB.01068-14.
516. Pani, B.; Ong, H.L.; Brazer, S.W.; Liu, X.; Rauser, K.; Singh, B.B.; Ambudkar, I.S. Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM Microdomains Involves Release of the Channel from Its Scaffold Caveolin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 20087–20092, doi:10.1073/pnas.0905002106.
517. Mignen, O.; Shuttleworth, T.J. I(A<sub>RC</sub>), a Novel Arachidonate-Regulated, Noncapacitative Ca(2+) Entry Channel. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 9114–9119,

doi:10.1074/jbc.275.13.9114.

518. Mignen, O.; Thompson, J.L.; Shuttleworth, T.J. Both Orai1 and Orai3 Are Essential Components of the Arachidonate-Regulated Ca<sup>2+</sup>-Selective (ARC) Channels. *J Physiol* **2008**, *586*, 185–195, doi:10.1113/jphysiol.2007.146258.
519. González-Cobos, J.C.; Zhang, X.; Zhang, W.; Ruhle, B.; Motiani, R.K.; Schindl, R.; Muik, M.; Spinelli, A.M.; Bisailon, J.M.; Shinde, A.V.; et al. Store-Independent Orai1/3 Channels Activated by Intracrine LeukotrieneC<sub>4</sub>: Role in Neointimal Hyperplasia. *Circ Res* **2013**, *112*, 1013–1025, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300220.
520. Bruce, J.I.E.; James, A.D. Targeting the Calcium Signalling Machinery in Cancer. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 2351, doi:10.3390/cancers12092351.
521. Thompson, J.L.; Shuttleworth, T.J. Molecular Basis of Activation of the Arachidonate-Regulated Ca<sup>2+</sup> (ARC) Channel, a Store-Independent Orai Channel, by Plasma Membrane STIM1. *J Physiol* **2013**, *591*, 3507–3523, doi:10.1113/jphysiol.2013.256784.
522. Shuttleworth, T.J. STIM and Orai Proteins and the Non-Capacitative ARC Channels. *Front Biosci* **2012**, *17*, 847–860.
523. Sanchez-Collado, J.; Jardin, I.; López, J.J.; Ronco, V.; Salido, G.M.; Dubois, C.; Prevarskaya, N.; Rosado, J.A. Role of Orai3 in the Pathophysiology of Cancer. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 11426, doi:10.3390/ijms222111426.
524. Feng, M.; Grice, D.M.; Faddy, H.M.; Nguyen, N.; Leitch, S.; Wang, Y.; Muend, S.; Kenny, P.A.; Sukumar, S.; Roberts-Thomson, S.J.; et al. Store-Independent Activation of Orai1 by SPCA2 in Mammary Tumors. *Cell* **2010**, *143*, 84–98, doi:10.1016/j.cell.2010.08.040.
525. Peretti, M.; Badaoui, M.; Girault, A.; Van Gulick, L.; Mabile, M.-P.; Tebbakha, R.; Sevestre, H.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Original Association of Ion Transporters Mediates the ECM-Induced Breast Cancer Cell Survival: Kv10.1-Orai1-SPCA2 Partnership. *Sci Rep* **2019**, *9*, 1175, doi:10.1038/s41598-018-37602-7.
526. Albarran, L.; Lopez, J.J.; Woodard, G.E.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry-Associated Regulatory Factor (SARAF) Plays an Important Role in the Regulation of Arachidonate-Regulated Ca<sup>2+</sup> (ARC) Channels. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, *291*, 6982–6988, doi:10.1074/jbc.M115.704940.
527. Zeng, W.; Yuan, J.P.; Kim, M.S.; Choi, Y.J.; Huang, G.N.; Worley, P.F.; Muallem, S. STIM1 Gates TRPC Channels but Not Orai1 by Electrostatic Interaction. *Mol Cell* **2008**, *32*, 439–448, doi:10.1016/j.molcel.2008.09.020.
528. Yuan, J.P.; Zeng, W.; Huang, G.N.; Worley, P.F.; Muallem, S. STIM1 Heteromultimerizes TRPC Channels to Determine Their Function as Store-Operated Channels. *Nat Cell Biol* **2007**, *9*, 636–645, doi:10.1038/ncb1590.
529. Huang, G.N.; Zeng, W.; Kim, J.Y.; Yuan, J.P.; Han, L.; Muallem, S.; Worley, P.F. STIM1 Carboxyl-Terminus Activates Native SOC, I Crac and TRPC1 Channels. *Nature Cell Biology* **2006**, *8*, 1003–1010, doi:10.1038/ncb1454.
530. Lee, K.P.; Yuan, J.P.; So, I.; Worley, P.F.; Muallem, S. STIM1-Dependent and STIM1-Independent Function of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels Tunes Their Store-Operated Mode. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 38666–38673, doi:10.1074/jbc.M110.155036.
531. Cheng, K.T.; Liu, X.; Ong, H.L.; Swaim, W.; Ambudkar, I.S. Local Ca<sup>2+</sup> Entry Via Orai1 Regulates Plasma Membrane Recruitment of TRPC1 and Controls Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Signals Required for Specific Cell Functions. *PLoS Biol* **2011**, *9*, e1001025, doi:10.1371/journal.pbio.1001025.
532. de Souza, L.B.; Ong, H.L.; Liu, X.; Ambudkar, I.S. Fast Endocytic Recycling Determines TRPC1-STIM1 Clustering in ER-PM Junctions and Plasma Membrane Function of the Channel. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1853*, 2709–2721,

- doi:10.1016/j.bbamcr.2015.07.019.
533. González-Cobos, J.C.; Trebak, M. TRPC Channels in Smooth Muscle Cells. *Front Biosci* **2010**, *15*, 1023–1039.
534. Clapham, D.E.; Runnels, L.W.; Strübing, C. The Trp Ion Channel Family. *Nat Rev Neurosci* **2001**, *2*, 387–396, doi:10.1038/35077544.
535. Kim, J.; Ko, J.; Myeong, J.; Kwak, M.; Hong, C.; So, I. TRPC1 as a Negative Regulator for TRPC4 and TRPC5 Channels. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **2019**, *471*, 1045–1053, doi:10.1007/s00424-019-02289-w.
536. Bousquet, S.M.; Monet, M.; Boulay, G. Protein Kinase C-Dependent Phosphorylation of Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) on Serine 448 Causes Channel Inhibition. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 40534–40543, doi:10.1074/jbc.M110.160051.
537. Wilson, C.; Dryer, S.E. A Mutation in TRPC6 Channels Abolishes Their Activation by Hypoosmotic Stretch but Does Not Affect Activation by Diacylglycerol or G Protein Signaling Cascades. *Am J Physiol Renal Physiol* **2014**, *306*, F1018–1025, doi:10.1152/ajprenal.00662.2013.
538. Álvarez-Miguel, I.; Ciudad, P.; Pérez-García, M.T.; López-López, J.R. Differences in TRPC3 and TRPC6 Channels Assembly in Mesenteric Vascular Smooth Muscle Cells in Essential Hypertension. *J Physiol* **2017**, *595*, 1497–1513, doi:10.1113/JP273327.
539. Yang, X.-R.; Lin, M.-J.; McIntosh, L.S.; Sham, J.S.K. Functional Expression of Transient Receptor Potential Melastatin- and Vanilloid-Related Channels in Pulmonary Arterial and Aortic Smooth Muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2006**, *290*, L1267–1276, doi:10.1152/ajplung.00515.2005.
540. Wang, Y.X.; Wang, J.; Wang, C.; Liu, J.; Shi, L.P.; Xu, M.; Wang, C. Functional Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid-Related Channels in Chronically Hypoxic Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *J Membr Biol* **2008**, *223*, 151–159, doi:10.1007/s00232-008-9121-9.
541. Song, S.; Ayon, R.J.; Yamamura, A.; Yamamura, H.; Dash, S.; Babicheva, A.; Tang, H.; Sun, X.; Cordery, A.G.; Khalpey, Z.; et al. Capsaicin-Induced Ca<sup>2+</sup> Signaling Is Enhanced via Upregulated TRPV1 Channels in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic PAH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2017**, *312*, L309–L325, doi:10.1152/ajplung.00357.2016.
542. Guibert, C.; Ducret, T.; Savineau, J.-P. Expression and Physiological Roles of TRP Channels in Smooth Muscle Cells. In *Transient Receptor Potential Channels*; Islam, Md.S., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Netherlands: Dordrecht, 2011; Vol. 704, pp. 687–706 ISBN 978-94-007-0264-6.
543. Xia, Y.; Fu, Z.; Hu, J.; Huang, C.; Paudel, O.; Cai, S.; Liedtke, W.; Sham, J.S.K. TRPV4 Channel Contributes to Serotonin-Induced Pulmonary Vasoconstriction and the Enhanced Vascular Reactivity in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* **2013**, *305*, C704–C715, doi:10.1152/ajpcell.00099.2013.
544. Grace, M.S.; Bonvini, S.J.; Belvisi, M.G.; McIntyre, P. Modulation of the TRPV4 Ion Channel as a Therapeutic Target for Disease. *Pharmacol Ther* **2017**, *177*, 9–22, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.019.
545. Hecquet, C.M.; Ahmed, G.U.; Vogel, S.M.; Malik, A.B. Role of TRPM2 Channel in Mediating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Ca<sup>2+</sup> Entry and Endothelial Hyperpermeability. *Circ Res* **2008**, *102*, 347–355, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.160176.
546. Earley, S.; Waldron, B.J.; Brayden, J.E. Critical Role for Transient Receptor Potential Channel TRPM4 in Myogenic Constriction of Cerebral Arteries. *Circ Res* **2004**, *95*, 922–929, doi:10.1161/01.RES.0000147311.54833.03.
547. Coste, B.; Mathur, J.; Schmidt, M.; Earley, T.J.; Ranade, S.; Petrus, M.J.; Dubin, A.E.; Patapoutian, A. Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically

- Activated Cation Channels. *Science* **2010**, *330*, 55–60, doi:10.1126/science.1193270.
548. Barbeau, S.; Gilbert, G.; Cardouat, G.; Baudrimont, I.; Freund-Michel, V.; Guibert, C.; Marthan, R.; Vacher, P.; Quignard, J.-F.; Ducret, T. Mechanosensitivity in Pulmonary Circulation: Pathophysiological Relevance of Stretch-Activated Channels in Pulmonary Hypertension. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1389, doi:10.3390/biom11091389.
549. Tian, S.; Cai, Z.; Sen, P.; van Uden, D.; van de Kamp, E.; Thuillet, R.; Tu, L.; Guignabert, C.; Boomars, K.; Van der Heiden, K.; et al. Loss of Lung Microvascular Endothelial Piezo2 Expression Impairs NO Synthesis, Induces EndMT, and Is Associated with Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2022**, *323*, H958–H974, doi:10.1152/ajpheart.00220.2022.
550. Choi, D.; Park, E.; Yu, R.P.; Cooper, M.N.; Cho, I.-T.; Choi, J.; Yu, J.; Zhao, L.; Yum, J.-E.I.; Yu, J.S.; et al. Piezo1-Regulated Mechanotransduction Controls Flow-Activated Lymphatic Expansion. *Circulation Research* **2022**, *131*, e2–e21, doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.320565.
551. Jernigan, N.L.; Paffett, M.L.; Walker, B.R.; Resta, T.C. ASIC1 Contributes to Pulmonary Vascular Smooth Muscle Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2009**, *297*, L271–L285, doi:10.1152/ajplung.00020.2009.
552. Jernigan, N.L.; Herbert, L.M.; Walker, B.R.; Resta, T.C. Chronic Hypoxia Upregulates Pulmonary Arterial ASIC1: A Novel Mechanism of Enhanced Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry and Receptor-Dependent Vasoconstriction. *Am J Physiol Cell Physiol* **2012**, *302*, C931–C940, doi:10.1152/ajpcell.00332.2011.
553. Plomaritas, D.R.; Herbert, L.M.; Yellowhair, T.R.; Resta, T.C.; Gonzalez Bosc, L.V.; Walker, B.R.; Jernigan, N.L. Chronic Hypoxia Limits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Inhibition of ASIC1-Dependent Store-Operated Calcium Entry in Pulmonary Arterial Smooth Muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2014**, *307*, L419–L430, doi:10.1152/ajplung.00095.2014.
554. Smith, K.A.; Ayon, R.J.; Tang, H.; Makino, A.; Yuan, J.X.-J. Calcium-Sensing Receptor Regulates Cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] and Plays a Major Role in the Development of Pulmonary Hypertension. *Front Physiol* **2016**, *7*, 517, doi:10.3389/fphys.2016.00517.
555. Tang, H.; Yamamura, A.; Yamamura, H.; Song, S.; Fraidenburg, D.R.; Chen, J.; Gu, Y.; Pohl, N.M.; Zhou, T.; Jiménez-Pérez, L.; et al. Pathogenic Role of Calcium-Sensing Receptors in the Development and Progression of Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2016**, *310*, L846–L859, doi:10.1152/ajplung.00050.2016.
556. Dumas, S.J.; Bru-Mercier, G.; Courboulin, A.; Quatredeniers, M.; Rücker-Martin, C.; Antigny, F.; Nakhleh, M.K.; Ranchoux, B.; Gouadon, E.; Vinhas, M.-C.; et al. NMDA-Type Glutamate Receptor Activation Promotes Vascular Remodeling and Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2018**, *137*, 2371–2389, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029930.
557. Quatredeniers, M.; Nakhleh, M.K.; Dumas, S.J.; Courboulin, A.; Vinhas, M.C.; Antigny, F.; Phan, C.; Guignabert, C.; Bendifallah, I.; Vocelle, M.; et al. Functional Interaction between PDGFβ and GluN2B-Containing NMDA Receptors in Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2019**, *316*, L445–L455, doi:10.1152/ajplung.00537.2017.
558. Hadri, L.; Kratljan, R.G.; Benard, L.; Maron, B.A.; Dorfmueller, P.; Ladage, D.; Guignabert, C.; Ishikawa, K.; Aguero, J.; Ibanez, B.; et al. Therapeutic Efficacy of AAV1.SERCA2a in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2013**, *128*, 512–523, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001585.
559. Ng, L.C.; Ramduny, D.; Airey, J.A.; Singer, C.A.; Keller, P.S.; Shen, X.-M.; Tian, H.; Valencik, M.; Hume, J.R. Orai1 Interacts with STIM1 and Mediates Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry in Mouse Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *American Journal of*

- Physiology-Cell Physiology* **2010**, 299, C1079–C1090, doi:10.1152/ajpcell.00548.2009.
560. Wang, J. Orai1, 2, 3 and STIM1 Promote Store-Operated Calcium Entry in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Cell Death Discovery* **2017**, 11.
561. Fernandez, R.A.; Wan, J.; Song, S.; Smith, K.A.; Gu, Y.; Tauseef, M.; Tang, H.; Makino, A.; Mehta, D.; Yuan, J.X.-J. Upregulated Expression of STIM2, TRPC6, and Orai2 Contributes to the Transition of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from a Contractile to Proliferative Phenotype. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2015**, 308, C581–C593, doi:10.1152/ajpcell.00202.2014.
562. Rode, B.; Bailey, M.A.; Marthan, R.; Beech, D.J.; Guibert, C. ORAI Channels as Potential Therapeutic Targets in Pulmonary Hypertension. *Physiology (Bethesda)* **2018**, 33, 261–268, doi:10.1152/physiol.00016.2018.
563. Masson, B.; Montani, D.; Humbert, M.; Capuano, V.; Antigny, F. Role of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in the Pulmonary Vascular Remodeling Occurring in Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomolecules* **2021**, 11, 1781, doi:10.3390/biom11121781.
564. Thakore, P.; Earley, S. Transient Receptor Potential Channels and Endothelial Cell Calcium Signaling. *Compr Physiol* **2019**, 9, 1249–1277, doi:10.1002/cphy.c180034.
565. Bendiks, L.; Geiger, F.; Gudermann, T.; Feske, S.; Dietrich, A. Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Primary Murine Lung Fibroblasts Is Independent of Classical Transient Receptor Potential (TRPC) Channels and Contributes to Cell Migration. *Sci Rep* **2020**, 10, 6812, doi:10.1038/s41598-020-63677-2.
566. Abdullaev, I.F.; Bisailon, J.M.; Potier, M.; Gonzalez, J.C.; Motiani, R.K.; Trebak, M. Stim1 and Orai1 Mediate CRAC Currents and Store-Operated Calcium Entry Important for Endothelial Cell Proliferation. *Circulation Research* **2008**, 103, 1289–1299, doi:10.1161/01.RES.0000338496.95579.56.
567. Li, J.; Cubbon, R.M.; Wilson, L.A.; Amer, M.S.; McKeown, L.; Hou, B.; Majeed, Y.; Tumova, S.; Seymour, V.A.; Taylor, H.; et al. Orai1 and CRAC Channel Dependence of VEGF-Activated Ca<sup>2+</sup>-Entry and Endothelial Tube Formation. *Circ Res* **2011**, 108, 1190–1198, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243352.
568. Antigny, F.; Girardin, N.; Frieden, M. Transient Receptor Potential Canonical Channels Are Required for in Vitro Endothelial Tube Formation. *J Biol Chem* **2012**, 287, 5917–5927, doi:10.1074/jbc.M111.295733.
569. Sundivakkam, P.C.; Freichel, M.; Singh, V.; Yuan, J.P.; Vogel, S.M.; Flockerzi, V.; Malik, A.B.; Tirupathi, C. The Ca(2+) Sensor Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) Is Necessary and Sufficient for the Store-Operated Ca(2+) Entry Function of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) 1 and 4 Channels in Endothelial Cells. *Mol Pharmacol* **2012**, 81, 510–526, doi:10.1124/mol.111.074658.
570. Galeano-Otero, I.; Del Toro, R.; Khatib, A.-M.; Rosado, J.A.; Ordóñez-Fernández, A.; Smani, T. SARAF and Orai1 Contribute to Endothelial Cell Activation and Angiogenesis. *Front Cell Dev Biol* **2021**, 9, 639952, doi:10.3389/fcell.2021.639952.
571. Fantozzi, I.; Zhang, S.; Platoshyn, O.; Remillard, C.V.; Cowling, R.T.; Yuan, J.X.-J. Hypoxia Increases AP-1 Binding Activity by Enhancing Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2003**, 285, L1233–L1245, doi:10.1152/ajplung.00445.2002.
572. Paffett, M.L.; Naik, J.S.; Resta, T.C.; Walker, B.R. Reduced Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Pulmonary Endothelial Cells from Chronically Hypoxic Rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2007**, 293, L1135–L1142, doi:10.1152/ajplung.00432.2006.
573. Zhang, B.; Naik, J.S.; Jernigan, N.L.; Walker, B.R.; Resta, T.C. Reduced Membrane Cholesterol after Chronic Hypoxia Limits Orai1-Mediated Pulmonary Endothelial Ca<sup>2+</sup>

- Entry. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2018**, *314*, H359–H369, doi:10.1152/ajpheart.00540.2017.
574. Zhou, C.; Townsley, M.I.; Alexeyev, M.; Voelkel, N.F.; Stevens, T. Endothelial Hyperpermeability in Severe Pulmonary Arterial Hypertension: Role of Store-Operated Calcium Entry. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2016**, *311*, L560–L569, doi:10.1152/ajplung.00057.2016.
575. Takahashi, Y.; Watanabe, H.; Murakami, M.; Ono, K.; Munehisa, Y.; Koyama, T.; Nobori, K.; Iijima, T.; Ito, H. Functional Role of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) in Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, *361*, 934–940, doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.096.
576. Li, J.; McKeown, L.; Ojelabi, O.; Stacey, M.; Foster, R.; O'Regan, D.; Porter, K.E.; Beech, D.J. Nanomolar Potency and Selectivity of a Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channel Inhibitor against Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Br J Pharmacol* **2011**, *164*, 382–393, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01368.x.
577. Bisailon, J.M.; Motiani, R.K.; Gonzalez-Cobos, J.C.; Potier, M.; Halligan, K.E.; Alzawahra, W.F.; Barroso, M.; Singer, H.A.; Jourd'heuil, D.; Trebak, M. Essential Role for STIM1/Orai1-Mediated Calcium Influx in PDGF-Induced Smooth Muscle Migration. *Am J Physiol Cell Physiol* **2010**, *298*, C993–C1005, doi:10.1152/ajpcell.00325.2009.
578. Azimi, I.; Stevenson, R.J.; Zhang, X.; Meizoso-Huesca, A.; Xin, P.; Johnson, M.; Flanagan, J.U.; Chalmers, S.B.; Yoast, R.E.; Kapure, J.S.; et al. A New Selective Pharmacological Enhancer of the Orai1 Ca<sup>2+</sup> Channel Reveals Roles for Orai1 in Smooth and Skeletal Muscle Functions. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, *3*, 135–147, doi:10.1021/acspsci.9b00081.
579. Potier, M.; Gonzalez, J.C.; Motiani, R.K.; Abdullaev, I.F.; Bisailon, J.M.; Singer, H.A.; Trebak, M. Evidence for STIM1- and Orai1-Dependent Store-Operated Calcium Influx through ICRAC in Vascular Smooth Muscle Cells: Role in Proliferation and Migration. *FASEB J* **2009**, *23*, 2425–2437, doi:10.1096/fj.09-131128.
580. Vacher, P.; Vacher, A.-M.; Pineau, R.; Latour, S.; Soubeyran, I.; Pangault, C.; Tarte, K.; Soubeyran, P.; Ducret, T.; Bresson-Bepoldin, L. Localized Store-Operated Calcium Influx Represses CD95-Dependent Apoptotic Effects of Rituximab in Non-Hodgkin B Lymphomas. *The Journal of Immunology* **2015**, *195*, 2207–2215, doi:10.4049/jimmunol.1402942.
581. Kondratska, K.; Kondratskyi, A.; Yassine, M.; Lemonnier, L.; Lepage, G.; Morabito, A.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. Orai1 and STIM1 Mediate SOCE and Contribute to Apoptotic Resistance of Pancreatic Adenocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2014**, *1843*, 2263–2269, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.02.012.
582. Zhang, S.; Patel, H.H.; Murray, F.; Remillard, C.V.; Schach, C.; Thistlethwaite, P.A.; Insel, P.A.; Yuan, J.X.-J. Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Normal Subjects and IPAH Patients Show Divergent CAMP-Mediated Effects on TRPC Expression and Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2007**, *292*, L1202–L1210, doi:10.1152/ajplung.00214.2006.
583. He, X.; Song, S.; Ayon, R.J.; Balisterieri, A.; Black, S.M.; Makino, A.; Wier, W.G.; Zang, W.-J.; Yuan, J.X.-J. Hypoxia Selectively Upregulates Cation Channels and Increases Cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] in Pulmonary, but Not Coronary, Arterial Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2018**, *314*, C504–C517, doi:10.1152/ajpcell.00272.2017.
584. Song, S.; Carr, S.G.; McDermott, K.M.; Rodriguez, M.; Babicheva, A.; Balisterieri, A.; Ayon, R.J.; Wang, J.; Makino, A.; Yuan, J.X.-J. STIM2-Mediated Increase in Resting [Ca<sup>2+</sup>] Cyt Stimulates PSMC Proliferation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension* **2018**, *71*, 518–529, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10503.

585. Song, M.Y.; Makino, A.; Yuan, J.X.-J. STIM2 Contributes to Enhanced Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulm Circ* **2011**, *1*, 84–94, doi:10.4103/2045-8932.78106.
586. Chen, J.; Sysol, J.R.; Singla, S.; Zhao, S.; Yamamura, A.; Valdez-Jasso, D.; Abbasi, T.; Shioura, K.M.; Sahni, S.; Reddy, V.; et al. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Promotes Pulmonary Vascular Remodeling and Is a Therapeutic Target in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2017**, *135*, 1532–1546, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024557.
587. Lu, W.; Wang, J.; Shimoda, L.A.; Sylvester, J.T. Differences in STIM1 and TRPC Expression in Proximal and Distal Pulmonary Arterial Smooth Muscle Are Associated with Differences in Ca<sup>2+</sup> Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2008**, *295*, L104–L113, doi:10.1152/ajplung.00058.2008.
588. Hou, X.; Chen, J.; Luo, Y.; Liu, F.; Xu, G.; Gao, Y. Silencing of STIM1 Attenuates Hypoxia-Induced PASMCs Proliferation via Inhibition of the SOC/Ca<sup>2+</sup>/NFAT Pathway. *Respir Res* **2013**, *14*, 2, doi:10.1186/1465-9921-14-2.
589. Ng, L.C.; O’Neill, K.G.; French, D.; Airey, J.A.; Singer, C.A.; Tian, H.; Shen, X.-M.; Hume, J.R. TRPC1 and Orai1 Interact with STIM1 and Mediate Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry Caused by Acute Hypoxia in Mouse Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2012**, *303*, C1156–C1172, doi:10.1152/ajpcell.00065.2012.
590. Giachini, F.R.C.; Chiao, C.-W.; Carneiro, F.S.; Lima, V.V.; Carneiro, Z.N.; Dorrance, A.M.; Tostes, R.C.; Webb, R.C. CHBPR: Increased Activation of STIM-1/Orai-1 in Aorta from Hypertensive Rats: A Novel Insight into Vascular Dysfunction. *Hypertension* **2009**, *53*, 409–416, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.124404.
591. Castillo-Galán, S.; Arenas, G.A.; Reyes, R.V.; Krause, B.J.; Iturriaga, R. Stim-Activated TRPC-ORAI Channels in Pulmonary Hypertension Induced by Chronic Intermittent Hypoxia. *Pulm Circ* **2020**, *10*, 13–22, doi:10.1177/2045894020941484.
592. Castillo-Galán, S.; Riquelme, B.; Iturriaga, R. Crucial Role of Stromal Interaction Molecule-Activated TRPC-ORAI Channels in Vascular Remodeling and Pulmonary Hypertension Induced by Intermittent Hypoxia. *Frontiers in Physiology* **2022**, *13*, doi:10.3389/fphys.2022.841828.
593. Castillo-Galán, S.; Parrau, D.; Hernández, I.; Quezada, S.; Díaz, M.; Ebensperger, G.; Herrera, E.A.; Moraga, F.A.; Iturriaga, R.; Llanos, A.J.; et al. The Action of 2-Aminoethyldiphenyl Borinate on the Pulmonary Arterial Hypertension and Remodeling of High-Altitude Hypoxemic Lambs. *Front Physiol* **2022**, *12*, 765281, doi:10.3389/fphys.2021.765281.
594. Schild, A.; Bhardwaj, R.; Wenger, N.; Tscherrig, D.; Kandasamy, P.; Dornič, J.; Baur, R.; Peinelt, C.; Hediger, M.A.; Lochner, M. Synthesis and Pharmacological Characterization of 2-Aminoethyl Diphenylborinate (2-APB) Derivatives for Inhibition of Store-Operated Calcium Entry (SOCE) in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 5604, doi:10.3390/ijms21165604.
595. Rodríguez-Moyano, M.; Díaz, I.; Dionisio, N.; Zhang, X.; Ávila-Medina, J.; Calderón-Sánchez, E.; Trebak, M.; Rosado, J.A.; Ordóñez, A.; Smani, T. Urotensin-II Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation through Store-Operated Calcium Entry and EGFR Transactivation. *Cardiovasc Res* **2013**, *100*, 297–306, doi:10.1093/cvr/cvt196.
596. Yang, H.; Chen, X.-Y.; Kuang, S.-J.; Zhou, M.-Y.; Zhang, L.; Zeng, Z.; Liu, L.; Wu, F.-L.; Zhang, M.-Z.; Mai, L.-P.; et al. Abnormal Ca<sup>2+</sup> Handling Contributes to the Impairment of Aortic Smooth Muscle Contractility in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2020**, *141*, 82–92,

doi:10.1016/j.yjmcc.2020.03.009.

597. Kunichika, N.; Yu, Y.; Remillard, C.V.; Platoshyn, O.; Zhang, S.; Yuan, J.X.-J. Overexpression of TRPC1 Enhances Pulmonary Vasoconstriction Induced by Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2004**, *287*, L962-969, doi:10.1152/ajplung.00452.2003.
598. Freichel, M.; Suh, S.H.; Pfeifer, A.; Schweig, U.; Trost, C.; Weißgerber, P.; Biel, M.; Philipp, S.; Freise, D.; Droogmans, G.; et al. Lack of an Endothelial Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Current Impairs Agonist-Dependent Vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> Mice. *Nat Cell Biol* **2001**, *3*, 121–127, doi:10.1038/35055019.
599. Xia, Y.; Yang, X.-R.; Fu, Z.; Paudel, O.; Abramowitz, J.; Birnbaumer, L.; Sham, J.S.K. TRPC1 and TRPC6 Contribute to Hypoxic Pulmonary Hypertension through Differential Regulation of Pulmonary Vascular Functions RR. *Hypertension* **2014**, *63*, 173–180, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01902.
600. Sun, C.-K.; Zhen, Y.-Y.; Lu, H.-I.; Sung, P.-H.; Chang, L.-T.; Tsai, T.-H.; Sheu, J.-J.; Chen, Y.-L.; Chua, S.; Chang, H.-W.; et al. Reducing TRPC1 Expression through Liposome-Mediated SiRNA Delivery Markedly Attenuates Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in a Murine Model. *Stem Cells International* **2014**, *2014*, e316214, doi:10.1155/2014/316214.
601. Lin, M.-J.; Leung, G.P.H.; Zhang, W.-M.; Yang, X.-R.; Yip, K.-P.; Tse, C.-M.; Sham, J.S.K. Chronic Hypoxia-Induced Upregulation of Store-Operated and Receptor-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells: A Novel Mechanism of Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Circ Res* **2004**, *95*, 496–505, doi:10.1161/01.RES.0000138952.16382.ad.
602. Malczyk, M.; Veith, C.; Fuchs, B.; Hofmann, K.; Storch, U.; Schermuly, R.T.; Witzenrath, M.; Ahlbrecht, K.; Fecher-Trost, C.; Flockerzi, V.; et al. Classical Transient Receptor Potential Channel 1 in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2013**, *188*, 1451–1459, doi:10.1164/rccm.201307-1252OC.
603. Liu, X.-R.; Zhang, M.-F.; Yang, N.; Liu, Q.; Wang, R.-X.; Cao, Y.-N.; Yang, X.-R.; Sham, J.S.K.; Lin, M.-J. Enhanced Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry and TRPC Channel Expression in Pulmonary Arteries of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. *Am J Physiol Cell Physiol* **2012**, *302*, C77–C87, doi:10.1152/ajpcell.00247.2011.
604. Yu, Y.; Fantozzi, I.; Remillard, C.V.; Landsberg, J.W.; Kunichika, N.; Platoshyn, O.; Tigno, D.D.; Thistlethwaite, P.A.; Rubin, L.J.; Yuan, J.X.-J. Enhanced Expression of Transient Receptor Potential Channels in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 13861–13866, doi:10.1073/pnas.0405908101.
605. Alzoubi, A.; Almalouf, P.; Toba, M.; O’Neill, K.; Qian, X.; Francis, M.; Taylor, M.S.; Alexeyev, M.; McMurtry, I.F.; Oka, M.; et al. TRPC4 Inactivation Confers a Survival Benefit in Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Pathol* **2013**, *183*, 1779–1788, doi:10.1016/j.ajpath.2013.08.016.
606. Yu, Y.; Keller, S.H.; Remillard, C.V.; Safrina, O.; Nicholson, A.; Zhang, S.L.; Jiang, W.; Vangala, N.; Landsberg, J.W.; Wang, J.-Y.; et al. A Functional Single-Nucleotide Polymorphism in the TRPC6 Gene Promoter Associated With Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2009**, *119*, 2313–2322, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.782458.
607. Pousada, G.; Balloira, A.; Valverde, D. Molecular and Clinical Analysis of TRPC6 and AGTR1 Genes in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2015**, *10*, 1, doi:10.1186/s13023-014-0216-3.
608. Jain, P.P.; Lai, N.; Xiong, M.; Chen, J.; Babicheva, A.; Zhao, T.; Parmisano, S.; Zhao, M.; Paquin, C.; Matti, M.; et al. TRPC6, a Therapeutic Target for Pulmonary Hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2021**,

- doi:10.1152/ajplung.00159.2021.
609. Anderson, L.; Lowery, J.W.; Frank, D.B.; Novitskaya, T.; Jones, M.; Mortlock, D.P.; Chandler, R.L.; de Caestecker, M.P. Bmp2 and Bmp4 Exert Opposing Effects in Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2010**, *298*, R833–R842, doi:10.1152/ajpregu.00534.2009.
610. Lu, W.; Ran, P.; Zhang, D.; Lai, N.; Zhong, N.; Wang, J. Bone Morphogenetic Protein 4 Enhances Canonical Transient Receptor Potential Expression, Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry, and Basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Rat Distal Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2010**, *299*, C1370–1378, doi:10.1152/ajpcell.00040.2010.
611. Wu, J.; Yu, Z.; Su, D. BMP4 Protects Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from Apoptosis by PI3K/AKT/Smad1/5/8 Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15*, 13738–13754, doi:10.3390/ijms150813738.
612. Hunton, D.L.; Lucchesi, P.A.; Pang, Y.; Cheng, X.; Dell'Italia, L.J.; Marchase, R.B. Capacitative Calcium Entry Contributes to Nuclear Factor of Activated T-Cells Nuclear Translocation and Hypertrophy in Cardiomyocytes. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 14266–14273, doi:10.1074/jbc.M107167200.
613. Uehara, A.; Yasukochi, M.; Imanaga, I.; Nishi, M.; Takeshima, H. Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Uncoupled with Ryanodine Receptor and Junctional Membrane Complex in Heart Muscle Cells. *Cell Calcium* **2002**, *31*, 89–96, doi:10.1054/ceca.2001.0257.
614. Sabourin, J.; Beauvais, A.; Luo, R.; Montani, D.; Benitah, J.-P.; Masson, B.; Antigny, F. The SOCE Machinery: An Unbalanced Knowledge between Left and Right Ventricular Pathophysiology. *Cells* **2022**, *11*, 3282, doi:10.3390/cells11203282.
615. Rosenberg, P.; Zhang, H.; Bryson, V.G.; Wang, C. SOCE in the Cardiomyocyte: The Secret Is in the Chambers. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **2021**, *473*, 417–434, doi:10.1007/s00424-021-02540-3.
616. Eder, P. Cardiac Remodeling and Disease: SOCE and TRPC Signaling in Cardiac Pathology. In *Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry (SOCE) Pathways: Emerging Signaling Concepts in Human (Patho)physiology*; Groschner, K., Graier, W.F., Romanin, C., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp. 505–521 ISBN 978-3-319-57732-6.
617. Ross, G.R.; Bajwa, T.; Edwards, S.; Emelyanova, L.; Rizvi, F.; Holmuhamedov, E.L.; Werner, P.; Downey, F.X.; Tajik, A.J.; Jahangir, A. Enhanced Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Influx and ORAI1 Expression in Ventricular Fibroblasts from Human Failing Heart. *Biol Open* **2017**, *6*, 326–332, doi:10.1242/bio.022632.
618. Benoist, D.; Stones, R.; Benson, A.P.; Fowler, E.D.; Drinkhill, M.J.; Hardy, M.E.L.; Saint, D.A.; Cazorla, O.; Bernus, O.; White, E. Systems Approach to the Study of Stretch and Arrhythmias in Right Ventricular Failure Induced in Rats by Monocrotaline. *Prog Biophys Mol Biol* **2014**, *115*, 162–172, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.008.
619. Sabourin, J.; Boet, A.; Rucker-Martin, C.; Lambert, M.; Gomez, A.-M.; Benitah, J.-P.; Perros, F.; Humbert, M.; Antigny, F. Ca<sup>2+</sup> Handling Remodeling and STIM1L/Orai1/TRPC1/TRPC4 Upregulation in Monocrotaline-Induced Right Ventricular Hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2018**, *118*, 208–224, doi:10.1016/j.yjmcc.2018.04.003.
620. Wen, L.; Voronina, S.; Javed, M.A.; Awais, M.; Szatmary, P.; Latawiec, D.; Chvanov, M.; Collier, D.; Huang, W.; Barrett, J.; et al. Inhibitors of ORAI1 Prevent Cytosolic Calcium-Associated Injury of Human Pancreatic Acinar Cells and Acute Pancreatitis in 3 Mouse Models. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 481–492.e7, doi:10.1053/j.gastro.2015.04.015.
621. Bruen, C.; Miller, J.; Wilburn, J.; Mackey, C.; Bollen, T.L.; Stauderman, K.; Hebbbar, S. Auxora for the Treatment of Patients With Acute Pancreatitis and Accompanying

- Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Pancreas* **2021**, *50*, 537–543, doi:10.1097/MPA.0000000000001793.
622. Miller, J.; Bruen, C.; Schnaus, M.; Zhang, J.; Ali, S.; Lind, A.; Stoecker, Z.; Stauderman, K.; Hebbar, S. Auxora versus Standard of Care for the Treatment of Severe or Critical COVID-19 Pneumonia: Results from a Randomized Controlled Trial. *Crit Care* **2020**, *24*, 502, doi:10.1186/s13054-020-03220-x.
623. Bruen, C.; Al-Saadi, M.; Michelson, E.A.; Tanios, M.; Mendoza-Ayala, R.; Miller, J.; Zhang, J.; Stauderman, K.; Hebbar, S.; Hou, P.C. Auxora vs. Placebo for the Treatment of Patients with Severe COVID-19 Pneumonia: A Randomized-Controlled Clinical Trial. *Crit Care* **2022**, *26*, 101, doi:10.1186/s13054-022-03964-8.
624. Barde, P.J.; Viswanadha, S.; Veeraraghavan, S.; Vakkalanka, S.V.; Nair, A. A First-in-Human Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of RP3128, an Oral Calcium Release-Activated Calcium (CRAC) Channel Modulator in Healthy Volunteers. *J Clin Pharm Ther* **2021**, *46*, 677–687, doi:10.1111/jcpt.13322.
625. PRCL Research Inc. *A Phase 2a Study to Evaluate Safety, Tolerability, and Efficacy of PRCL-02 in Patients With Moderate to Severe Chronic Plaque Psoriasis*; clinicaltrials.gov, 2020;
626. Walsh, L.; Reilly, J.F.; Cornwall, C.; Gaich, G.A.; Gipson, D.S.; Heerspink, H.J.L.; Johnson, L.; Trachtman, H.; Tuttle, K.R.; Farag, Y.M.K.; et al. Safety and Efficacy of GFB-887, a TRPC5 Channel Inhibitor, in Patients With Focal Segmental Glomerulosclerosis, Treatment-Resistant Minimal Change Disease, or Diabetic Nephropathy: TRACTION-2 Trial Design. *Kidney Int Rep* **2021**, *6*, 2575–2584, doi:10.1016/j.ekir.2021.07.006.
627. A Study to Test the Effect of Different Doses of BI 1358894 and Quetiapine in People With Depression - Full Text View - ClinicalTrials.gov Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04521478> (accessed on 5 July 2023).
628. Li, J.; Zhang, X.; Song, X.; Liu, R.; Zhang, J.; Li, Z. The Structure of TRPC Ion Channels. *Cell Calcium* **2019**, *80*, 25–28, doi:10.1016/j.ceca.2019.03.005.
629. Liao, Y.; Erxleben, C.; Yildirim, E.; Abramowitz, J.; Armstrong, D.L.; Birnbaumer, L. Orai Proteins Interact with TRPC Channels and Confer Responsiveness to Store Depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 4682–4687, doi:10.1073/pnas.0611692104.
630. Moccia, F.; Brunetti, V.; Perna, A.; Guerra, G.; Soda, T.; Berra-Romani, R. The Molecular Heterogeneity of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Vascular Endothelial Cells: The Different Roles of Orai1 and TRPC1/TRPC4 Channels in the Transition from Ca<sup>2+</sup>-Selective to Non-Selective Cation Currents. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, 3259, doi:10.3390/ijms24043259.
631. Jardin, I.; Diez-Bello, R.; Lopez, J.J.; Redondo, P.C.; Salido, G.M.; Smani, T.; Rosado, J.A. TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*, 331, doi:10.3390/cancers10090331.
632. McKeown, L.; Moss, N.K.; Turner, P.; Li, J.; Heath, N.; Burke, D.; O'Regan, D.; Gilthorpe, M.S.; Porter, K.E.; Beech, D.J. PDGF Maintains Stored Calcium through a Non-Clustering Orai1 Mechanism but Evokes Clustering If the ER Is Stressed by Store-Depletion. *Circ Res* **2012**, *111*, 66–76, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.263616.
633. Kar, P.; Lin, Y.-P.; Bhardwaj, R.; Tucker, C.J.; Bird, G.S.; Hediger, M.A.; Monico, C.; Amin, N.; Parekh, A.B. The N Terminus of Orai1 Couples to the AKAP79 Signaling Complex to Drive NFAT1 Activation by Local Ca<sup>2+</sup> Entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, e2012908118, doi:10.1073/pnas.2012908118.
634. Wang, Y.; Li, Z.C.; Zhang, P.; Poon, E.; Kong, C.W.; Boheler, K.R.; Huang, Y.; Li, R.A.; Yao, X. Nitric Oxide-CGMP-PKG Pathway Acts on Orai1 to Inhibit the Hypertrophy of

- Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells* **2015**, *33*, 2973–2984, doi:10.1002/stem.2118.
635. Zhang, X.; Pathak, T.; Yoast, R.; Emrich, S.; Xin, P.; Nwokonko, R.M.; Johnson, M.; Wu, S.; Delierneux, C.; Gueguinou, M.; et al. A Calcium/CAMP Signaling Loop at the ORAI1 Mouth Drives Channel Inactivation to Shape NFAT Induction. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1971, doi:10.1038/s41467-019-09593-0.
636. Badaoui, M.; Julienne, M.; Saby, C.; Gulick, L.; Peretti, M.; Jeannesson, P.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Collagen Type 1 Promotes Survival of Human Breast Cancer Cells by Overexpressing Kv10.1 Potassium and Orail Calcium Channels through DDR1-Dependent Pathway. *Oncotarget* **2017**, *9*, doi:10.18632/oncotarget.19065.
637. Nunes, P.; Demarex, N. Redox Regulation of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Antioxid Redox Signal* **2014**, *21*, 915–932, doi:10.1089/ars.2013.5615.
638. Jia, S.; Rodriguez, M.; Williams, A.G.; Yuan, J.P. Homer Binds to Orail and TRPC Channels in the Neointima and Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation. *Sci Rep* **2017**, *7*, 5075, doi:10.1038/s41598-017-04747-w.
639. Li, P.; Miao, Y.; Dani, A.; Vig, M.  $\alpha$ -SNAP Regulates Dynamic, on-Site Assembly and Calcium Selectivity of Orail Channels. *MBoC* **2016**, *27*, 2542–2553, doi:10.1091/mbc.e16-03-0163.
640. Azimi, I.; Milevskiy, M.J.G.; Chalmers, S.B.; Yapa, K.T.D.S.; Robitaille, M.; Henry, C.; Baillie, G.J.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. ORAI1 and ORAI3 in Breast Cancer Molecular Subtypes and the Identification of ORAI3 as a Hypoxia Sensitive Gene and a Regulator of Hypoxia Responses. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 208, doi:10.3390/cancers11020208.
641. Dubois, C.; Kondratska, K.; Kondratskyi, A.; Morabito, A.; Mesilmany, L.; Farfariello, V.; Toillon, R.-A.; Ziental Gelus, N.; Laurence, E.; Vanden Abeele, F.; et al. ORAI3 Silencing Alters Cell Proliferation and Promotes Mitotic Catastrophe and Apoptosis in Pancreatic Adenocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2021**, *1868*, 119023, doi:10.1016/j.bbamcr.2021.119023.
642. Planas-Rigol, E.; Terrades-Garcia, N.; Corbera-Bellalta, M.; Lozano, E.; Alba, M.A.; Segarra, M.; Espígol-Frigolé, G.; Prieto-González, S.; Hernández-Rodríguez, J.; Preciado, S.; et al. Endothelin-1 Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Migration across the Artery Wall: A Mechanism Contributing to Vascular Remodelling and Intimal Hyperplasia in Giant-Cell Arteritis. *Ann Rheum Dis* **2017**, *76*, 1624–1634, doi:10.1136/annrheumdis-2016-210792.
643. Chalmers, S.B.; Monteith, G.R. ORAI Channels and Cancer. *Cell Calcium* **2018**, *74*, 160–167, doi:10.1016/j.ceca.2018.07.011.
644. Li, P.; Zhou, L.; Zhao, T.; Liu, X.; Zhang, P.; Liu, Y.; Zheng, X.; Li, Q. Caspase-9: Structure, Mechanisms and Clinical Application. *Oncotarget* **2017**, *8*, 23996–24008, doi:10.18632/oncotarget.15098.
645. Qin, Y.; Meng, Q.; Wang, Q.; Wu, M.; Fang, Y.; Tu, C.; Hu, X.; Shen, B.; Chen, H.; Xu, X. Pregnancy-Specific Glycoprotein 9 Enhances Store-Operated Calcium Entry and Nitric Oxide Release in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Diagnostics (Basel)* **2023**, *13*, 1134, doi:10.3390/diagnostics13061134.
646. Dedkova, E.N.; Blatter, L.A. Nitric Oxide Inhibits Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry and Enhances Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Uptake in Bovine Vascular Endothelial Cells. *J Physiol* **2002**, *539*, 77–91, doi:10.1113/jphysiol.2001.013258.
647. Chen, J.; Wang, Y.; Nakajima, T.; Iwasawa, K.; Hikiji, H.; Sunamoto, M.; Choi, D.K.; Yoshida, Y.; Sakaki, Y.; Toyono-Oka, T. Autocrine Action and Its Underlying Mechanism of Nitric Oxide on Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 28739–28749, doi:10.1074/jbc.M000910200.

648. Muzorewa, T.T.; Buerk, D.G.; Jaron, D.; Barbee, K.A. TRPC Channel-Derived Calcium Fluxes Differentially Regulate ATP and Flow-Induced Activation of ENOS. *Nitric Oxide* **2021**, *111–112*, 1–13, doi:10.1016/j.niox.2021.03.005.
649. Gwack, Y.; Srikanth, S.; Oh-hora, M.; Hogan, P.G.; Lamperti, E.D.; Yamashita, M.; Gelinas, C.; Neems, D.S.; Sasaki, Y.; Feske, S.; et al. Hair Loss and Defective T- and B-Cell Function in Mice Lacking ORAI1. *Mol Cell Biol* **2008**, *28*, 5209–5222, doi:10.1128/MCB.00360-08.
650. McCarl, C.-A.; Picard, C.; Khalil, S.; Kawasaki, T.; Röther, J.; Papolos, A.; Kutok, J.; Hivroz, C.; LeDeist, F.; Plogmann, K.; et al. ORAI1 Deficiency and Lack of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Cause Immunodeficiency, Myopathy and Ectodermal Dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* **2009**, *124*, 1311–1318.e7, doi:10.1016/j.jaci.2009.10.007.
651. Lian, J.; Cuk, M.; Kahlfuss, S.; Kozhaya, L.; Vaeth, M.; Rieux-Laucat, F.; Picard, C.; Benson, M.J.; Jakovcevic, A.; Bilic, K.; et al. ORAI1 Mutations Abolishing Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Cause Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency (EDA-ID). *J Allergy Clin Immunol* **2018**, *142*, 1297–1310.e11, doi:10.1016/j.jaci.2017.10.031.
652. Janssen, L.J.; Mukherjee, S.; Ask, K. Calcium Homeostasis and Ionic Mechanisms in Pulmonary Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2015**, *53*, 135–148, doi:10.1165/rcmb.2014-0269TR.
653. Shaw, P.J.; Feske, S. Regulation of Lymphocyte Function by ORAI and STIM Proteins in Infection and Autoimmunity. *J Physiol* **2012**, *590*, 4157–4167, doi:10.1113/jphysiol.2012.233221.
654. Demaurex, N.; Poburko, D.; Frieden, M. Regulation of Plasma Membrane Calcium Fluxes by Mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2009**, *1787*, 1383–1394, doi:10.1016/j.bbabi.2008.12.012.
655. Shaw, P.J.; Feske, S. Physiological and Pathophysiological Functions of SOCE in the Immune System. *Front Biosci (Elite Ed)* **2012**, *4*, 2253–2268.
656. Di Sabatino, A.; Rovedatti, L.; Kaur, R.; Spencer, J.P.; Brown, J.T.; Morisset, V.D.; Biancheri, P.; Leakey, N.A.B.; Wilde, J.I.; Scott, L.; et al. Targeting Gut T Cell Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels Inhibits T Cell Cytokine Production and T-Box Transcription Factor T-Bet in Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol* **2009**, *183*, 3454–3462, doi:10.4049/jimmunol.0802887.
657. Feske, S.; Wulff, H.; Skolnik, E.Y. Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol* **2015**, *33*, 291–353, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112212.
658. Yu, B.-X.; Yuan, J.-N.; Zhang, F.-R.; Liu, Y.-Y.; Zhang, T.-T.; Li, K.; Lv, X.-F.; Zhou, J.-G.; Huang, L.-Y.; Shang, J.-Y.; et al. Inhibition of Orail-Mediated Ca<sup>2+</sup> Entry Limits Endothelial Cell Inflammation by Suppressing Calcineurin-NFATc4 Signaling Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2018**, *495*, 1864–1870, doi:10.1016/j.bbrc.2017.12.034.
659. Pan, Y.; Huang, J.; Liu, K.; Xie, C.; Chen, H.; Guo, Z.; Guo, S.; Chen, Y. Orail-Mediated Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Promotes Cervical Cancer Progression through IL-6 Signaling. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2022**, *9*.
660. Chen, W.; Thielmann, I.; Gupta, S.; Subramanian, H.; Stegner, D.; van Kruchten, R.; Dietrich, A.; Gambaryan, S.; Heemskerk, J.W.M.; Hermanns, H.M.; et al. Orail-Induced Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Enhances Phospholipase Activity and Modulates Canonical Transient Receptor Potential Channel 6 Function in Murine Platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2014**, *12*, 528–539, doi:10.1111/jth.12525.
661. Phillips, B.; Clark, J.; Martineau, É.; Rungta, R.L. Orail, RyR, and IP3R Channels Cooperatively Regulate Calcium Signaling in Brain Mid-Capillary Pericytes. *Commun Biol* **2023**, *6*, 493, doi:10.1038/s42003-023-04858-3.

662. Phillips, B.; Clark, J.; Martineau, É.; Rungta, R.L. Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels Mediate Microdomain Ca<sup>2+</sup> Signals and Amplify Gq-Coupled Ca<sup>2+</sup> Elevations in Capillary Pericytes 2022, 2022.05.25.493438.
663. Szabo, V.; Csákány-Papp, N.; Görög, M.; Madácsy, T.; Varga, Á.; Kiss, A.K.; Tél, B.; Jójárt, B.; Crul, T.; Dudás, K.; et al. Orai1 Calcium Channel Inhibition Prevents Progression of Chronic Pancreatitis. *JCI insight* **2023**, doi:10.1172/jci.insight.167645.
664. Perros, F.; Günther, S.; Ranchoux, B.; Godinas, L.; Antigny, F.; Chaumais, M.-C.; Dorfmüller, P.; Hautefort, A.; Raymond, N.; Savale, L.; et al. Mitomycin-Induced Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Evidence From Human Disease and Animal Models. *Circulation* **2015**, *132*, 834–847, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.014207.
665. Santos-Ribeiro, D.; Lecocq, M.; de Beukelaer, M.; Bouzin, C.; Palmai-Pallag, M.; Yakoub, Y.; Huaux, F.; Horman, S.; Perros, F.; Pilette, C.; et al. Bleomycin-induced Lung Injury: Revisiting an Old Tool to Model Group III PH Associated with Pulmonary Fibrosis. *Pulm Circ* **2023**, *13*, e12177, doi:10.1002/pul2.12177.
666. Nagy, A. Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. *Genesis* **2000**, *26*, 99–109.



**Titre :** Rôle des canaux Orai et TRPC dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire

**Mots clés :** Hypertension artérielle pulmonaire, cellules musculaires lisses, homéostasie calcique, canaux Orai, canaux TRPC

**Résumé :** L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare et sévère résultant d'un intense remodelage de la paroi vasculaire conduisant à une obstruction progressive des petites artères pulmonaires, notamment provoquée par l'accumulation pathologique des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CML-AP). L'obstruction des artères pulmonaires entraîne, à terme, une insuffisance cardiaque droite et le décès du patient.

Lors de ma thèse, je me suis intéressé à la dérégulation de l'homéostasie calcique dans les CML-AP. Cette homéostasie calcique est notamment maintenue par les canaux calciques Orai et TRPC, qui sont activés lors d'une déplétion en calcium du réticulum endoplasmique. L'ensemble de mes travaux a mis en évidence une augmentation protéique et fonctionnelle des canaux

Orai1, TRPC3 et TRPC6 dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP. J'ai également démontré, *in vitro*, que l'inhibition de ces canaux atténue le phénotype pathologique des CML-AP isolées de patients atteints d'HTAP. Cela s'effectue notamment grâce à un rééquilibrage de la balance prolifération/apoptose à l'origine de l'accumulation pathologique des CML-AP. *In vivo*, j'ai confirmé que l'inhibition pharmacologique du canal Orai1 ou TRPC3 a un effet bénéfique sur le développement de l'HTAP grâce à une diminution du remodelage vasculaire pulmonaire.

Conjointement, ces résultats apportent de nouvelles connaissances sur la pathophysiologie de l'HTAP et permettent de considérer les canaux Orai1 et TRPC comme de nouvelles cibles pour une thérapie innovante contre l'HTAP.

**Title :** Role of Orai and TRPC channels in the development of pulmonary arterial hypertension

**Keywords :** Pulmonary arterial hypertension, smooth muscle cells, calcium homeostasis, Orai channels, TRPC channels

**Abstract :** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and severe disease resulting from intense remodeling of the pulmonary arterial wall leading to progressive obstruction of the small pulmonary arteries, mainly due to pathological accumulation of pulmonary artery smooth muscle cells (PASM). The pulmonary arterial obstruction leads to right heart failure and ultimately to the patient's death.

During my thesis, I focused on the deregulation of calcium homeostasis in PASM. Calcium homeostasis is mainly regulated by the Orai and TRPC calcium channels, which are activated upon endoplasmic reticulum calcium depletion. Altogether, my work revealed an increased protein expression and function

Orai1, TRPC3 and TRPC6 channels in PASM from PAH patients. I also demonstrated, *in vitro*, that inhibition of these channels attenuates the pathological phenotype of PASM isolated from PAH patients, in particular, by restoring the proliferation/apoptosis balance at the origin of the pathological accumulation of PASM. *In vivo*, I found that pharmacological inhibition of Orai1 or TRPC3 channel reduced the development of PAH by reducing pulmonary vascular and cardiac remodeling.

Taken together, these results provide new insights into the pathophysiology of PAH, and allow us to consider the Orai1 and TRPC channels as innovative therapeutic targets for PAH.