



**HAL**  
open science

# Étude de l'importance de la confluence cellulaire sur l'activité des canaux TRPV4 en condition d'hypoxie : apport de la technique de transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET)

Solène Barbeau

► **To cite this version:**

Solène Barbeau. Étude de l'importance de la confluence cellulaire sur l'activité des canaux TRPV4 en condition d'hypoxie : apport de la technique de transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET). Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0458 . tel-04851141

**HAL Id: tel-04851141**

**<https://theses.hal.science/tel-04851141v1>**

Submitted on 20 Dec 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.



THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR**  
**DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE "Sciences de la Vie et de la Santé"  
SPÉCIALITÉ : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Solène BARBEAU

**Étude de l'importance de la confluence cellulaire sur l'activité des canaux TRPV4 en condition d'hypoxie : apport de la technique de transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET)**

Sous la direction du  
Pr Thomas DUCRET

Soutenue le 19 décembre 2022

Membres du jury :

Mme. Clotilde BILLOTTET	Professeure	Université de Bordeaux	Présidente
Mme. Muriel LAFFARGUE	Directrice de Recherche	Université de Toulouse	Rapporteur
M. Philippe GAILLY	Professeur	Université Catholique de Louvain	Rapporteur
M. Thomas DUCRET	Professeur	Université de Bordeaux	Directeur
M. Yann PERCHERANCIER	Directeur de Recherche	Université de Bordeaux	Invité



**Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux**

**INSERM U1045**

Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale

Hôpital Xavier Arnoz

Avenue du Haut Lévêque

33604 - Pessac Cedex

France

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Professeur Thomas Ducret, pour son encadrement tout au long de ma thèse, pour sa gentillesse, son temps, ses conseils et les nombreuses relectures au cours de ces 3 ans. Merci aussi pour son aide au poste de patch et lors des manips, et en particulier pour celles du week-end !

Je remercie également Madame la Professeure Clotilde Billottet, Madame la Docteur Muriel Laffargue et Monsieur le Professeur Philippe Gailly d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse et du temps qu'ils consacrent à l'évaluation de ce travail.

Merci au Docteur Christelle Guibert, et aux Professeurs Roger Marthan et Patrick Berger de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 1 du CRCTB.

Je souhaite également remercier l'équipe Bioélectronique de l'IMS pour son accueil lors des manips que j'avais à réaliser là-bas, et tout particulièrement le Docteur Yann Percherancier, ainsi qu'Alexandre et Yann. Merci pour les ADN, pour leurs lumières sur le BRET, et bien évidemment pour le prêt du Tristar et du spectrophotomètre !

Un grand merci à toutes les personnes du laboratoire au CRCTB que j'ai côtoyées au quotidien.

Merci au Professeur Jean-François Quignard, qui m'avait encadrée lors de mes stages de master, pour son aide, notamment au poste de patch.

Tous ceux avec qui je mangeais le midi, merci pour ces repas animés et cette bonne humeur communicative !

Un merci tout particulier à Céline pour sa gentillesse, et pour toutes les commandes passées, et grâce à qui mes départs en congrès se sont toujours très bien déroulés.

Merci à Marilyne, Isabel et Polo pour être toujours prêts à nous aider, et avec le sourire !

Je n'oublie pas Pauline, Pauline et Guillaume, avec qui j'ai partagé le bureau du 2<sup>e</sup> pendant une bonne partie de ma thèse. Merci à vous pour tous les conseils, les discussions, la bonne humeur et l'ambiance générale.

Merci à ceux du loft 1 pour votre sympathie, en particulier Thaïs, Claire-Marie et Ophélie, et désolée pour les nombreux passages pour l'eau !

Et bien sûr, merci à tous ceux du loft 2, qui sont restés plus ou moins longtemps. Eléna, merci pour ta bonne humeur et ta patience. Lukas et Clément, sans vous, le bureau n'aurait pas été pareil ! Merci pour votre enthousiasme (trop ?) débordant, pour toutes les blagues (ou presque), et pour l'entraide en général. C'était un plaisir de partager ce bureau avec vous !

Enfin, merci à ma famille et mes amis pour leur soutien. Mes parents, merci pour tout, et Tony, merci de me faire toujours rire !

# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IV
INTRODUCTION.....	1
<b>1. Circulation pulmonaire.....</b>	<b>2</b>
1.1. Description.....	2
1.2. Composition des artères.....	3
<b>2. Hypertension pulmonaire.....</b>	<b>4</b>
2.1. Vasoconstriction hypoxique.....	5
2.2. Classification.....	5
2.3. Physiopathologie.....	7
2.3.1. Vasoconstriction.....	7
2.3.2. Remodelage.....	7
2.4. Voies de traitement.....	9
2.4.1. La voie du NO.....	9
2.4.2. La voie endothéline.....	10
2.4.3. La voie prostacycline.....	11
2.4.4. Autres.....	12
2.5. Modèles d'étude.....	12
<b>3. Homéostasie calcique.....</b>	<b>13</b>
3.1. Sources calciques intracellulaires.....	14
3.2. Sources calciques extracellulaires.....	14
3.2.1. Les canaux dépendants du voltage (VOC).....	14
3.2.2. Les canaux ROC ( <i>Receptor-Operated Channels</i> ).....	14
3.2.3. Les canaux SOC ( <i>Store-Operated Channels</i> ).....	14
3.2.4. Les canaux SAC ( <i>Stretch-Activated Channels</i> ).....	15
<b>4. Canaux mécanosensibles (SAC).....</b>	<b>16</b>
4.1. Revue « <i>Mechanosensitivity in Pulmonary Circulation: Pathophysiological Relevance of Stretch-Activated Channels in Pulmonary Hypertension</i> ».....	18
4.2. Les canaux TRP.....	43
4.2.1. Description.....	43
4.2.2. TRP au niveau vasculaire et dans l'hypertension pulmonaire.....	46
4.3. TRPV4.....	48
4.3.1. Description.....	48
4.3.2. TRPV4 au niveau vasculaire.....	49
4.3.3. TRPV4 dans l'HTP.....	50

4.3.4. Interaction avec le cytosquelette .....	51
4.3.5. Mécanismes d'adressage à la membrane .....	51
4.3.6. Modulation par le Ca <sup>2+</sup> et interaction avec la calmoduline.....	52
4.4. Piezo1 .....	53
4.4.1. Description .....	53
4.4.2. Piezo1 au niveau vasculaire pulmonaire .....	54
4.5. Revue « Implication des canaux mécanosensibles Piezo1 et TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire » .....	54
<b>5. Contraintes environnementales .....</b>	<b>60</b>
5.1. Hypoxie .....	60
5.1.1. Modèle d'hypoxie .....	60
5.1.2. Espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	61
5.1.3. Effet de l'hypoxie sur les TRP .....	62
5.2. Hyperoxie .....	63
5.2.1. Hyperoxie et stress oxydatif.....	63
5.2.2. Effet de l'hyperoxie sur les TRP.....	64
5.3. Stress mécaniques .....	65
5.3.1. La confluence cellulaire .....	65
5.3.2. Composition membranaire en cholestérol .....	66
5.3.3. Effet de l'étirement .....	66
<b>OBJECTIFS DE LA THÈSE .....</b>	<b>68</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>71</b>
<b>1. Cellules utilisées .....</b>	<b>72</b>
1.1. HEK293T .....	72
1.2. Cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires humaines .....	72
1.3. Culture des cellules .....	72
<b>2. Vecteurs / sondes .....</b>	<b>73</b>
2.1. Séquences .....	73
2.2. Transfection.....	77
<b>3. Solutions d'enregistrement .....</b>	<b>78</b>
3.1. Solutions salines utilisées en patch-clamp .....	78
3.2. KREBS-HEPES .....	78
3.3. Solution saline utilisée en BRET .....	78
<b>4. Liste des agonistes, antagonistes et autres produits utilisés.....</b>	<b>79</b>
4.1. Agonistes .....	79
4.2. Antagonistes .....	79
4.3. Autres .....	79

<b>5.</b>	<b>Anticorps.....</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>Patch-clamp .....</b>	<b>81</b>
6.1.	Principe.....	81
6.2.	Procédure expérimentale .....	82
6.3.	Les protocoles d'enregistrements.....	82
<b>7.</b>	<b>BRET (Transfert d'Énergie en Résonance de Bioluminescence) .....</b>	<b>84</b>
7.1.	Contexte .....	84
7.2.	Principe.....	84
7.2.1.	Transfert d'Énergie en Résonance .....	84
7.2.2.	Bioluminescence .....	85
7.2.3.	BRET .....	85
7.2.4.	Constructions BRET .....	86
7.3.	Calcul du ratio de BRET .....	88
7.4.	Procédure expérimentale pour le BRET avec lecteur de plaques .....	88
7.5.	Mesure d'une concentration-réponse .....	88
7.6.	Mesure d'une cinétique de réponse .....	89
7.7.	Procédure expérimentale pour le BRET avec spectrophotomètre .....	89
<b>8.</b>	<b>Mesure calcique avec la sonde Fura-2 LR AM .....</b>	<b>90</b>
8.1.	Principe.....	90
8.2.	Procédure expérimentale .....	90
8.3.	Analyses .....	91
<b>9.</b>	<b>Mesure calcique avec la sonde Fluo-4 AM .....</b>	<b>92</b>
9.1.	Principe.....	92
9.2.	Procédure expérimentale .....	92
9.3.	Analyses .....	93
<b>10.</b>	<b>Microscopie confocale.....</b>	<b>94</b>
10.1.	Acquisition des images .....	94
10.2.	Analyse de l'expression membranaire de TRPV4.....	94
<b>11.</b>	<b>Biotinylation des protéines de surface.....</b>	<b>95</b>
11.1.	Principe .....	95
11.2.	Procédure expérimentale.....	96
11.3.	Western blot .....	96
11.4.	Analyses .....	97
<b>12.</b>	<b>Statistiques.....</b>	<b>97</b>
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>		<b>98</b>
<b>1.</b>	<b>Effet de l'hypoxie sur TRPV4 selon la confluence cellulaire .....</b>	<b>99</b>
1.1.	Contexte .....	99

1.2.	La confluence cellulaire module l'activité de TRPV4 en réponse à l'hypoxie.....	99
1.3.	Résultats complémentaires .....	126
1.3.1.	Mesures du calcium cytosolique sur cellules uniques avec la sonde Fura-2 ....	126
1.3.2.	Interaction entre TRPV4 et la CaM grâce au BRET.....	128
1.4.	Discussion influence de l'hypoxie et de la confluence .....	130
<b>2.</b>	<b>Effet de la variation du pourcentage en O<sub>2</sub> sur TRPV4.....</b>	<b>131</b>
2.1.	Hypoxie chronique intermédiaire (10 % O <sub>2</sub> ).....	131
2.1.1.	Calcium au niveau de TRPV4 avec la sonde BRET 2G.....	131
2.1.2.	Interaction entre TRPV4 et la CaM grâce au BRET intermoléculaire .....	133
2.2.	Hypoxie aiguë .....	135
2.2.1.	Effet de l'hypoxie aiguë sur le calcium au niveau de TRPV4.....	135
2.2.2.	Effet de l'hypoxie aiguë sur le calcium cytosolique.....	137
2.2.3.	Effet de l'hypoxie aiguë sur la localisation membranaire de TRPV4 .....	138
2.2.4.	Effet de l'hypoxie aiguë sur l'interaction entre TRPV4 et la CaM .....	139
2.3.	Hyperoxie chronique (60 % O <sub>2</sub> ).....	139
2.3.1.	Calcium au niveau de TRPV4 avec la sonde BRET 2G.....	140
2.3.2.	Calcium cytosolique avec la sonde BRET Calflux soluble .....	141
2.3.3.	Interaction entre TRPV4 et la CaM grâce au BRET intermoléculaire .....	142
2.4.	Discussion effet du pourcentage en O <sub>2</sub> .....	143
<b>3.</b>	<b>Travaux complémentaires.....</b>	<b>144</b>
3.1.	Projet CANALBRET .....	144
3.1.1.	Contexte .....	144
3.1.2.	Criblage à haut débit des ligands de TRPV1 à la lumière de la technique de BRET .....	144
3.1.3.	Les sondes BRET encodées génétiquement mettent en lumière la variation de sélectivité ionique induite par le biais de ligand pour TRPV1 et P2X5/7 .....	168
3.2.	Piezo1 dans l'HTP.....	169
3.2.1.	Contexte .....	169
3.2.2.	L'activation du canal Piezo1 s'oppose à la vasoconstriction des artères pulmonaires dans un modèle de rat à un stade précoce de développement de l'HTP : le rôle de l'influx Ca <sup>2+</sup> et de la voie Akt-eNOS.....	169
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>188</b>
<b>1.</b>	<b>Effet de l'hypoxie et des forces mécaniques sur les SAC .....</b>	<b>189</b>
1.1.	Modulation de l'activité de TRPV4 en hypoxie selon la confluence.....	189
1.2.	Implication de Piezo1 dans la relaxation au cours de l'HTP .....	191
<b>2.</b>	<b>Apport de la technique de BRET .....</b>	<b>192</b>
2.1.	Étude des effets de l'hypoxie et de l'hyperoxie .....	192
2.2.	Étude des effets de stress mécaniques.....	193

2.3. Utilisation de sondes à senseur ionique.....	194
2.4. Perspectives d'utilisation du BRET .....	195
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>196</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>198</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>212</b>

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la circulation pulmonaire.....	2
Figure 2 : Schéma de la composition d'une artère.....	3
Figure 3 : Coupe d'artères intrapulmonaires de souris contrôles (à gauche) et hypoxiques chroniques (à droite).....	8
Figure 4 : Schéma de la voie du NO. ....	9
Figure 5 : Schéma de la voie de l'endothéline. ....	10
Figure 6 : Schéma de la voie des prostacyclines. ....	11
Figure 7 : Schéma des stocks et voies $Ca^{2+}$ dans une cellule. ....	13
Figure 8 : Contraintes mécaniques au niveau des artères.....	16
Figure 9 : Schémas des différents modèles d'activation des SAC.....	17
Figure 10 : Différentes sous-familles de TRP. ....	43
Figure 11 : Différents modes d'activation des TRP. ....	44
Figure 12 : Structure des TRP et assemblage en tétramère. ....	45
Figure 13 : Schéma de la structure de TRPV4. ....	49
Figure 14 : Structure de la calmoduline (CaM).....	52
Figure 15 : Structure de Piezo1. ....	53
Figure 16 : Production de ROS mitochondriales. ....	62
Figure 17 : Production de ROS. ....	64
Figure 18 : Schéma récapitulatif des objectifs de la thèse. ....	70
Figure 19 : Schémas des différentes configurations en patch-clamp. ....	81
Figure 20 : Spectres d'émission du donneur et de l'accepteur lors d'un transfert d'énergie...	85
Figure 21 : Réaction permettant l'émission de bioluminescence.....	86
Figure 22 : Spectres d'excitation et d'émission de mNeonGreen. ....	86
Figure 23 : Schéma des différents types de construction utilisés pour les mesures de BRET.	87
Figure 24 : Dispositif de mesure de BRET en temps réel dans l'incubateur en hypoxie aiguë. ....	89
Figure 25 : Structure de la sonde Fura-2 LR AM. ....	90
Figure 26 : Paramètres de la réponse calcique. ....	91
Figure 27 : Structure de la sonde Fluo-4 AM.....	92
Figure 28 : Profil d'intensité de fluorescence pour déterminer l'expression membranaire de TRPV4.....	94
Figure 29 : Schéma du principe de biotinylation des protéines de surface. ....	95
Figure 30 : Caractérisation des réponses calciques TRPV4 dans des HEK transfectées avec TRPV4-WT et cultivées en normoxie à faible densité.....	126
Figure 31: Modulation des réponses calciques TRPV4 à l'hypoxie à faible et forte densités. ....	127
Figure 32 : L'interaction de TRPV4 avec la CaM est diminuée dans les cellules cultivées à forte densité en hypoxie.....	129
Figure 33 : Les variations de $Ca^{2+}$ au niveau de TRPV4 ne sont pas modifiées en hypoxie intermédiaire (10 % $O_2$ ). ....	132
Figure 34 : Interaction entre TRPV4 et la CaM en hypoxie intermédiaire. ....	134



Figure 35 : Les variations de $Ca^{2+}$ au niveau de TRPV4 en présence ou absence de l'inhibiteur. .....	135
Figure 36 : Les variations de $Ca^{2+}$ au niveau de TRPV4 en hypoxie aiguë.....	136
Figure 37 : Les variations de $Ca^{2+}$ cytosolique en hypoxie aiguë.....	137
Figure 38 : La localisation membranaire de TRPV4 n'est pas modifiée en hypoxie aiguë...	138
Figure 39 : L'interaction entre TRPV4 et la CaM n'est pas modifiée en hypoxie aiguë.....	139
Figure 40 : Les variations de $Ca^{2+}$ au niveau de TRPV4 ne sont pas modifiées en hyperoxie. .....	140
Figure 41 : Les variations de $Ca^{2+}$ cytosolique suite à l'activation de TRPV4 ne sont pas modifiées en hyperoxie. ....	141
Figure 42 : Interaction entre TRPV4 et la CaM en hyperoxie. ....	142
Figure 43 : L'activité de TRPV4 en réponse à l'hypoxie est affectée par la confluence cellulaire. .....	189
Figure 44 : Perspectives d'étude sur l'effet de l'hypoxie selon la confluence cellulaire.....	191
Figure 45 : Implication de Piezo1 dans la vasorelaxation au cours du développement de l'HTP. .....	192
Figure 46 : Système d'étirement des cellules. ....	193
Figure 47 : Mesure de l'alignement cellulaire. ....	194
Figure 48 : Perspectives pour l'utilisation du BRET. ....	195

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques hémodynamiques de l'hypertension pulmonaire. ....	4
Tableau 2 : Classification des groupes d'hypertension pulmonaire (HTP). ....	6
Tableau 3 : Solutions salines pour le patch-clamp. ....	78
Tableau 4 : Composition de la solution saline KREBS-HEPES. ....	78
Tableau 5 : Composition de la solution saline BRET. ....	78
Tableau 6 : Tableau des agonistes utilisés. ....	79
Tableau 7 : Tableau des antagonistes utilisés. ....	79
Tableau 8 : Tableau des produits utilisés. ....	79
Tableau 9 : Tableau des anticorps utilisés. ....	80

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

·OH = radical hydroxyl  
[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = concentration calcique intracellulaire  
1G et 2G = sondes de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>nde</sup> générations  
5-HT = sérotonine  
AC = adénylate cyclase  
ACh = acétylcholine  
ADN = acide désoxyribonucléique  
AIP = artère intrapulmonaire  
AMPc = adénosine mono phosphate cyclique  
AngII = angiotensine II  
ANK / ARD = domaine de répétition ankyrine (*ankyrin repeat domain*)  
ARNm = acide ribonucléique messenger  
ATP = adénosine triphosphate  
BRET = transfert d'énergie en résonance de bioluminescence  
Ca<sup>2+</sup> = ion calcique  
CaM = calmoduline  
CCE / SOCE = entrée capacitive de calcium / *store-operated calcium entry*  
CCVD = canaux calciques voltage-dépendants  
CE = cellule endothéliale  
Cl<sup>-</sup> = ion chlorure  
CML = cellule musculaire lisse  
CMLAP = cellule musculaire lisse d'artères pulmonaires  
CO<sub>2</sub> = dioxyde de carbone  
CoH = coelentérazine H  
DAG = diacylglycérol  
ECE = enzyme de conversion de l'endothéline  
EET = acide époxyeicosatriénoïque  
ET-1 = endothéline-1  
ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> = récepteurs à l'endothéline de type A et B  
FRET = transfert d'énergie en résonance de Förster  
GCs = guanylate cyclase soluble  
GFP = protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*)  
GMPc = guanosine monophosphate cyclique  
GTP = guanosine triphosphate  
H<sup>+</sup> = ion hydronium  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peroxyde d'hydrogène  
HEK = cellules embryonnaires de rein humaines (*human embryonic kidney*)  
HIF = facteurs induit par l'hypoxie (*hypoxia inducible factors*)  
HTP = hypertension pulmonaire  
IP = récepteur de la prostacycline  
IP<sub>3</sub> = inositol triphosphate  
K<sup>+</sup> = ion potassique  
MAPK = protéine kinase activée par des agents mitogènes (*mitogen-activated protein kinase*)  
Mg<sup>2+</sup> = ion magnésium  
MLCK = kinase des chaînes légères de la myosine (*myosin light chain kinase*)  
MLCP = phosphatase des chaînes légères de la myosine (*myosin light chain phosphatase*)  
mNeonG = mNeonGreen  
N<sub>2</sub> = diazote  
Na<sup>+</sup> = ion sodique  
NADPH = nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
nLuc = nanoLuciférase  
NO = oxyde nitrique

NOS = oxyde nitrique synthase (eNOS = NOS endothéliale)  
NOX = NADPH oxydases  
O<sub>2</sub> = dioxygène  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> = anion superoxide  
ONOO<sup>-</sup> = peroxyinitrites  
PACSIN = protéine kinase C et substrat de la caséine kinase de neurones  
PAF = fibroblastes artériels adventitiels pulmonaires  
PAPm = pression artérielle pulmonaire moyenne  
PAPO = pression artérielle pulmonaire d'occlusion  
PDE-5 = phosphodiesterase-5  
PGH<sub>2</sub> = prostaglandine H<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub> = prostaglandine I<sub>2</sub>  
PI<sub>3</sub>K = phosphoinositide 3-kinase  
PIP<sub>2</sub> = phosphatidyl inositol biphosphate  
PKA = protéine kinase A  
PKC = protéine kinase C  
PKG = protéine kinase G  
PLC = phospholipase C  
PPO<sub>2</sub> = pression partielle en O<sub>2</sub>  
RCPG = récepteur couplé à une protéine G  
RE = réticulum endoplasmique  
RET = transfert d'énergie en résonance  
RIP<sub>3</sub> = récepteur inositol triphosphate  
RNS = espèces réactives de l'azote (*reactive nitrogen species*)  
ROC = canaux récepteurs (*receptor-operated channels*)  
ROS = espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*)  
RS = réticulum sarcoplasmique  
RVP = résistance vasculaire pulmonaire  
RyR = récepteur à la ryanodine  
SAC = canaux mécanosensibles (*stretch-activated channels*)  
SERCA = pompe calcium ATPase du réticulum sarco-endoplasmique (*sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase*)  
SOC = canaux activés par la déplétion des stocks calciques intracellulaires (*store-operated channels*)  
TRP = canaux potentiel de récepteur transitoire (*transient receptor potential*)  
TRPV = canaux potentiel de récepteur transitoire vanilloïdes  
VEGF = facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
VOC = canaux dépendants du voltage (*voltage-operated channels*)

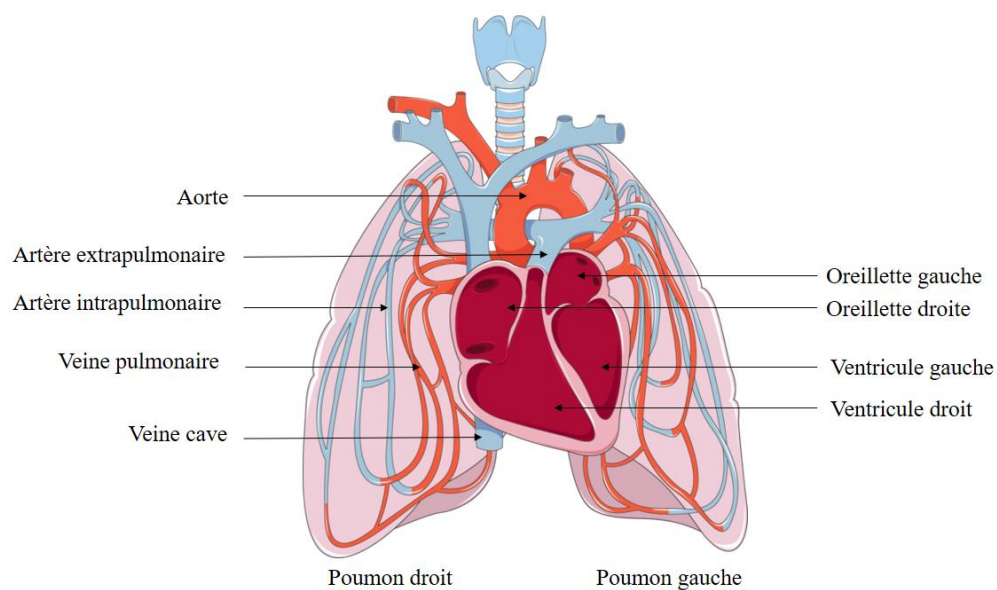
# **INTRODUCTION**

# 1. Circulation pulmonaire

## 1.1. Description

La circulation pulmonaire, également appelée la petite circulation, permet de transporter le sang entre le cœur et les poumons. Les veines pulmonaires acheminent le sang riche en dioxygène ( $O_2$ ) et pauvre en dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) provenant des poumons vers le cœur gauche où il est ensuite envoyé vers les différents organes via la circulation systémique à plus forte pression. Le sang va permettre de distribuer l' $O_2$  aux organes qui vont se décharger en  $CO_2$  avant de revenir vers le cœur et à la circulation pulmonaire. Les artères pulmonaires amènent ce sang pauvre en  $O_2$  et enrichi en  $CO_2$  du cœur droit vers les poumons où le sang va se réoxygéner et se débarrasser du  $CO_2$  au niveau des alvéoles pulmonaires [Figure 1]. La circulation pulmonaire est un système à basse pression dont la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) est d'environ 15 mmHg au repos chez les patients sains.

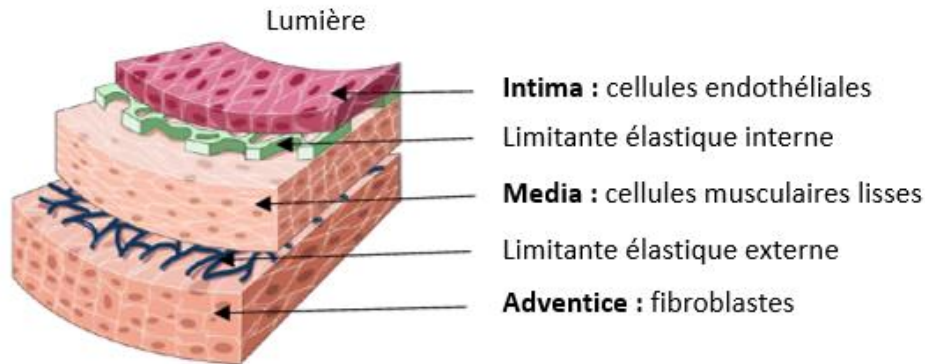
Le tronc pulmonaire se divise en artères extrapulmonaires droite et gauche à la sortie du cœur puis celles-ci deviennent intrapulmonaires à l'entrée dans les poumons droit et gauche. Les poumons de l'Homme se divisent en 3 lobes pulmonaires droits et 2 lobes pulmonaires gauches. Les artères intrapulmonaires se ramifient en 17 embranchements chez l'Homme où les artères deviennent de plus en plus petites avec l'ordre et de moins en moins muscularisées. Les plus fines artérioles au niveau des alvéoles sont des capillaires permettant des échanges d' $O_2$  et de  $CO_2$  dans le sang à la barrière alvéolo-capillaire.



**Figure 1 : Schéma de la circulation pulmonaire.**

## 1.2. Composition des artères

Les artères sont composées de 3 tuniques séparées par des limitantes élastiques constituées de collagène et d'élastine. La première, au contact du sang, est l'intima composée d'une monocouche de **cellules endothéliales (CE)**. Vient ensuite la media, composée de **cellules musculaires lisses (CML)** contractiles et enfin l'adventice composée majoritairement de **fibroblastes** [Figure 2].



**Figure 2 : Schéma de la composition d'une artère.**

*L'intima contient les cellules endothéliales au plus proche de la lumière du vaisseau. Elle est séparée de la media, contenant les cellules musculaires lisses, par la limitante élastique interne. Puis, après la limitante élastique externe, se trouvent des fibroblastes composant l'adventice.*

Les CE sont les cellules les plus internes à la lumière des vaisseaux et subissent les forces de cisaillement dues à l'écoulement du sang auxquelles elles sont sensibles.

Les CML, quant à elles, permettent la contraction des vaisseaux et participent au maintien du tonus vasculaire. Ces cellules sont sensibles aux tensions pariétales au sein de la media, et à la pression sanguine exerçant des contraintes mécaniques perpendiculaires aux CML.

L'adventice est la couche la plus externe aux vaisseaux assurant un rôle d'ancrage et de protection. Elle est composée de tissu conjonctif, notamment de fibres de collagène et de fibres élastiques, et contient également des fibroblastes, ainsi que des cellules du système immunitaire comme des mastocytes et des cellules dendritiques. L'adventice peut être irriguée en fonction du diamètre du vaisseau par de petits vaisseaux sanguins appelés *vasa vasorum* permettant l'apport en nutriments, et innervée par des fibres nerveuses des systèmes nerveux sympathique (majoritairement) et parasympathique participant au tonus vasculaire.

## 2. Hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une pathologie de la circulation pulmonaire caractérisée par une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) accrue. Pendant de nombreuses années, l'HTP était définie par une PAPm supérieure à 25 mmHg au repos [1–3] mais une nouvelle définition a récemment été proposée. Une revue de la littérature de Kovacs *et al.* sur des études mesurant la PAPm par cathétérisation droite a été réalisée en 2009. Les données de 47 études différentes comprenant 1187 sujets sains donnent une PAPm au repos de  $14.0 \pm 3.3$  mmHg avec une limite supérieure normale limite de 20.6 mmHg [4]. Les PAPm entre 20 et 25 mmHg pourraient alors s'appliquer à des cas d'HTP remettant en question la définition arbitraire de l'HTP par une PAPm supérieure à 25 mmHg. Ainsi, selon les nouvelles recommandations, **l'HTP est désormais définie par une PAPm supérieure à 20 mmHg** [5]. En plus de cette valeur de PAPm, différents paramètres doivent également être pris en compte comme le débit cardiaque, la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) et la présence d'une pathologie vasculaire pulmonaire associée à des changements structuraux des petites artères pulmonaires [Tableau 1] afin de distinguer une HTP pré-capillaire d'une HTP post-capillaire. Pour identifier l'HTP pré-capillaire, la résistance vasculaire pulmonaire (RVP) ( $RVP = (PAPm - PAPO) / \text{débit cardiaque}$ ) doit être incluse dans la définition afin de distinguer une élévation de la PAP due à une pathologie vasculaire pulmonaire de celle due à une élévation de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion ou due à un débit cardiaque élevé [5, 6].

Définition	Paramètres hémodynamiques
HTP	PAPm > 20 mmHg
HTP pré-capillaire	PAPm > 20 mmHg PAPO ≤ 15 mmHg RVP > 2 unités Wood
HTP post-capillaire isolée	PAPm > 20 mmHg PAPO > 15 mmHg RVP ≤ 2 unités Wood
HTP pré- et post-capillaires combinées	PAPm > 20 mmHg PAPO > 15 mmHg RVP > 2 unités Wood
HTP d'exercice	Pente PAPm/débit cardiaque entre repos et exercice > 3 mmHg/L/min

**Tableau 1 : Caractéristiques hémodynamiques de l'hypertension pulmonaire.**

*HTP = Hypertension Pulmonaire, PAPm = Pression Artérielle Pulmonaire moyenne, PAPO = Pression Artérielle Pulmonaire d'Occlusion, RVP = Résistance Vasculaire Pulmonaire.*

*Tableau adapté de Humbert et al. 2022 [5].*



## 2.1. Vasoconstriction hypoxique

La vasoconstriction hypoxique pulmonaire est la réponse physiologique de la circulation pulmonaire à une baisse de la pression partielle en O<sub>2</sub>. Cette réponse est spécifique de la circulation pulmonaire. En effet, lors d'une hypoxie alvéolaire localisée, les vaisseaux se contractent pour rediriger le flux sanguin vers les alvéoles ayant une pression partielle en O<sub>2</sub> plus élevée. Ce mécanisme de régulation permet ainsi une meilleure réoxygénation du sang.

En revanche, lors d'une hypoxie généralisée (altitude, pathologies respiratoires), la vasoconstriction hypoxique est elle aussi généralisée, entraînant une hausse de la PAPm. Un maintien de cette vasoconstriction hypoxique dans le temps va induire une augmentation des résistances vasculaires et de la pression sanguine intraluminale, puis mener à un remodelage des artères pulmonaires. Les vaisseaux vont se musculariser avec une prolifération et migration des CML et le diamètre de la lumière va diminuer. Cela va entraîner une augmentation du travail cardiaque droit qui conduira à une insuffisance cardiaque droite et au décès des patients.

## 2.2. Classification

L'HTP a été classée en 5 groupes [Tableau 2].

Le premier groupe est appelé hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) et regroupe les formes idiopathiques, héréditaires, induites par des drogues et toxines, associées à une pathologie des tissus conjonctifs, une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), une hypertension portale, une pathologie cardiaque congénitale ou à une schistosomiase, les formes avec implication des veines et capillaires et enfin le syndrome d'hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né.

Le deuxième groupe concerne les hypertensions pulmonaires associées à une pathologie cardiaque gauche. Elle comprend l'hypertension pulmonaire due à une insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection ventriculaire gauche préservée ou réduite, associée avec une maladie valvulaire cardiaque ou à des conditions cardiovasculaires congénitales ou acquises menant à une hypertension post-capillaire.

L'hypertension pulmonaire de groupe 3 est associée à une pathologie pulmonaire et/ou l'hypoxie. Elle peut être associée aux pathologies pulmonaires obstructives ou emphysèmes, aux pathologies pulmonaires restrictives ou d'autres pathologies combinant les deux, à des syndromes d'hypoventilation, ainsi qu'à l'hypoxie sans pathologie pulmonaire ou à des désordres pulmonaires développementaux.

L'hypertension pulmonaire de groupe 4 est due à des obstructions pulmonaires. Elle regroupe les hypertensions pulmonaires thromboemboliques chroniques et les autres types d'obstruction des artères pulmonaires.

Enfin, le cinquième groupe comprend toutes les hypertensions pulmonaires avec des mécanismes peu connus ou multifactoriels. Cela peut concerner les désordres hématologiques, systémiques et métaboliques, les insuffisances rénales chroniques, les microangiopathies thrombotiques tumorales pulmonaires ou encore les médiastinites fibrosantes.

Groupe 1	<p><b>Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP)</b></p> <p><i>HTAP idiopathique, héréditaire, induites par des drogues et toxines, associées à une pathologie des tissus conjonctifs, une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), une hypertension portale, une pathologie cardiaque congénitale ou à une schistosomiase, les formes avec implication des veines et capillaires et syndrome d'hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né</i></p>
Groupe 2	<p><b>Hypertension Pulmonaire associée à une cardiopathie gauche</b></p> <p><i>HTP due à une insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection ventriculaire gauche préservée ou réduite, associée avec une maladie valvulaire cardiaque ou à des conditions cardiovasculaires congénitales ou acquises menant à une hypertension post-capillaire</i></p>
Groupe 3	<p><b>Hypertension Pulmonaire associée à une pathologie pulmonaire et/ou à l'hypoxie</b></p> <p><i>HTP associée aux pathologies pulmonaires obstructives ou emphysèmes, aux pathologies pulmonaires restrictives ou d'autres pathologies combinant les deux, à des syndromes d'hypoventilation, ainsi qu'à l'hypoxie sans pathologie pulmonaire ou à des désordres pulmonaires développementaux</i></p>
Groupe 4	<p><b>Hypertension Pulmonaire liée des obstructions des artères pulmonaires</b></p> <p><i>HTP thromboemboliques chroniques et autres types d'obstruction des artères pulmonaires</i></p>
Groupe 5	<p><b>Hypertension Pulmonaire associée à des mécanismes non définis et/ou multifactoriels</b></p> <p><i>Désordres hématologiques, systémiques et métaboliques, insuffisances rénales chroniques, microangiopathies thrombotiques tumorales pulmonaires, médiastinites fibrosantes.</i></p>

**Tableau 2 : Classification des groupes d'hypertension pulmonaire (HTP).**

Classification mise à jour après le 6<sup>ème</sup> symposium sur l'HTP, tableau adapté de Humbert et al. 2022 [5].

## 2.3. Physiopathologie

### 2.3.1. Vasoconstriction

L'une des caractéristiques principales de l'HTP est une vasoconstriction exacerbée maintenue des artères intrapulmonaires. Cette augmentation de la contraction des CMLAP due à une augmentation des signaux calciques dans ces cellules peut être amplifiée par différents phénomènes. Parmi ceux-ci, le tonus myogénique qui est la réponse adaptative des artères pré-capillaires (de petit diamètre) qui se contractent en réponse à une augmentation de la pression intraluminale. Cette vasoconstriction entraîne une hausse des résistances vasculaires pulmonaires limitant ainsi l'augmentation de la pression sanguine locale en aval. De plus, la balance entre les facteurs vasoconstricteurs (sérotonine (5-HT), endothéline-1 (ET-1), phényléphrine, etc.) et vasodilatateurs (oxyde nitrique (NO), prostacycline, etc.) est altérée au cours de la pathologie agissant en faveur de la contraction des CMLAP.

Les artères de sujets souffrant d'une HTP présentent également une hyperréactivité aux agonistes vasoconstricteurs dont la 5-HT qui favorise l'entrée de calcium dans les CMLAP [7].

### 2.3.2. Remodelage

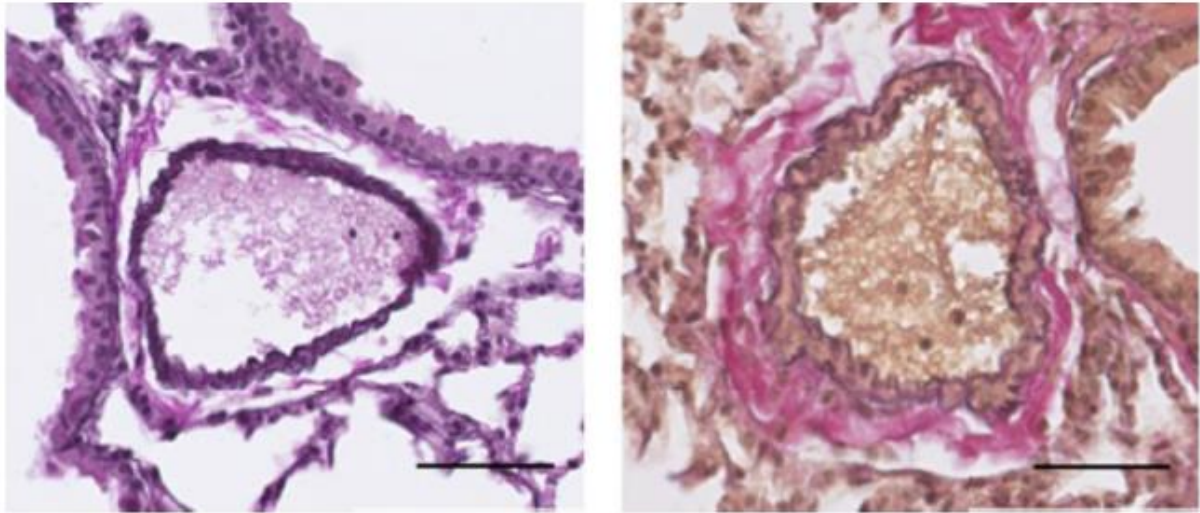
Le maintien de cette vasoconstriction va entraîner, à terme, un remodelage des artères pulmonaires [Figure 3] qui concerne les trois tuniques présentées précédemment [Figure 2], et ce, d'autant plus que les artères sont de petit diamètre.

Au niveau de l'intima, les cellules endothéliales ont une production altérée de facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. On parle alors de dysfonction endothéliale. La production de facteurs vasoconstricteurs est favorisée par rapport à celle de vasodilatateurs agissant donc sur la contraction des CMLAP. Il y a également une formation de néo-intima qui est une couche de myofibroblastes et de matrice extracellulaire, ainsi qu'une prolifération accrue de CE induisant une diminution du diamètre de la lumière artérielle et participant à l'augmentation des résistances à l'écoulement. Ces phénomènes peuvent aboutir à l'apparition de lésions plexiformes. Ce sont des lésions complexes et désorganisées associées à une prolifération de cellules endothéliales, de myofibroblastes et de cellules musculaires lisses ainsi qu'à une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire. Ces lésions sont présentes lors de l'HTP humaine mais pas dans tous les modèles animaux. Seuls les modèles d'hypoxie sévère (combinaison d'hypoxie chronique avec injection de monocrotaline [8]) et de rat SUGEN (inhibition du récepteur 2 du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) avec le SU 5416) [9] permettent de les observer chez l'animal.

Dans la media, les CML prolifèrent et migrent entraînant une augmentation de l'épaisseur de la media et une muscularisation des artères non muscularisées (artéioles). Cette prolifération accrue est concentrique, participant à l'augmentation de l'épaisseur de la media et donc à la diminution du diamètre de la lumière. Les CMLAP subissent 2 phénomènes qui sont l'hyperplasie (prolifération cellulaire) et l'hypertrophie (volume cellulaire). La prolifération peut être induite par différents mécanismes et facteurs dont les facteurs de croissance circulants (PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes, *Platelet Derived Growth Factor*), EGF (facteur de croissance de l'endothélium, *Endothelium Growth Factor*)) qui sont plus présents chez les patients souffrant d'HTP, ou bien encore l'augmentation du taux de 5-HT libre circulant.

En ce qui concerne l'adventice, elle est également remodelée et subit un épaississement. Cette tunique étant très hétérogène et constituée de nombreux types cellulaires, son remodelage est d'autant plus complexe. Les fibroblastes, qui la composent majoritairement, prolifèrent et se

différencient en myofibroblastes. Ils sont capables de migrer vers les autres tuniques favorisant le remodelage de celles-ci. Leur production de protéines de la matrice extracellulaire est excessive et la synthèse de chimiokines et cytokines inflammatoires, ainsi que de facteurs de croissance est également augmentée.



**Figure 3 : Coupe d'artères intrapulmonaires de souris contrôles (à gauche) et hypoxiques chroniques (à droite).**

*Coloration Elastica van Gieson, barre d'échelle = 50  $\mu$ m. Figure issue de Cussac et al. 2019 [10].*

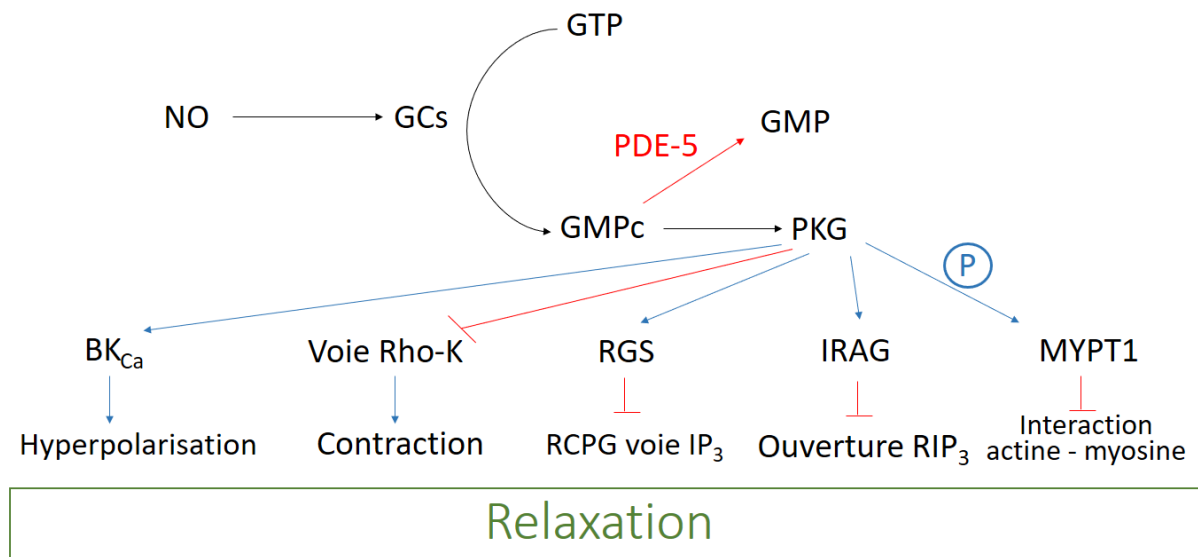
## 2.4. Voies de traitement

Il n'y a pas de traitement curatif pour cette pathologie mais des traitements visant à améliorer l'espérance de vie et la qualité de vie des patients existent. Ceux-ci exploitent 3 voies vasodilatatrices importantes [11].

### 2.4.1. La voie du NO

Le NO libéré par les cellules endothéliales active les guanylates cyclases solubles (GCs) des CML favorisant la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). L'activité de la protéine kinase G (PKG) est ainsi stimulée permettant l'ouverture de canaux potassiques  $BK_{Ca}$  [12, 13] qui, par la sortie de  $K^+$  de la cellule, induit une hyperpolarisation. La PKG induit également la phosphorylation de RhoA inhibant l'activation de ROCK et la contraction associée [14]. La libération de  $Ca^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique (RS) est également limitée via les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS, *regulator of G-protein signaling*) et le substrat de la kinase GMPc associée au récepteur à l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) (IRAG, *IP3R-associated cGMP kinase substrate*) qui inhibent les voies de l' $IP_3$ . Enfin, la PKG active la sous-unité cible 1 de la myosine phosphatase (MYPT1, *myosin phosphatase target subunit 1*) qui réduit les interactions entre les filaments d'actine et de myosine. Tous ces mécanismes aboutissent à la relaxation des CML et donc favorisent la vasodilatation [Figure 4].

Les traitements contre l'HTP ciblant cette voie visent alors à la favoriser. L'une des solutions étant de limiter la dégradation de GMPc en GMP induite par la phosphodiesterase-5 (PDE-5). Pour cela des inhibiteurs de PDE-5 sont utilisés permettant la relaxation des CML via l'activité des GMPc, parmi eux le sildénafil, le tadalafil et le vardénafil sont utilisés. Le riociguat qui est un stimulateur de GCs est également utilisé [15].



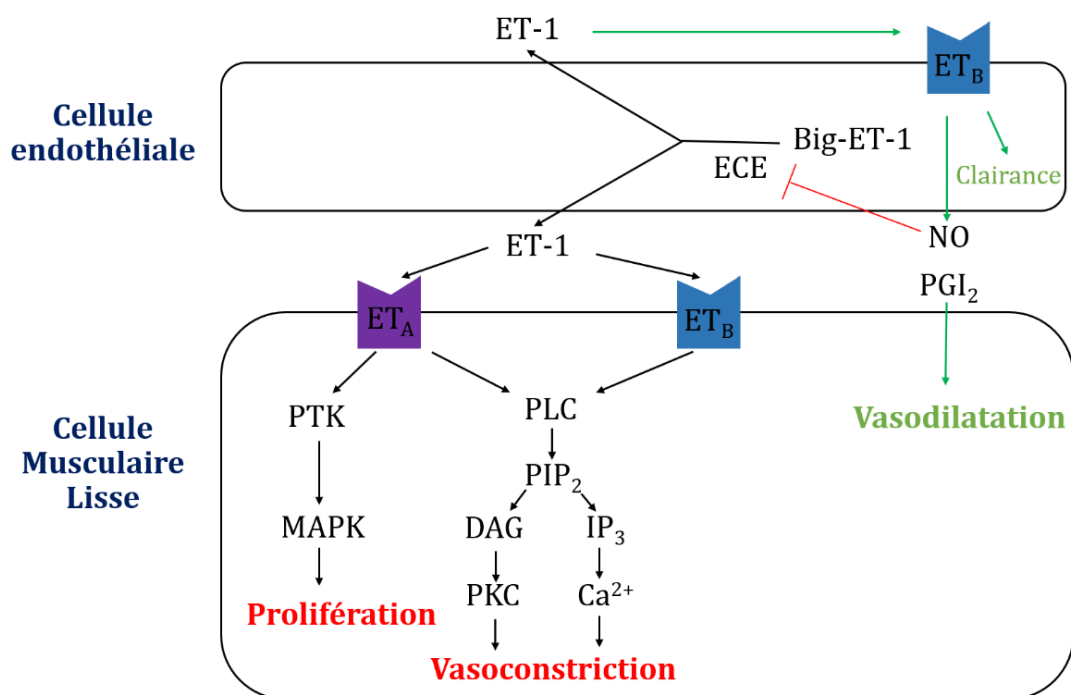
**Figure 4 : Schéma de la voie du NO.**

Abréviations : GCs (Guanylate Cyclase soluble), GMPc (Guanosine Mono Phosphate cyclique), GTP (Guanosine TriPhosphate), IRAG ( $IP_3R$ -associated cGMP kinase substrate), MYPT1 (Myosin Phosphatase Target subunit 1), NO (Oxyde Nitrique), P (Phosphorylation), PDE-5 (PhosphoDiEstérase-5), PKG (Protéine Kinase G), RGS (Regulator of G-protein Signaling), Rho-K (Rho-Kinase),  $RIP_3$  (Récepteur Inositol TriPhosphate).

### 2.4.2. La voie endothéline

L'ET-1 sous sa forme mature est produite à partir du clivage de la Big-ET-1 par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE). Elle peut ensuite se lier à deux types de récepteurs, le récepteur ET<sub>A</sub> et le récepteur ET<sub>B</sub>. Les CML expriment ces deux types de récepteur qui, une fois activés, déclenchent les voies de signalisation des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) menant à la prolifération des cellules ainsi que celle de la phospholipase C (PLC) favorisant la contraction des vaisseaux. L'endothéline induit donc une augmentation des résistances vasculaires. En outre, des récepteurs ET<sub>B</sub> sont exprimés par les CE. Leur activation conduit à la production de NO et de prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) dont les voies de signalisation favorisent une vasodilatation. Le NO joue aussi un rôle sur la production d'ET-1 en inhibant l'ECE qui permet sa maturation. Enfin, les récepteurs ET<sub>B</sub> sont également impliqués dans un phénomène de clairance où le complexe ET-1 / ET<sub>B</sub> est internalisé et dégradé [Figure 5].

Les traitements existants visent donc à inhiber cette voie de l'ET-1 menant à la vasoconstriction et à la prolifération des CML. Des inhibiteurs des récepteurs à l'endothéline sont utilisés dont le bosentan (Tracleer) et le macitentan (Opsumit) qui sont des antagonistes des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, ainsi que l'ambrisentan (Letairis) qui est sélectif des récepteurs ET<sub>A</sub> [16].



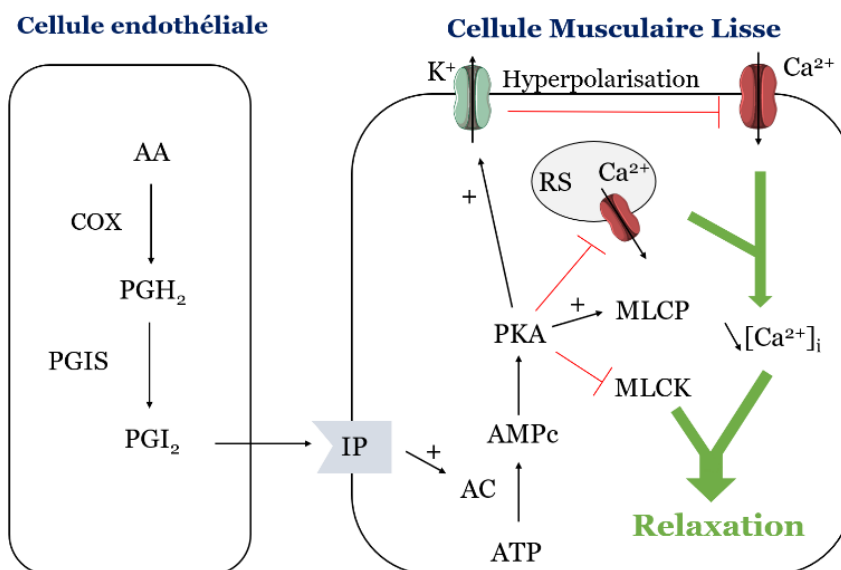
**Figure 5 : Schéma de la voie de l'endothéline.**

*Abréviations : DAG (DiAcylGlycérol), ECE (Enzyme de Conversion de l'Endothéline), ET-1 (Endothéline-1), ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> (Récepteurs à l'endothéline de type A et B), IP<sub>3</sub> (Inositol TriPhosphate), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), NO (Oxyde Nitrique), PGI<sub>2</sub> (Prostaglandine I<sub>2</sub>), PIP<sub>2</sub> (Phosphatidyl Inositol BiPhosphate), PKC (Protéine Kinase C), PLC (Phospholipase C), PTK (Protéine Tyrosine Kinase).*

### 2.4.3. La voie prostacycline

La prostacycline produite par les CE est reconnue par le récepteur de la prostacycline (IP) exprimé à la membrane des CML. La liaison de la PGI<sub>2</sub> à son récepteur active l'adénylate cyclase (AC) qui convertit l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans les CML. L'activité de la protéine kinase A (PKA) est alors favorisée menant à l'ouverture de canaux potassiques. La sortie de K<sup>+</sup> entraîne une hyperpolarisation qui empêche l'ouverture de canaux dépendants du potentiel dont des canaux calciques. L'entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire est ainsi inhibée. La libération de Ca<sup>2+</sup> par le RS est aussi inhibée par la PKA. Enfin la PKA agit sur la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP) qu'elle active et sur la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) dont la phosphorylation diminue son affinité avec la calmoduline (CaM). L'inhibition de l'activité de la MLCK couplée à une augmentation de l'activité de la MLCP entraîne une diminution de l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine nécessaire à la contraction. La PGI<sub>2</sub> induit donc une relaxation des CML [Figure 6].

Pour le traitement de l'HTP, des analogues de la PGI<sub>2</sub> sont alors utilisés. L'époprosténol (Flolan et Veletri) est un analogue synthétique de courte demi-vie (d'où son utilisation par voie intraveineuse). D'autres analogues plus stables existent dont le beraprost, l'iloprost (utilisé par inhalation), et le treprostinil (utilisé sous différentes formes par voie sous-cutanée, par inhalation ou par voie orale). Cependant, certains analogues (beraprost, iloprost) se lient également au récepteur EP3 qui peut empêcher la vasodilatation induite par la voie du récepteur IP. Enfin, des traitements utilisent des agonistes sélectifs du récepteur IP comme par exemple le selexipag qui est chimiquement différent de la PGI<sub>2</sub> et des prostanoïdes synthétiques et dont l'affinité est bien sélective du récepteur IP [17].



**Figure 6 : Schéma de la voie des prostacyclines.**

Abréviations : AA (Acide Arachidonique), AC (Adénylate Cyclase), AMPc (Adénosine Mono Phosphate cyclique), ATP (Adénosine TriPhosphate), COX (CycloOxygénase), IP (Récepteur de la prostacycline), MLCK (Myosin Light Chain Kinase), MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase), PGH<sub>2</sub> (Prostaglandine H<sub>2</sub>), PGIS (Prostaglandine I<sub>2</sub> Synthase), PGI<sub>2</sub> (Prostaglandine I<sub>2</sub> ou Prostacycline), PKA (Protéine Kinase A), RS (Réticulum Sarcoplasmique).

#### 2.4.4. Autres

D'autres traitements existent comme les inhibiteurs de canaux calciques de type L qui permettent de limiter la vasoconstriction mais qui n'ont pas d'effet sur le remodelage vasculaire. Parmi eux le diltiazem, la nifédipine et l'amlodipine sont utilisés.

Dans le cas où les traitements sont inefficaces, la seule solution reste la chirurgie avec une transplantation bipulmonaire ou du bloc cœur – poumons.

### 2.5. Modèles d'étude

Différents modèles permettent l'étude de l'HTP. Les aspects importants impliqués dans l'HTP hypoxique de groupe 3 sont l'**hypoxie** et l'**étirement**, dont les techniques d'étude seront décrites plus en détail dans les parties « Hypoxie » et « Étude des effets de stress mécaniques », respectivement.

Au niveau cellulaire, il est possible de cultiver des cellules en conditions d'hypoxie grâce à un incubateur tri-gaz. Classiquement, on parle d'hypoxie chronique pour 48 h d'incubation à 1 % d'O<sub>2</sub> [18]. Les cellules peuvent également être soumises à l'étirement grâce à un appareil STREX, à 10 % d'étirement correspondant à un étirement physiologique, et à 20 % d'étirement correspondant à un étirement pathologique [19].

Les effets de l'hypoxie et de l'étirement peuvent être étudiés séparément afin de voir l'effet de chaque facteur sur l'expression et l'activité de canaux mécanosensibles mais également en association pour voir les effets combinés sur les cellules et s'approcher au mieux des conditions pathologiques.

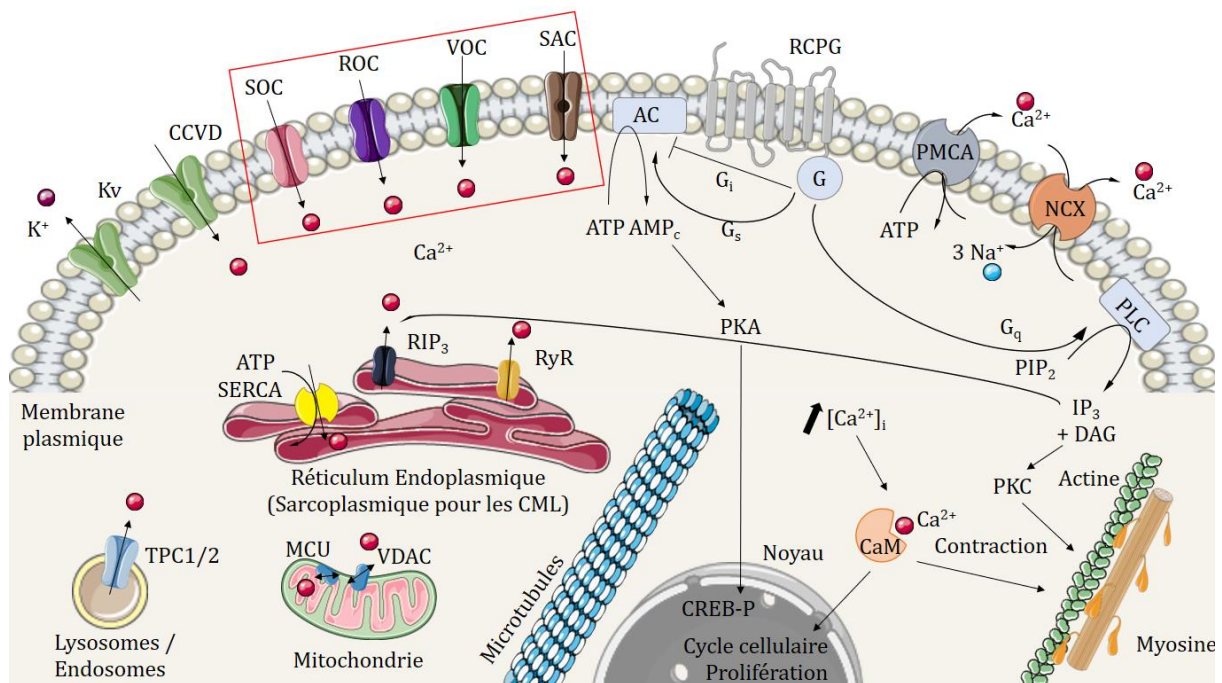
Il existe également des modèles animaux. En effet, des rats et souris placés dans un caisson hypobare pendant 3 semaines en hypoxie chronique (mimant un effet d'altitude) vont développer l'HTP de groupe 3 [20]. Les animaux présentent un rapport de Fulton (traduisant d'une hypertrophie cardiaque droite) et une PAPm plus élevés ainsi qu'un remodelage des artères intrapulmonaires, principalement les artères de plus petit ordre. Des modèles plus sévères existent, avec l'injection de monocrotaline combinée ou non à l'hypoxie chronique [8], ou encore des rats SUGEN [9].



### 3. Homéostasie calcique

Le maintien de l'homéostasie calcique est essentiel dans les cellules. En effet, le calcium est un messager intracellulaire qui joue un rôle important dans de nombreuses voies de signalisation [Figure 7]. Il est notamment impliqué dans les phénomènes de contraction, prolifération et migration cellulaires.

La **concentration calcique intracellulaire**  $[Ca^{2+}]_i$  est donc très régulée. Elle est d'environ 100 à 200 nM au repos dans le cytoplasme qui est une concentration très faible en comparaison avec la concentration calcique extracellulaire de l'ordre de 1 à 2 mM. Lors de la réponse à un stimulus, la  $[Ca^{2+}]_i$  augmente de façon transitoire afin de déclencher les réponses physiologiques adaptées. Cette élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  peut atteindre l'ordre du  $\mu M$  et peut provenir des stocks intracellulaires ou bien de l'extérieur de la cellule via l'activation de canaux perméables au  $Ca^{2+}$  [21].



**Figure 7 : Schéma des stocks et voies  $Ca^{2+}$  dans une cellule.**

*Abréviations : AC = adénylate cyclase, AMPc = adénosine monophosphate cyclique, ATP = adénosine triphosphate, CaM = calmoduline, CCVD = canaux calciques voltage dépendants, CML = cellules musculaires lisses, CREB = cAMP Response Element-binding protein, DAG = Diacylglycérol, IP<sub>3</sub> = Inositol triphosphate, Kv = canaux potassiques voltage dépendants, MCU = Mitochondrial Calcium Uniport, NCX = échangeur sodium-calcium, PIP<sub>2</sub> = Phosphatidyl Inositol BiPhosphate, PKA = protéine kinase A, PKC = protéine kinase C, PLC = Phospholipase C, PMCA = plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase, RCPG = récepteurs couplés aux protéines G, RIP<sub>3</sub> = récepteur Inositol triphosphate, ROC = receptor-operated channels, RyR = récepteur à la ryanodine, SAC = stretch-activated channels, SOC = store-operated channels, SERCA = sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase, TPC1/2 = Two Pore Channel, VDAC = Voltage-Dependant Anion Channel, VOC = voltage-operated channels.*

### 3.1. Sources calciques intracellulaires

Les principales sources de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule sont le réticulum endoplasmique (RE), appelé réticulum sarcoplasmique (RS) dans les cellules musculaires lisses, les mitochondries et les lysosomes. Les libération et recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  par ces organites sont assurées par des récepteurs canaux et pompes exprimés à leur surface. Le RS des CMLAP possède notamment des récepteurs à la ryanodine (RyR 1 à 3), ainsi que des récepteurs à l' $\text{IP}_3$  (RIP<sub>3</sub> 1 à 3) permettant la libération du calcium réticulaire. Enfin, ce calcium est recapté par le réticulum grâce aux pompes SERCA (*sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase* 1 à 3). Les mitochondries régulent les entrées et sorties de  $\text{Ca}^{2+}$  via le VDAC (*Voltage-Dependant Anion Channel*) et le MCU (*Mitochondrial Calcium Uniport*). Enfin, les lysosomes peuvent libérer du  $\text{Ca}^{2+}$  grâce à leurs canaux *Two Pore Channel* (TPC 1 et 2) activés par le NAADP (*Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*).

### 3.2. Sources calciques extracellulaires

Le calcium peut également provenir de l'extérieur de la cellule via l'activation de canaux ioniques ou transporteurs laissant transiter les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . La membrane plasmique exprime une pompe calcium - ATPase (PMCA) qui permet la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme vers le milieu extracellulaire contre son gradient électrochimique en utilisant une molécule d'ATP. Le  $\text{Ca}^{2+}$  peut également être échangé contre du sodium ( $\text{Na}^+$ ) via l'échangeur sodium/calcium à raison d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  pour trois ions  $\text{Na}^+$  selon le gradient électrochimique du  $\text{Na}^+$ . Enfin, la membrane plasmique exprime de nombreux canaux calciques.

#### 3.2.1. Les canaux dépendants du voltage (VOC)

Ces canaux sont sensibles aux variations de potentiel membranaire et sont activés par une dépolarisation ou hyperpolarisation membranaires. Les canaux dépendants du voltage sélectifs du  $\text{Ca}^{2+}$  sont appelés Canaux Calciques Voltage-Dépendants (CCVD) et permettent l'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol à partir du milieu extracellulaire. Les CCVD sont classés en 5 sous-familles dont les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L et de type T exprimés au niveau cardiovasculaire. Les canaux de types L ( $\text{Ca}_v1.1$  à  $\text{Ca}_v1.4$ ) sont activés par une forte dépolarisation avec une cinétique d'activation lente. Les canaux de type T ( $\text{Ca}_v3.1$  à  $\text{Ca}_v3.3$ ) sont activés par une dépolarisation plus faible et une cinétique d'activation plus rapide, transitoire.

#### 3.2.2. Les canaux ROC (*Receptor-Operated Channels*)

Ces canaux sont activés par une interaction agoniste – récepteur, indépendamment d'une variation de potentiel membranaire, et induisent généralement une voie de signalisation protéique. Les CML peuvent être activées par différents agonistes tels que l'ACh (acétylcholine), l'AngII (angiotensine II), l'ET-1, la 5-HT, la norépinéphrine ou la vasopressine. Des courants ROC peuvent également être activés par différentes voies de signalisation comme le  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , la voie tyrosine kinase ou encore la voie PLC ou PKC [22].

#### 3.2.3. Les canaux SOC (*Store-Operated Channels*)

Les canaux SOC sont activés par la vidange des stocks intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  (notamment du RS). L'entrée du calcium par ces canaux est appelée « entrée capacitive de calcium » (CCE ou *store-operated calcium entry (SOCE)*). Ces courants peuvent être observés via l'utilisation d'inhibiteurs des pompes calcium – ATPase du RS (SERCA) (thapsigargine ou acide cyclopiazonique) ou bien en vidant les stocks intracellulaires (caféine). STIM1 (*Stromal*

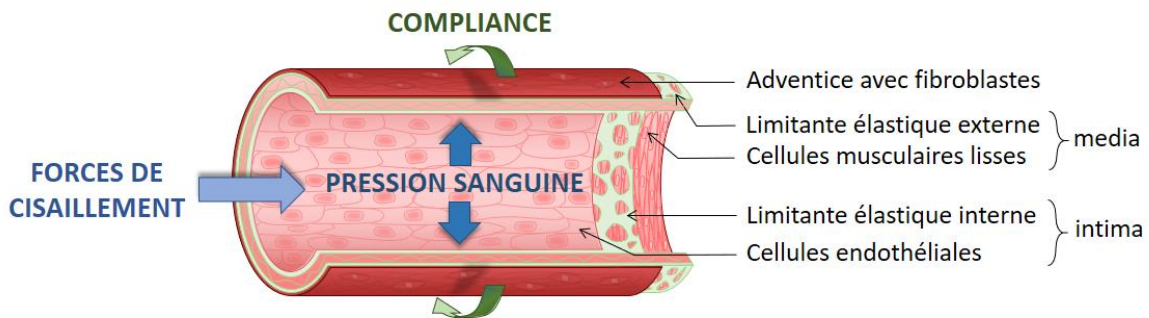
*Interaction Molecule 1*) est le senseur calcique du RS qui interagit avec Orai1 exprimé à la membrane plasmique et permettant l'entrée capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 3.2.4. Les canaux SAC (*Stretch-Activated Channels*)

Certains canaux sont, quant à eux, activés par des contraintes ou stress mécaniques, ce sont les canaux mécanosensibles. Ces canaux sont généralement perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  et peuvent laisser transiter d'autres ions. L'activation des SAC dans les CML permet notamment d'induire une dépolarisation de la membrane (via l'entrée de  $\text{Na}^+$ ) qui va à son tour activer les VOC pour déclencher une réponse calcique. Mais ils peuvent aussi induire une augmentation locale de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  directement due à un influx d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  à travers ces canaux. Cette augmentation conduit à l'ouverture de canaux membranaires dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  et  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) ou à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  des stocks intracellulaires. En effet, les  $\text{RIP}_3$  et RyR sont sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  et permettent la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum induisant une augmentation rapide de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Ce mécanisme est connu sous le nom de CICR (pour *Calcium-Induced Calcium Release*) et permet la contraction des CML. L'organisation subcellulaire de ces récepteurs pour le couplage avec les SAC joue d'ailleurs un rôle important dans la signalisation calcique pouvant mener à des réponses cellulaires physiopathologiques [23].

## 4. Canaux mécanosensibles (SAC)

En conditions physiologiques, les CMLAP sont soumises à des contraintes mécaniques qui sont accrues lors de l'HTP via l'augmentation de la pression sanguine, des forces de cisaillement et des tensions pariétales [Figure 8]. Ces contraintes mécaniques peuvent activer de nombreux canaux dits mécanosensibles impliqués dans des voies de signalisation intracellulaire comme la contraction, la prolifération ou la migration.

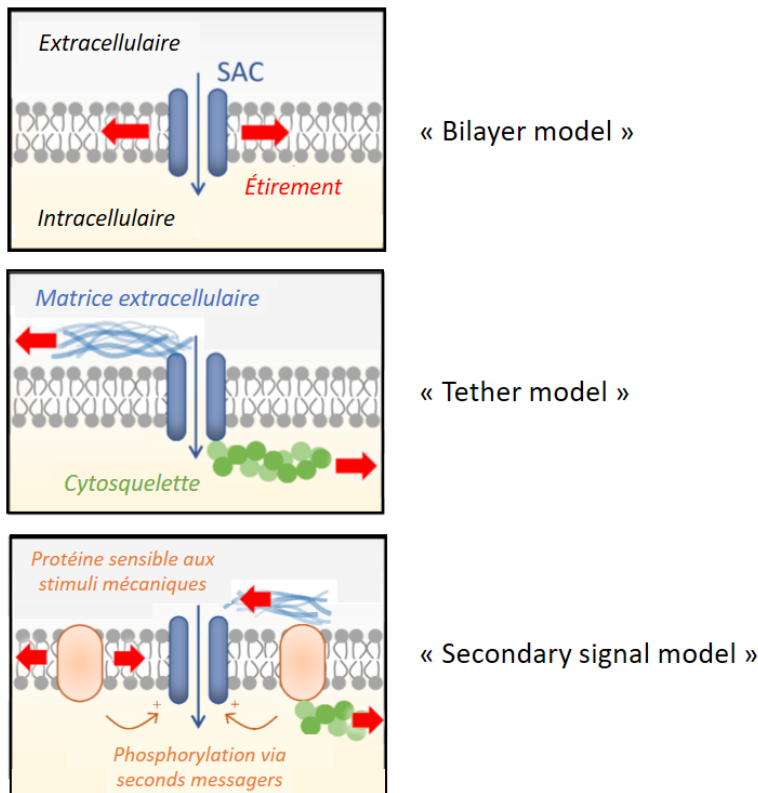


**Figure 8 : Contraintes mécaniques au niveau des artères.**

Schéma adapté de Barbeau et al. 2021 [25].

Les **canaux mécanosensibles** ou *stretch-activated channels* (SAC) sont des canaux ioniques qui sont capables de convertir un stimulus mécanique en signal biologique. Les SAC et leur importance dans la circulation pulmonaire ont fait l'objet d'une revue dont je suis 1<sup>er</sup> auteur intitulée « *Mechanosensitivity in Pulmonary Circulation: Pathophysiological Relevance of Stretch-Activated Channels in Pulmonary Hypertension* » parue dans *Biomolecules* en 2021 et d'une mini-revue de vulgarisation « *Implication des canaux mécanosensibles Piezo1 et TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire* » publiée dans la *Revue des Maladies Respiratoires* en 2022, dont je suis également 1<sup>er</sup> auteur. Différents critères permettent de définir un SAC. Tout d'abord, le canal doit être exprimé dans des cellules mécanosensibles. Ensuite, la perte de l'expression du canal doit induire une perte de la mécanosensibilité. Enfin, l'expression hétérologue du canal dans un autre système (cellule naïve) doit conduire à l'acquisition d'une réponse aux stimuli mécaniques. De plus, les propriétés pharmacologiques et biophysiques du canal doivent correspondre au courant endogène étudié et des modulateurs de la mécanosensibilité doivent induire une modification de l'activité du canal.

Différents modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes d'activation des SAC [Figure 9]. Le premier, appelé le modèle « bicouche » ou « *bilayer model* », suggère une activation directe des canaux par les tensions dans la membrane plasmique. En effet, les SAC exprimés dans des liposomes reconstitués sont capables d'être activés par des stimuli mécaniques. Un autre modèle le « *tether model* » suggère l'implication des protéines du cytosquelette et/ou de la matrice extracellulaire dans l'activation des SAC. En effet, une déstabilisation de la structure du cytosquelette entraîne une modification de l'activité des SAC, cet effet pouvant être direct ou indirect. Enfin, les SAC peuvent être activés indirectement via d'autres protéines sensibles à une modification physique de la membrane et la production de seconds messagers, c'est le « *secondary signal model* » [24, 25].



**Figure 9 : Schémas des différents modèles d'activation des SAC.**

« Bilayer model » : l'activation des SAC se fait directement par une différence de tension au sein de la membrane.

« Tether model » : les forces mécaniques passent par des protéines de la matrice extracellulaire et/ou du cytosquelette.

« Secondary signal model » : l'activation des SAC se fait indirectement via l'activation de protéines mécanosensibles générant des messagers secondaires.

Schéma adapté de Barbeau et al. 2021 [25].

Les SAC permettent la détection de modifications physiques au niveau de la membrane plasmique et ont donc un rôle primordial dans de nombreux systèmes. Ils sont impliqués dans les mécanismes de toucher, de sensation ou de douleur et certains participent même au fonctionnement de l'ouïe / oreille interne, de la vision et du goût [26]. Les SAC sont très importants dans les phénomènes de migration, et prolifération des cellules, ainsi que dans la détection des forces d'étirement et de compression pouvant jouer un rôle au niveau physiologique, mais aussi lors de cancers. Certains SAC sont sensibles à l'osmolarité via les modifications de la tension membranaire dues à un gonflement ou une plasmolyse des cellules, et jouent un rôle important dans le maintien de cette osmolarité, notamment au niveau du système rénal. Les forces de cisaillement, l'étirement, et les tensions pariétales sont des contraintes mécaniques pouvant activer les SAC notamment au niveau de la circulation sanguine et des vaisseaux participant au tonus vasculaire aux niveaux physiologique et pathologique [27].

Il existe différentes familles de SAC dont les canaux cationiques non sélectifs qui comprennent la large superfamille des TRP (*Transient Receptor Potential*) et les canaux Piezo (Piezo1 et Piezo2). Mais de nombreux autres canaux sont également mécanosensibles dont ceux de la superfamille des canaux sodiques épithéliaux / dégénérine (ENaC/DEG) sensibles à l'acidité (*acid-sensing ion channels (ASICs)*) qui sont perméables au Na<sup>+</sup> mais peuvent aussi laisser passer du Ca<sup>2+</sup> [28]. Des canaux sélectifs pour le K<sup>+</sup> peuvent aussi être modulés par un étirement comme les BK<sub>Ca</sub> qui sont également des canaux voltage dépendants de large-conductance activés par le Ca<sup>2+</sup> [29], les K2P (*two-pore domain K<sup>+</sup> channels*) dont TREK-1, TREK-2 et TRAAK et les K-ATP (canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'ATP) [25]. Enfin, des canaux sélectifs pour le Cl<sup>-</sup> sont également mécanosensibles dont la famille des TMEM16/ANO (*transmembrane protein 16 / anoctamin*) où TMEM16A/ANO1 a notamment été décrit comme un canal Cl<sup>-</sup> activé par le Ca<sup>2+</sup> et jouant un rôle important dans le tonus vasculaire [30, 31].

Au niveau de la circulation pulmonaire, les artères pulmonaires sont soumises en permanence aux contraintes mécaniques dues au flux sanguin. Les cellules des différentes tuniques de ces vaisseaux expriment des SAC permettant la régulation du tonus myogénique. En effet, les forces de cisaillement activent les SAC exprimés au niveau des CE induisant une vasodilatation, tandis que la pression sanguine intraluminale active les SAC des CML conduisant à une vasoconstriction. Les SAC sont donc nécessaires au maintien de la balance entre vasodilatation et vasoconstriction dans les artères pulmonaires. Une modification de la signalisation calcique entraîne une dérégulation des réponses cellulaires pouvant mener à l'HTP.




#### **4.1. Revue « *Mechanosensitivity in Pulmonary Circulation: Pathophysiological Relevance of Stretch-Activated Channels in Pulmonary Hypertension* »**

La revue présentée ci-dessous et publiée dans *Biomolecules* en 2021, décrit l'importance des contraintes mécaniques dans la circulation pulmonaire, ainsi que les méthodes pour les étudier. Les SAC y sont également décrits avec leurs principales fonctions et dérégulations dans ces vaisseaux menant à l'HTP.



Review

# Mechanosensitivity in Pulmonary Circulation: Pathophysiological Relevance of Stretch-Activated Channels in Pulmonary Hypertension

Solène Barbeau <sup>1,2</sup>, Guillaume Gilbert <sup>3</sup>, Guillaume Cardouat <sup>1,2</sup>, Isabelle Baudrimont <sup>1,2</sup>,  
Véronique Freund-Michel <sup>1,2</sup>, Christelle Guibert <sup>1,2</sup> , Roger Marthan <sup>1,2</sup> , Pierre Vacher <sup>1,2</sup> ,  
Jean-François Quignard <sup>1,2</sup> and Thomas Ducret <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Univ. Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France; solene.barbeau@u-bordeaux.fr (S.B.); guillaume.cardouat@u-bordeaux.fr (G.C.); isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr (I.B.); veronique.michel@u-bordeaux.fr (V.F.-M.); christelle.guibert@u-bordeaux.fr (C.G.); roger.marthan@u-bordeaux.fr (R.M.); pierre.vacher@inserm.fr (P.V.); jean-francois.quignard@u-bordeaux.fr (J.-F.Q.)
- <sup>2</sup> INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France
- <sup>3</sup> ORPHY, UFR Sciences et Techniques, University of Brest, EA 4324, F-29238 Brest, France; guillaume.gilbert@univ-brest.fr
- \* Correspondence: thomas.ducret@u-bordeaux.fr



**Citation:** 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. <https://doi.org/10.3390/biom11091389>

Academic Editor: Fabrice Antigny

Received: 12 July 2021

Accepted: 19 September 2021

Published: 21 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



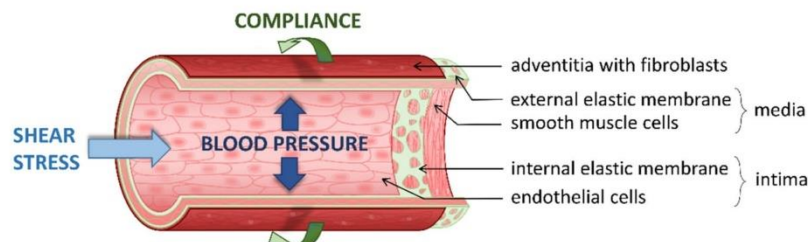
**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** A variety of cell types in pulmonary arteries (endothelial cells, fibroblasts, and smooth muscle cells) are continuously exposed to mechanical stimulations such as shear stress and pulsatile blood pressure, which are altered under conditions of pulmonary hypertension (PH). Most functions of such vascular cells (e.g., contraction, migration, proliferation, production of extracellular matrix proteins, etc.) depend on a key event, i.e., the increase in intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) which results from an influx of extracellular  $Ca^{2+}$  and/or a release of intracellular stored  $Ca^{2+}$ . Calcium entry from the extracellular space is a major step in the elevation of  $[Ca^{2+}]_i$ , involving a variety of plasmalemmal  $Ca^{2+}$  channels including the superfamily of stretch-activated channels (SAC). A common characteristic of SAC is that their gating depends on membrane stretch. In general, SAC are non-selective  $Ca^{2+}$ -permeable cation channels, including proteins of the TRP (Transient Receptor Potential) and Piezo channel superfamily. As membrane mechano-transducers, SAC convert physical forces into biological signals and hence into a cell response. Consequently, SAC play a major role in pulmonary arterial calcium homeostasis and, thus, appear as potential novel drug targets for a better management of PH.

**Keywords:** calcium; endothelial cell; fibroblast; mechanosensitive channel; pulmonary arterial smooth muscle cell; pulmonary artery; pulmonary hypertension; Piezo channel; TRP channel; vascular cell

## 1. Introduction

Pulmonary arteries (PA) are continually subjected to mechanical forces exerted by circulating blood on the three-layered vessel wall (i.e., intima, media, and adventitia) (Figure 1). Among these forces, shear stress and pulsatile blood pressure are the most notable (for review see [1]). Shear stress, the frictional force generated by blood flow, is parallel to the vessel wall and mainly acts on pulmonary arterial endothelial cells (PAEC) which are longitudinally aligned and form the inner tunica of the vessels. Conversely, blood pressure is a perpendicular force that causes a circumferential and a longitudinal stretch to the vessel wall, proportionally to the cardiac output resistance. Blood pressure acts both on pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) which align circumferentially and form the median layer, and, to a lesser extent, on PAEC.



**Figure 1.** Hemodynamic forces acting on the vessel wall. Section of an artery wall showing that the endothelial cells, forming the inner tunica, are longitudinally aligned, whereas smooth muscle cells, forming the median layer, are circumferentially aligned; the surrounding adventitia predominantly includes fibroblasts and matrix. Shear stress, frictional force generated by blood flow, is parallel to the vessel wall, whereas blood pressure is perpendicular to the vessel wall, causing circumferential and longitudinal stretching. Beside blood mechanical forces, composition of extracellular matrix, contributing to arterial stiffness, may itself modulate compliance and mechanotransduction in the vessel wall.

Shear stress and blood pressure have opposite effects: the former, acting on PAEC, induces a vasodilatation, whereas the latter, acting on PASM, exerts an intrinsic vasomotor mechanism termed “myogenic tone” [2]. However, these two phenomena are conveyed through an elevation of the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) that involves the superfamily of stretch-activated channels (SAC) and acts as an intermediate to physiological responses. Indeed, shear stress increases the  $[Ca^{2+}]_i$  in PAEC leading to a vasodilatation via, particularly, nitric oxide (NO) production that, in turn, influences adjacent PASM contraction. Intravascular pressure, acting on PASM, is also directly transduced by SAC, which can serve as direct route for  $Ca^{2+}$  entry and/or cause membrane depolarization which secondarily activates voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. The resulting  $[Ca^{2+}]_i$  increase subsequently activates PASM contraction through activation of calmodulin and myosin light chain kinase.

Beside blood mechanical forces, the composition of the extracellular matrix (ECM) also contributes to arterial stiffness and may, *per se*, modulate mechanotransduction in the vessel wall. Indeed, there is a complex crosstalk between ECM and vascular cells: PASM and pulmonary artery adventitial fibroblasts (PAAF) produce the ECM, which in turn interacts with cells through SAC and different receptors such as integrins, altering stiffness-dependent vascular cell activation [3].

Mechanical stretch affects all of the main cell types (i.e., PAEC, PASM, and PAAF) of the vessel wall and adapts the vessel tone to pressure in physiological circumstances. An alteration of mechanical stimuli is observed under pathological conditions, such as pulmonary hypertension (PH). Indeed, PH is a group of multifactorial pathological cardiovascular disorders characterized by a progressive elevation of pulmonary arterial pressure leading to right ventricular hypertrophy, heart failure and, ultimately, to premature death [4]. The recent haemodynamic definition of PH states that pre-capillary pulmonary hypertension due to pulmonary vascular disease is diagnosed when mean pulmonary arterial pressure of over 20 mmHg is associated with abnormal pulmonary vascular resistance of 3 or more Wood Units [5]. PH is divided into five groups according to clinical, hemodynamic, etiological characteristics, and treatment strategy: idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension (PAH) (group 1), PH due to left heart disease (group 2), PH due to lung diseases and/or hypoxia (group 3), PH associated to chronic thromboembolism (group 4), and finally PH forms with unclear or multifaceted origins (group 5) [4].

This is accompanied by an alteration of mechanical stresses to the vessel wall: an increased myogenic tone [6], a reduced flow rate [7] that is responsible for a lower shear stress [8], and a progressive PA stiffening [3]. In case of endothelium injury, occurring in



PH or PA catheterization, especially during the measurement of pulmonary arterial wedge pressure, PASMCM can also be directly exposed to flow shear stress or elevated transmural flow shear stress [9].

Although many mechanosensitive cellular components and extracellular structures have been shown to contribute to mechanotransduction [10], in PA wall in particular, the scope of this review is deliberately limited to SAC activation.

## 2. Stretch-Activated Channels

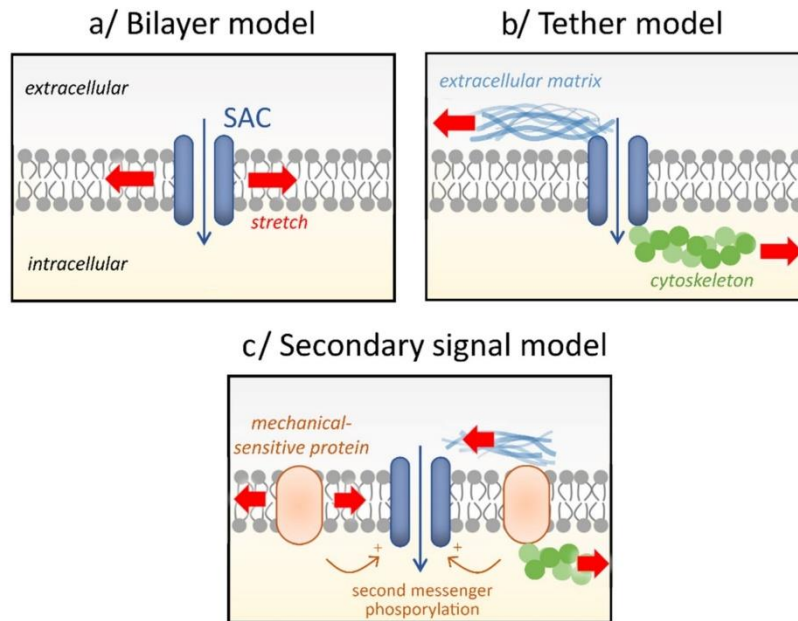
Plasma membrane SAC are referred to as mechanotransducers since they convert physical forces into biological signals and hence into an adaptive cell response. In the late 1970s, their existence was postulated by Corey and Hudspeth [11], before being electrophysiologically characterized, a few years later, in embryonic chick skeletal muscle by Guharay and Sachs [12]. Since their original characterization, SAC have been identified in a variety of tissues and species including mammalian vascular cells (for review see [13–15]) and pulmonary vascular cells in particular [9,16–27].

A common characteristic of SAC is that their open probability increases with the applied pressure, i.e., that their gating depends on membrane stretch. In pulmonary vascular cells,  $\text{Ca}^{2+}$  permeable non-selective cationic SAC share similar general electrophysiological properties: I-V relationship of the evoked currents is almost linear with a reversal potential around 0 mV and a unitary conductance around 30 pS [17–19,22,24]. Unlike voltage-gated channels, very few pharmacological inhibitors are available for SAC. The only specific one is GsMTx-4, a peptide toxin isolated from tarantula venom [28], which has shown inhibitory effect on SAC in PAEC [26] and PASMCM [19–22,24,25]. GsMTx-4 does not act on a standard “lock and key” model, but acts by its incorporation into boundary lipids surrounding the channel in a tension-dependent manner and thereby reducing the transfer of force from the lipid bilayer to the channel [28]. In the context of PH, most SAC inhibitors used in experimental studies are unselective blockers: amiloride and its analogs, aminoglycoside antibiotics such as streptomycin [19,21,26], disulfonic stilbene DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate) [17,22], and  $\text{Gd}^{3+}$  [17,19,21,25,26]. Their non-selectivity and potential side effects certainly explain the absence of clinical studies.

As reviewed in [1], three general models are proposed to account for the activation mechanisms of SAC: the “bilayer model”, the “tether model”, and the “secondary signal model” (Figure 2).

In the “bilayer model” (Figure 2a), the tension developed in the lipid bilayer itself is directly responsible for channel gating. Different mechanisms are also described for this model in which intrinsic mechanosensitivity of the channel depends on dimensional changes and/or hydrophobic mismatch (for review see [29]). This direct mechanical activation is supported by solubilization and liposome reconstitution experiments in which SAC activity was maintained, as well as the kinetic and the reversibility of the current elicited by stretch. In the “tether model” (Figure 2b), the force is transmitted to the channel via proteins located in the extracellular matrix or the cytoskeleton or both. Thus, as demonstrated by using agents that disrupt (such as cytochalasin and colchicine) or stabilize (such as phalloidin) cytoskeleton or extracellular matrix organization, SAC opening depends on the displacement of these proteins relative to the channel. In the “secondary signal model” (Figure 2c), a distant mechanical-sensitive protein (e.g., phospholipase A2 or phospholipase C (PLC)) can release a diffusible second messenger (such as arachidonic acid and diacylglycerol (DAG)) or activate a kinase (such as protein kinase C (PKC)), which, in turn can activate the channel. These different types of activation mechanisms could exist in pulmonary vascular cells. Indeed, in PAEC and PASMCM, a direct stretch activation of SAC (“bilayer” and “tether” models) is supported by the fact that the stretch-induced current is turned on and off without a noticeable delay [17,19,21,26]. Furthermore, SAC currents were recorded in inside-out patch-clamp configuration, excluding the possible involvement of secondary messengers, at the exception of enzyme-linked channels [17]. In contrast, some

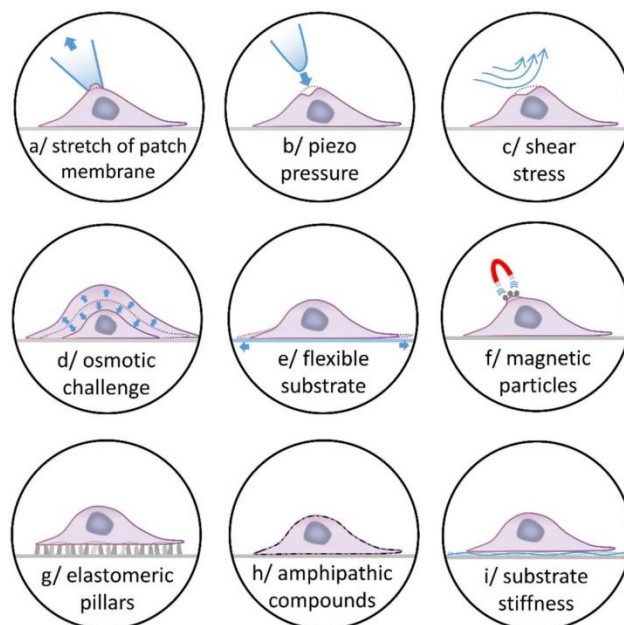
studies suggest an indirect mechanical activation (“secondary signal model”) in which stretch leads to activation of PKC (via stimulation of PLC and production of DAG), which, in turn, activates SAC [17,24]. Moreover, these two activation modes most likely trigger converging pathways since numerous SAC are polymodal channels (see sections below).



**Figure 2.** Activation mechanisms of SAC. Three general models are proposed: (a) In the “bilayer model”, the tension developed (red arrow) in the lipid bilayer itself is directly responsible for channel gating. (b) In the “tether model”, the force is transmitted to the channel via proteins located in the extracellular matrix, the cytoskeleton, or both. Tensions are conveyed by these accessory proteins to induce the channel opening. (c) In the “secondary signal model”, the channel activation depends on a distant mechanical-sensitive protein generating diffusible second messenger or channel phosphorylation.

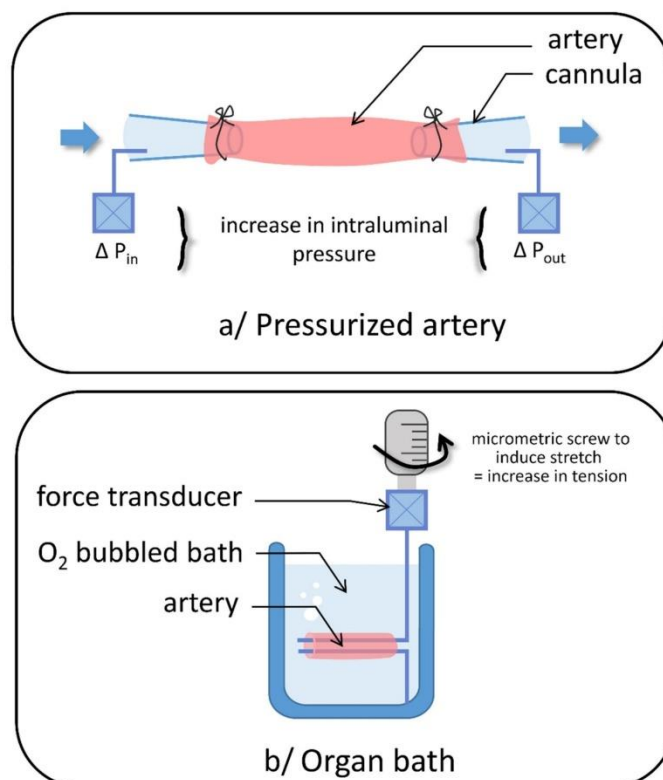
At the cellular and tissue levels, several strategies have been developed to investigate SAC. Among cell-based assays (Figure 3), the most commonly used method is based on membrane deformation including amphipathic compounds, elastomeric pillars, elongation of flexible cell substrates, magnetic particles, osmotic challenges, patch membrane stretch, piezo-driven pressure, and shear stress (for review see [30] or [31]). These techniques have been applied to pulmonary vascular cells *in vitro* [9,16–27,32]. An alternative method consists in culturing cells in matrices of different stiffness in order to evaluate the impact of the environment matrix on the cells. To this end, PAAF were cultured in different stiffness polyacrylamide gels corresponding to a normotensive pulmonary artery (0.5 kPa) or mimicking mild-severe PH (3–10 kPa) [33]. Furthermore, the effect of stretch can also be studied in whole vessels for a more integrative approach using arteriography or myography (Figure 4). In the former, a microvessel is cannulated at both ends with glass micropipettes and placed in a microvascular flow system chamber, allowing intraluminal pressure increase. In the latter, one end of the segment is anchored to a stationary support and the other end is connected to a force-displacement transducer to monitor the vessel contraction under resting tension corresponding to an adapted transmural pressure. These protocols are commonly used to investigate myogenic tone [6,19,23] or basal stretch [22] in small isolated intralobar PA. Mechano-dependent contraction of vessels can also be induced by hypo-osmotic shocks [25].





**Figure 3.** Experimental strategies to investigate SAC in cells. At the cellular level, several strategies can be used to activate SAC. The most commonly used are based on membrane deformation: (a) applying positive or negative pressure to the back end of the patch pipette, (b) poking of the cell membrane by a piezo-driven glass pipette, (c) modifying the perfusion flow or the viscosity of the solution, (d) using osmotic challenges: hypotonicity induces cell swelling, whilst hypertonicity evokes cell-shrinkage, (e) elongating thin elastic silicone membrane where cells are seeded, (f) applying magnetic field to specific ligands coated with magnetic particles on the cells, (g) seeding cells on elastomeric pillars to apply force to specific parts of the cells, and (h) using crenators and cup formers (amphipathic compounds) to induce crenation or cup shapes. (i) Another alternative consists in culturing cells in matrices of different stiffness, to evaluate the impact of the environment matrix and more especially its stiffness.

As the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  due to activation of  $Ca^{2+}$  channels plays a key role in fundamental cellular processes involved in the pathogenesis of PH such as contraction, migration, and proliferation, and thereby in vascular remodeling and hyperreactivity, PH is often referred to as a vascular channelopathy. Thus, in the pulmonary vasculature, which is continually subjected to mechanical forces, it is likely that facilitation of  $Ca^{2+}$  entry via SAC contributes to development and/or maintenance of the pathology. Indeed, in PH of group 3, hypoxia exposure could initiate, via the hypoxic pulmonary vasoconstriction phenomenon [34], vascular tone elevation and subsequent SAC activation, contributing to the early development of PH. In other PH groups, although not being the trigger, SAC activation following alteration of mechanical stresses to the vessel could contribute to the progression and/or maintenance of the pathology. Interestingly, SAC are more active in PASM from chronically hypoxic (CH) or monocrotaline (MCT) rats, two animal models of PH, than in those from healthy rats [19,20,25]. Moreover, in the pulmonary vasculature of normoxic rats, myogenic tone, sensitive to SAC blockers, is minimal as compared to that in the pulmonary vasculature of CH rats [6,19,23]. In addition, hypoxia exposure induces immediate upregulation of mechanosensitive TRPV4 channel in rat PA [23]. Thus, SAC appear to play a major role in PA pathophysiological signaling. There is a growing body of evidence implicating members of the Transient Receptor Potential (TRP), Piezo and other families of ion channels in this mechanotransduction, which will be described in the following sections.



**Figure 4.** Experimental strategies to investigate SAC in vessels. At the tissue level, the effects of stretch can also be studied in whole vessels using (a) arteriography: the microvessel is cannulated at both ends with glass micropipettes and placed in a microvascular flow system chamber, allowing intraluminal pressure increase via modulation of inlet and outlet pressures ( $P_{in}$  and  $P_{out}$ , respectively); or (b) myography: one end of the segment is anchored to a stationary support and the other end is connected to a force-displacement transducer to monitor the vessel contraction under resting tension corresponding to an adapted transmural pressure.

### 3. TRP Channels

TRP channels constitute a superfamily of non-selective cationic channels (Table 1) that exhibit a common structure composed of N- and C-terminal regions containing protein interaction motifs and six transmembrane domains (TM1-TM6). The putative ion conducting pore is located between the 5th and 6th TM domain. TRP channels are polymodal and, hence, can be modulated by a wide variety of stimuli such as cold, heat, pH, membrane potential, mechanical stress, neurohormonal signals,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ions, oxidative stress, intracellular ligands, as well as vasoactive factors such as angiotensin-II, arachidonic acid and its metabolites epoxyeicosatrienoic acids (EET), adenosine triphosphate (ATP), thrombin, endothelin-1 (ET-1), and serotonin (5-HT). According to their activation stimuli and the presence of regulatory domains on the cytosolic N- and C-termini, TRP superfamily is subdivided into seven main subfamilies: TRPC1-7 (Canonical), TRPV1-6 (Vanilloid), TRPM1-8 (Melastatin), TRPP1-4 (Polycystin), TRPML1-3 (Mucolipin), TRPA1 (Ankyrin), and TRPN (no mechanoreceptor potential C, NOMPC). Functional TRP are composed of four homo- or heteromultimeric subunits. These latter display conduction properties and regulatory mechanisms that are distinct from those of homomeric channels. TRP channels are expressed in a wide range of cell types and, as  $Ca^{2+}$  permeable channels, they are central actors in cellular  $Ca^{2+}$  homeostasis.

**Table 1.** Biophysical properties of TRP channels in pulmonary arterial vascular cells.

Channel	Cell Type (Species)	Conductance (pS)	Permeability	Activator	Inhibitor	PA Phenotype in KO Mice	References
TRPA1	-	9–16 53.1–62.8	-	osmolarity mustard oil	HC030031	not described in PA	[35]
TRPC1	human, mouse, and rat PA (PAEC and PASMC)	16	$P_{Ca}/P_{Na} < 10$	stretch store depletion	2-APB $Gd^{3+}/La^{3+}$	reduced hyperreactivity, remodeling, and vasomotor tone	[36–39]
TRPC3	rat PA human PASMC	66	$P_{Ca}/P_{Na} = 1.6$	stretch store depletion DAG and analogs	2-APB $Gd^{3+}/La^{3+}$	not described in PA	[36–39]
TRPC4	human, mouse, and rat PA (PAEC and PASMC)	17.5–41	$P_{Ca}/P_{Na} = 1.1–7$	store depletion, arachidonic acid calmidazolium	2-APB SKF96365 $Gd^{3+}/La^{3+}$ niflumic acid DIDS	reduced vascular permeability (and remodeling in KO rats)	[40–47]
TRPC5	human, mouse, and rat PA human PASMC	64	$P_{Ca}/P_{Na} = 9$	stretch hypotonicity roziglitazone	2-APB $La^{3+}$	not described in PA	[36,38,39,48–50]
TRPC6	human, mouse, and rat PA (PAEC and PASMC)	28–37	$P_{Ca}/P_{Na} = 4–5$	stretch hypotonicity store depletion DAG and analogs	2-APB SKF96365 $Cd^{2+}, La^{3+}, Gd^{3+}$	reduced hyperreactivity, remodeling and vasomotor tone	[36–39]
TRPM3	rat PA	65–133	$P_{Ca}/P_{Na} = 1.5–2$	hypotonicity	-	not described in PA	[51,52]
TRPM4	rat PA	24–25	$Na^{+}/K^{+} > Cs^{+} > Li^{+}$	stretch	-	not described in PA	[52–55]
TRPM7	rat PA human and rat PASMC	105 22–37	$Zn^{2+} \approx Ni^{2+} \gg Ba^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} \geq Mn^{2+} \geq Sr^{2+} \geq Cd^{2+} \geq Ca^{2+}$ $P_{Na}/P_{Ca} = 3$	stretch osmolarity	-	not viable → conditional deletion: reduced remodeling and vasomotor tone	[52,56–59]
TRPP1	-	135–175	-	PKD1 stretch	-	not described in PA	[36,60]

**Table 1.** Cont.

Channel	Cell Type (Species)	Conductance (pS)	Permeability	Activator	Inhibitor	PA Phenotype in KO Mice	References
TRPP2	-	177	$P_{Ca}/P_{Na} = 1–5$	shear stress hypotonicity triptolide	$Gd^{3+}/La^{3+}$	not described in PA (conditional in smooth muscle cells)	[36,37,61–63]
TRPV1	human and rat PA (PAEC and PASMC)	35–80 (unitary) 143–144 (whole cell)	$P_{Ca}/P_{Na} = 10$ (capsaicin-activated)	hypotonicity capsaicin 2-APB cannabidiol resiniferatoxin	capsazepine AMC9810 A784168 5'-Iodoresiniferatoxin	not described in PA	[36,52,64]
TRPV2	human and rat PASMC	-	$P_{Ca}/P_{Na} = 1–3$	hypotonicity stretch 2-APB	tranilast	not described in PA	[36,52]
TRPV4	human, mouse, and rat PA (PAAF PAEC, PASMC)	30–90 (unitary) 452 ± 63 (whole cell)	$P_{Ca}/P_{Na} = 6–10$	hypotonicity shear stress 4- $\alpha$ PDD GSK1016790A	HC607047 RN-1734 GSK2193874	reduced hyperreactivity, remodeling and vasomotor tone	[23,36,52,65,66]



Although the relevance in mechanotransduction has not been examined for many of TRP channel isoforms playing important physiological functions in pulmonary vessels, their mechanosensitivity in other tissues has been demonstrated, suggesting their putative role as SAC in pulmonary vessels. Thus, we describe in this section their role in pulmonary vasculature and involvement in PH.

### 3.1. TRPC

Among TRPC1-7 channels, TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, and TRPC6 are sensitive to mechanical stimulation [36]. Interestingly, these five isoforms are detected in PA from different species including rat or human, and some of them play a role in PH [67,68].

#### 3.1.1. TRPC1

TRPC1 was the first member of this channel superfamily to be identified in drosophila, in 1995 [69]. This channel is expressed ubiquitously and can interact with some other TRP channels such as TRPC4, TRPC5, TRPC6, TRPP2, or TRPV4 [70]. TRPC1 is a mechanosensitive channel involved in store-operated calcium entry (SOCE) and receptor-operated calcium entry (ROCE) in various cell types playing a role in cell proliferation and migration [36,37].

In the pulmonary vasculature, previous studies have demonstrated that TRPC1 is expressed in PASM and PAEC in rat, mouse, and human [68,71,72]. The role of TRPC1 in PA has mostly been studied under pathological condition of PH where it participates in the worsening phenotype of the disease. TRPC1 expression is upregulated at mRNA and protein levels in PA from PH animal models such as CH [68], MCT [73] or chronic ligation of the left main PA (thromboembolic PH) [74]. In PASM from PH rat, TRPC1 is involved in basal increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and SOCE currents [68,74,75]. This dysregulation of  $Ca^{2+}$  homeostasis increases PASM proliferation, observed in PH [71], and promotes PA remodeling and altered contraction responses [73,76]. Moreover, Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4), which plays an important role in PA remodeling, increases SOCE currents through TRPC1 overexpression in PASM. This process is dependent on p38-ERK1/2 MAPK pathway [77,78]. In a pre-clinical study using a CH-induced PH murine model, Sun et al. demonstrated that intratracheal TRPC1 siRNA delivery reduces the production of pro-fibrosis factors, increases endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression that favors vasodilatation, and decreases pro-apoptotic factors, overall attenuating PH phenotype [79]. In accordance with this study, pulmonary vasculature remodeling in response to CH is reduced in *trpc1*<sup>-/-</sup> mice [71]. Moreover, vasomotor tone and hypoxia-enhanced 5-HT vasoconstriction are also attenuated in these mice [76]. Furthermore, right ventricular hypertrophy and microvessels remodeling are suppressed in double knock out mice *trpc1*<sup>-/-</sup>/*trpc6*<sup>-/-</sup>. Finally, sildenafil, a phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitor currently used to treat PH, reduces TRPC1 expression, diminishing basal  $[Ca^{2+}]_i$  and SOCE currents in PASM and, consequently, the severity of PH in a CH rat model [75,80]. Overall, these findings indicate that TRPC1 plays a central role in  $Ca^{2+}$  homeostasis in PH and that regulating its expression and/or function can be used as potential therapeutic means in the disease.

#### 3.1.2. TRPC3

TRPC3 is a mechanosensitive channel ubiquitously expressed, particularly in central nervous and cardiovascular systems. TRPC3 can interact with some other TRP channels such as TRPC1, TRPC6, or TRPC7 [70]. TRPC3 is involved in SOCE and ROCE playing various roles in cardiovascular diseases [38].

TRPC3 is expressed in human and rat PA [81,82], in both PASM and PAEC [38]. Moreover, this channel is upregulated in PASM from patients with pulmonary arterial hypertension (PAH), at mRNA and protein levels [50]. This increase is associated with an increased SOCE [83]. However, to our knowledge, few studies reported a distinct role for TRPC3 in pulmonary vasculature or in PH.

### 3.1.3. TRPC4

TRPC4 is a ubiquitously expressed channel involved in ROCE/SOCE currents. This channel is one of the main TRPC channels expressed in human, mouse, and rat PA. Although stretch-induced TRPC4 activation has not been shown to be involved in PH, it can be activated by a variety of stimuli including arachidonic acid, whose signaling pathway is implicated in mechanosensitivity [42,43].

In smooth muscle and endothelial cells, TRPC4 plays an important role in regulating microvascular permeability, agonist-dependent vasorelaxation, and gene transcription [67]. At cellular level, TRPC4 is involved in  $Ca^{2+}$  signaling, altering endothelial permeability in PAEC [44,47]. In pulmonary vasculature, TRPC4 promotes pulmonary arterial constriction and remodeling in rat SUGEN-Hypoxia PH group 1 model. Thus, *trpc4*<sup>-/-</sup> rats present attenuated PA remodeling, reduction of plexiform lesions, associated with an increase of survival [46,47].

### 3.1.4. TRPC5

Initially identified in the central nervous system, TRPC5 is a  $Ca^{2+}$  permeable non-selective channel expressed in a range of tissues and cell types. Its expression in the pulmonary vasculature is conflicting. In some studies, this channel was detected in PASM and PAEC [48] whereas in others, it was not detected in distal PA or PASM [49] or detected only in PASM but not in PAEC [50]. Despite the fact that TRPC5 role is well documented in the systemic vasculature, particularly in pathophysiological regulation of vascular tone [60,84] or in angiogenesis [85], to our knowledge, no studies have reported a distinct role for this mechanosensitive channel in PA or PH.

### 3.1.5. TRPC6

TRPC6 is a mechanosensitive channel ubiquitously expressed in vasculature. There is some evidence that TRPC6 is involved in SOCE and ROCE, playing a role in numerous biological processes including cell proliferation, myogenic tone, and agonist-induced vasoconstriction modulation [37]. Moreover, TRPC6 is also directly activated by DAG.

In pulmonary vasculature, studies have demonstrated TRPC6 expression in PASM and PAEC in mouse, rat, and human [86,87], in proximal and distal PA [48,49,82,88]. Moreover, TRPC6 is also present in pulmonary venous smooth muscle [89]. Interestingly, it plays various roles in PH. Firstly, TRPC6 expression is upregulated in human PA from PH patients [50] and PASM from idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) patients [90], as well as in PH animal models such as CH [68] and MCT [91]. A polymorphism in TRPC6 is also associated with an increased risk to develop IPAH [92]. Secondly, in PASM, TRPC6 promotes SOCE and ROCE currents, and PASM proliferation [50,90,93]. Furthermore, TRPC6 has been implicated in the adaptive contraction response of pulmonary vasculature to alveolar hypoxia [87]. Thirdly, *trpc6*<sup>-/-</sup> mice present less pulmonary vasculature remodeling in response to CH associated with a decreased vasomotor tone and hypoxia-enhanced 5-HT vasoconstriction response, attenuating the pulmonary hypertensive phenotype [76,94]. In addition, bosentan, an endothelin receptor inhibitor currently used to treat PAH, reduces TRPC6 expression, inhibiting cell proliferation [90]. Finally, as for TRPC1, sildenafil reduces TRPC6-evoked SOCE current in PASM and consequently the severity of PH in CH rat model [75,80].

Promising new inhibitor candidates have been recently studied for PH treatment. Indeed, in CH or MCT rat models, chrysin, a component of medicinal plants, inhibits PH-induced TRPC1/6 upregulation, modulates  $Ca^{2+}$  homeostasis, reduces PASM proliferation, and reactive oxygen species production, attenuating the PH phenotype (right ventricular pressure and hypertrophy, and vascular remodeling) [95,96]. In the same way, in CH mouse model, chloroquine, used for antimalarial treatment in *Plasmodium vivax* malaria, reverses TRPC1/6 overexpression and decreases vascular remodeling [97]. Finally, in CH rat model, topotecan, a topoisomerase inhibitor already used for cancer therapy, inhibits CH-induced TRPC1/4/6 overexpression and reduces  $[Ca^{2+}]_i$  in PASM,



improving hemodynamic parameters and attenuating artery remodeling and right ventricle hypertrophy [98].

### 3.2. TRPV

Among TRPV channels, TRPV1 [99,100], TRPV2 [101], and TRPV4 [66,102,103] are known to be mechanosensitive [104], especially to an osmotic stimulation [105].

#### 3.2.1. TRPV1

TRPV1 is expressed in PAEC and PASMCM [21,106–109], as well as in rat distal pulmonary venous smooth muscle cells (SMC) [110]. This channel is permeable to  $\text{Ca}^{2+}$  and contributes, to a large extent, to many  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling pathways including proliferation and migration associated with PH [21,107].

To study the functional implication of TRPV1 in PASMCM, a specific agonist, capsaicin, has been used to induce  $\text{Ca}^{2+}$  responses [21,64,107]. In these cells, TRPV1 activation promotes PASMCM migration associated with specific changes in the cytoskeleton architecture such as reorganization of F-actin, tubulin, and intermediate filament networks as well as NFAT nuclear translocation [21,107]. Thus, TRPV1 could activate  $\text{Ca}^{2+}$ /calcineurin/NFAT cascade signaling pathway known to play a crucial role in the physiopathology of PASMCM, implicated in hypoxia-induced PA remodeling and proliferation [21]. TRPV1 mRNA and proteins are increased in human PASMCM exposed to CH, an in vitro model of PH [108]. Consistent with these observations, both capsaicin-induced increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and channel activity are enhanced in PASMCM from IPAHA patients [64]. On the contrary, inhibition of TRPV1 by means of antagonists or knockdown reduces human hypoxia-induced PH [108] and IPAHA PASMCM proliferation [64]. Another evidence of TRPV1 role in proliferation is the response of rat PASMCM to acute exposure to silicium dioxide nanoparticles. After such an exposure, the increase of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and a proliferative response are greater in PASMCM isolated from rats with PH than in those from control rats, and these responses are inhibited in the presence of TRPV1 antagonist [111]. Although TRPV1 expression is not modified in rat PASMCM cultured under hypoxic conditions, it seems that hypoxia induces TRPV1 membrane translocation [21]. Likewise, hypoxia exposure does not potentiate the TRPV1-induced cytoskeleton reorganization but TRPV1 inhibition limits the effect of hypoxia on cytoskeletal changes suggesting an implication of TRPV1 in this remodeling [21]. More recently, a beneficial effect of TRPV1 in PH was demonstrated through TRPV1 involvement in human PA vasodilatation in response to cannabidiol [106]. This phenomenon could be explained by the expression of TRPV1 in PAEC. Given that most of the previous studies describing the implication of TRPV1 in proliferation and migration associated with PH were performed on isolated PASMCM, the signaling pathways implicated in PAEC after TRPV1 activation could provide counterbalancing effects at the site of the entire vessel.

#### 3.2.2. TRPV2

Although TRPV2 is expressed in PA, its function has been less studied. mRNA expression for TRPV2 is greater than for TRPV4 and TRPV1 in rat distal pulmonary vein SMC and this expression was confirmed by Western blot [110]. However, in PA, TRPV2 expression is lower than that of TRPV4 [108,109]. TRPV2 is notably expressed in human and rat PASMCM [108,112]. TRPV2 current shows a weakly outward rectifying I/V curve similar to the one observed in response to thromboxane A2 analogue. This suggests that TRPV2 is a potential candidate for non-selective cationic response to thromboxane A2. It is noteworthy that thromboxane A2 analogue has been shown to play a critical role in rat hypoxic pulmonary vasoconstriction, interfering that TRPV2 could also be implicated [112].

#### 3.2.3. TRPV4

TRPV4 is widely expressed in every layer of PA [109]. In PAEC, it plays a role in vasodilatation [113,114], whereas in PASMCM it is involved in contraction, migration, and proliferation [9,65,108,115–117]; and in PAAE, it participates in remodeling processes [118].



All these mechanisms are either impaired (namely endothelial dysfunction) or enhanced (namely contraction and remodeling) in PH. Hence, TRPV4 activation in endothelium induces relaxation through NO-signaling and endothelium-derived hyperpolarizing factor [119]. Furthermore, TRPV4 interacts with eNOS in PAEC [114] and activation of unitary  $\text{Ca}^{2+}$  influx events through TRPV4 in these cells induces the release of NO, which initiates the guanylyl cyclase–protein kinase G pathway. Besides, guanylyl cyclase–protein kinase G signaling provides a negative feedback for TRPV4–eNOS coupling, thus regulating TRPV4 function [113]. Although TRPV4-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling in PAEC is an important pathway for vasorelaxation, a dysregulation of this signaling is observed in PH. Indeed, in a rat model of PAH (SU5416 plus hypoxia) occurring through vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) inhibition, elevated production of mitochondrial-derived ROS induces a  $\text{Ca}^{2+}$  influx via TRPV4, which promotes enhanced migratory and proliferative responses in PAEC [120]. In PAAF, TRPV4 activation induces proliferation, migration, and extracellular matrix production (collagen I and fibronectin) thereby modulating the matrix stiffness, thus contributing to the adventitial remodeling occurring during PH [118]. PASMC express functional TRPV4 channels which are involved in increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , which triggers proliferation [111,115,117] and migration [107]. TRPV4 expression is increased in CH rat PASMC [23,65] associated with enhanced responses, providing evidence that TRPV4 is important in the development of the pathology. Indeed, the TRPV4 upregulation in PASMC is consistent with the higher basal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  observed after CH, an enhanced myogenic tone and 5-HT-induced vasoconstriction via the cytochrome P450 epoxygenase–epoxyeicosatrienoic acid pathway CH PA [23,121]. Nevertheless, whereas culturing PASMC in CH (1%  $\text{O}_2$  during 48 h) does not affect TRPV4 expression, the amplitude of the TRPV4-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevation and migratory response are more elevated [21], suggesting a direct role of hypoxia on TRPV4 channel function. The deletion of the *trpv4* gene in mice has provided evidence of the implication of TRPV4 channel in the development of PH. Indeed, in CH *trpv4*<sup>−/−</sup> mice, all the features of PH are reduced, such as right ventricle heart hypertrophy, remodeling via muscularization of the arteries [23], PA pressure increase associated with hypoxic pulmonary vasoconstriction [122], and enhancement in 5-HT induced contraction [116]. Moreover, in PASMC from IPAH patients, TRPV4 expression and shear stress-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response are increased, whereas this hypersensitivity to mechanical stimuli is reduced by TRPV4 inhibition using pharmacological antagonists or siRNA knockdown [9].

### 3.3. TRPM

Among TRPM channels, TRPM3, TRPM4, and TRPM7 are known to be mechanosensitive [104]. TRPM3 is sensitive to hypotonic cell swelling [51] whereas TRPM4 implication in mechanosensitivity seems to be indirect [55,123]. TRPM7 has been described as sensitive to both stretch and osmolarity [58,124].

#### 3.3.1. TRPM3

TRPM3 mRNA expression in rat PA was shown by RT-qPCR [109]. Its expression is weaker than other TRPM channels such as TRPM8, TRPM4, and TRPM7 but higher than TRPM5 or TRPM6. However, no functional studies have been performed on TRPM3 in PA.

#### 3.3.2. TRPM4

TRPM4 is widely expressed in various tissues including SMC of rat aorta, cerebral arteries, and PA. In PA, TRPM4 mRNA expression is, quantitatively, the second most important TRPM channel detected after TRPM8 [109]. TRPM4 is selective for monovalent cations and has a calcium-dependent activation (with an  $\text{EC}_{50}$  of 10  $\mu\text{M}$  in native SMC) [125]. The function of TRPM4 in PA has not been studied but it was shown that this channel is involved in the regulation of cerebral artery SMC membrane potential and contractility. Indeed, its activation induces  $\text{Na}^+$  influx in SMC under physiological conditions and a down-regulation of its expression impairs pressure-induced SMC depolarization and vasoconstriction in isolated rat cerebral arteries [55]. Another study reported that *trpm4*<sup>−/−</sup>

mice are hypertensive and present an increase in contractility of peripheral resistance vessels and cardiac function [126]. The role of TRPM4 in PH should thus be further investigated.

### 3.3.3. TRPM7

Similar to the other TRPM channels, TRPM7 expression in rat PA has been evaluated by RT-qPCR and its mRNA levels are similar to those of TRPM4 [109]. TRPM7 is a divalent cation permeable ion channel with a greater permeability to  $Mg^{2+}$  than  $Ca^{2+}$  [56] and has been shown to contribute to various phenomena involved in PH such as inflammation, fibrosis, cell migration, and cell proliferation [127]. Several studies show its implication in enhanced proliferation and vascular remodeling associated with PH. Song et al. described the role of TRPM7 in sensing fluid flow shear stress in human PASMCM from IPAH or normal patients. They also showed that TRPM7, as well as TRPV4, are necessary for shear stress-mediated  $Ca^{2+}$  increase in PASMCM and that TRPM7 is also responsible for  $Mg^{2+}$  influx. Moreover, in IPAH PASMCM, shear stress-induced  $Mg^{2+}$  increase is greater than in normal PASMCM. This augmentation is due to upregulated TRPM7 expression in these cells [9]. Thus, upregulated mechanosensitive channels such as TRPM7 in PASMCM may contribute to the development of IPAH by inducing sustained pulmonary vasoconstriction leading to vascular remodeling. Confirming these findings, a study showed the therapeutic effect of *Ophiocordyceps sinensis*, an entomopathogenic fungus, known to exert antiproliferative and antiremodeling effects on PH through TRPM7 inhibition. They found that TRPM7 is expressed in fibroblast-like cells of the right ventricle and in PA, and that this expression is increased in PH rats. TRPM7 deletion in PH mice attenuates the signs of PH. Inhibition of TRPM7 activity via this fungus has an antiproliferative effect in IPAH PASMCM, and vaso-dilates human PA [59]. However, an opposite effect was observed in another study where, in condition of PH, TRPM7 currents and free  $Mg^{2+}$  concentration were reduced in human or rat PASMCM. There, TRPM7 inhibition increased proliferation and apoptosis resistance in PASMCM through MEK/ERK pathway and exacerbated hypoxia-induced PH in vivo, whereas TRPM7 overexpression decreased PASMCM proliferation and apoptosis resistance [128].

### 3.4. TRPA1

TRPA1 is also mechanosensitive and proposed as a candidate in mechanically gated hair cell transduction in the auditory response [129], or as shown in Merkel cells from hamster buccal mucosa [105]. However, it has not been studied in pulmonary vessels.

### 3.5. TRPP

TRPP channels consist of TRPP1, TRPP2, and TRPP3. Among TRPP family, TRPP1 can interact with Polycystin-1 [60]; TRPP2 along with Polycystin-1, TRPV4, and TRPC1, then functioning as mechanosensitive channels [61]. TRPP1 and TRPP2 are both expressed in vascular smooth muscle and EC from cerebral and mesenteric arteries playing a role in regulation of blood vessel function and myogenic tone [130,131]. However, roles of TRPP channels in pulmonary vasculature are not known and require further investigation.

## 4. Piezo Channels

Ten years ago, the discovery of Piezo channels as new SAC by Coste et al. [132] opened up new research opportunities in the field of mechanotransduction. Firstly described in pressure sensitive neurons, their involvement in vascular physiopathology has emerged. Piezo are encoded by two genes, *Piezo1* and *Piezo2* (formerly named *Fam38A* and *Fam38B*), coding for two different channels: Piezo1 and Piezo2. Piezo channels have the particularity to form a homotrimeric protein complex. Hence, Piezo channels possess a propeller-shaped architecture that comprises the central cap and three peripheral blades. Each monomer presents 38 transmembrane domains [133] instead of the most common six transmembrane domains as for TRP channels. Piezo channels are mainly permeable to  $Ca^{2+}$  but also to



$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Mg}^{2+}$ , therefore being non-selective  $\text{Ca}^{2+}$  channels [134] (Table 2). They are activated by several mechanical stress forces such as physiological shear stress [135], cell wall tension or, in vitro, via a membrane crushing by a pipette, positive, and negative pressures [132,136] or a hypo-osmotic stress. Recently, ultrasound waves (500 kHz) have also been shown to activate those channels [137]. Piezo1 and 2 have similar properties but Piezo1 appears to be preferentially activated by a negative pressure while Piezo2 by a positive one. The channel sensitivity to pressure also differs: compared to Piezo1, Piezo2 channel is activated by higher pressures [138]. Furthermore, selective chemical agonists for Piezo1 channel have been described: Yoda1, which acts as a gating modulator by sensitizing the activation threshold of the channel and slows its inactivation kinetic [139,140]; Jedi1/2, which modulates the channel activation by potentializing its mechanosensitivity and slows down its inactivation kinetic [141]. Several common antagonists of SAC also antagonize Piezo1 channel such as the GsMTx-4 toxin [142,143],  $\text{Gd}^{3+}$  or ruthenium red [132,144]. However, some selective antagonists of the Yoda1-induced Piezo1 activation have been described such as Dooku1 (a Yoda1 analogue) [145] or Tubeimoside I (TBMSI) [146].

**Table 2.** Biophysical properties of Piezo channels in pulmonary arterial vascular cells.

Channel	Cell Type (Species)	Conductance (pS)	Permeability	Activator	Inhibitor	PA Phenotype in KO Mice	References
Piezo1	human, mouse, and rat PA human and mouse PAEC human PASMCMC	22–30	$\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Cs}} = 2$ ; $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cs}} = 1.1$ ; $P_{\text{K}}/P_{\text{Cs}} = 1.1$ ; $P_{\text{Mg}}/P_{\text{Cs}} = 0.5$	negative and positive pressures, shear stress, ultrasound waves, Yoda1, Jedi1/2	GsMTx-4 ruthenium red $\text{Gd}^{3+}$ dooku1 tubeimoside I	not viable → endothelium specific conditional deletion: no effect	[26,132,134,135,137–142,144–150]
Piezo2	human PA	27–28	-	negative and positive pressures	GsMTx-4 ruthenium red $\text{Gd}^{3+}$	not described in PA	[132,136,138,143,147]

Piezo1 channels have been implicated in the pathogenesis of several vascular diseases. Deletion of *Piezo1* gene in mouse leads to an aberrant vascular development resulting in an early embryonic death around day 10 [151]. In human, loss of function mutation of Piezo1 causes a congenital lymphatic dysplasia and patients are affected with a persistent lymphedema [152]. In systemic circulation, Piezo1 controls pressure or wall thickness [153,154]. Piezo1 channels display synergic or opposite functions in vessels, depending on the cell type where they are expressed. Endothelial Piezo1 channels are required for flow-induced vasodilatation due to eNOS activation and NO release [155]. Besides, the  $\text{Ca}^{2+}$  influx through these channels is not the only mechanism leading to NO formation as it also requires an ATP release through pannexin channels and subsequent P2Y2 receptor and endothelial NOS activation [155]. An alternative signaling pathway involves the release of adrenomedullin, which in turn, triggers NO release [156]. In uterine artery, as well as in the aorta, endothelial Piezo1 induces vessel relaxation [145,157]. By contrast, in mesenteric vessels, Piezo1 is responsible for flow-sensitive cationic ion influx in EC, which depolarizes the membrane. This depolarization spreads to the adjacent vascular SMC and activates voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels causing vasoconstriction [158]. Retaillieu et al. [153] reported that the increased cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  due to enhanced Piezo1 activation in vascular SMC influences both the diameter and wall thickness during hypertension in systemic circulation.

The presence of Piezo1 and 2 channels in the lung was described in the first report of Piezo as the tissue with the highest expression of these channels [132]. Others, as well as we, have reported the presence of Piezo1 in rat, mouse, or human PA [26,147–149].

Piezo2 is also present in human PA but its function remains unknown [147]. Human and mouse PAEC express Piezo1 channels [26]. The stimulation of this channel by a hypo-osmotic shock or by its selective agonist Yoda1 induces a large  $\text{Ca}^{2+}$  influx. The intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase subsequently stimulates NO formation through eNOS, which brings about relaxation of mouse intrapulmonary arteries [26]. Unlike in the systemic circulation, Piezo1-induced NO formation does not require activation of ATP receptors. Selective deletion of Piezo1 in mouse EC inhibits Yoda1-induced relaxation. Interestingly, endothelial deletion of Piezo1 increases  $\alpha$ -adrenergic agonist-mediated contraction. Two hypotheses could explain this observation. On the one hand, phenylephrine-induced contraction of the vessel modifies its shape, which could lead to PAEC stretch, which, in turn, activates PAEC-Piezo1 channels. NO released by PAEC would then antagonize the contraction. On the other hand, phenylephrine could release factors derived from PASMCM that may stimulate endothelial Piezo channels. In this connection, a crosstalk between SMC and endothelium has been previously described in pulmonary artery, where 5-HT stimulates both SMC contraction and NO release [159–161].

In CH mouse, Piezo1 still mediates arterial relaxation. Deletion of this channel in PAEC does not impair the development of the disease [26]. This result is supported by RT-qPCR measurements that show no variation in Piezo1 transcript in human PA from PH patients [147]. This finding is original as several other relaxation pathways are reduced during hypertension such as the acetylcholine pathway, which also requires NOS activation. As the Piezo1-mediated relaxation is still present in PH, activation of this channel could serve as therapeutic pathway.

In cultured human PASMCM, Yoda1 induces a large intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase due to activation of Piezo1 channels located at the plasma membrane and in intracellular organelles such as reticulum or mitochondria [149,162]. This  $\text{Ca}^{2+}$  rise through Piezo1 channels contributes to cell contraction and proliferation. In cultivated PASMCM derived from IPAH patients, Piezo1 is upregulated and its activation triggers a higher  $\text{Ca}^{2+}$  influx (from both extracellular and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores) leading to an increased cell proliferation that could contribute to the pathophysiology of PH [149].

In conclusion, while endothelial Piezo1 function is not altered in mouse PA in PH, PASMCM-Piezo1 channels are upregulated in human arteries [149], and could contribute to the development of the pathology. Furthermore, Piezo1 are also involved in several other pathophysiological processes in other tissues that share common pathological characteristics with PH. Indeed, activation of Piezo1 by hydrostatic pressure has been shown to activate inflammasome signaling pathways in macrophages [163] and in nucleus pulposus cells [164]. Turbulent flow induces Piezo1- and Gq/G11-mediated integrin activation, resulting in focal adhesion kinase-dependent NF- $\kappa$ B [165]. Those mechanisms could also contribute to PH and these pathways will also be interesting to explore in future studies. Moreover, the fact that Piezo1 activation is involved in free radical and NO production in PAEC [26] suggests that it could also contribute to the production of  $\text{NOO}^-$ , a toxic free radical that has been shown to be involved in PH [166]. Finally, Piezo1 induces cell migration and metastasis in several cancers [167]. Furthermore, Piezo1 localizes at focal adhesions to activate integrin-FAK signaling [168]. As Piezo1 is mainly expressed in the PAEC lamellipodia [151], we could postulate that Piezo1 could be involved in the remodeling of PA during PH.

## 5. Other Mechanosensitive Channels

In contrast to cationic depolarizing channels such as TRPV4 and Piezo, stretch also activates  $\text{K}^+$  hyperpolarizing channels (Table 3) such as two-pore domain  $\text{K}^+$  channels (K2P: TREK-1, TREK-2, TRAAK), ATP-dependent  $\text{K}^+$  channels ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) [169] or calcium-activated  $\text{K}^+$  channels ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) [170]. However, stretch is not the only activator of these channels as they mainly respond to physiological chemical activators. Their activation, inducing a cellular hyperpolarization, acts as counterparts to TRPV4 or Piezo1 depolarization activity, enabling fine-tuning of mechanosensation, reducing cellular contraction in



response to mechanical forces [171]. Potassium flux is also involved in cell proliferation and inflammation [172,173].

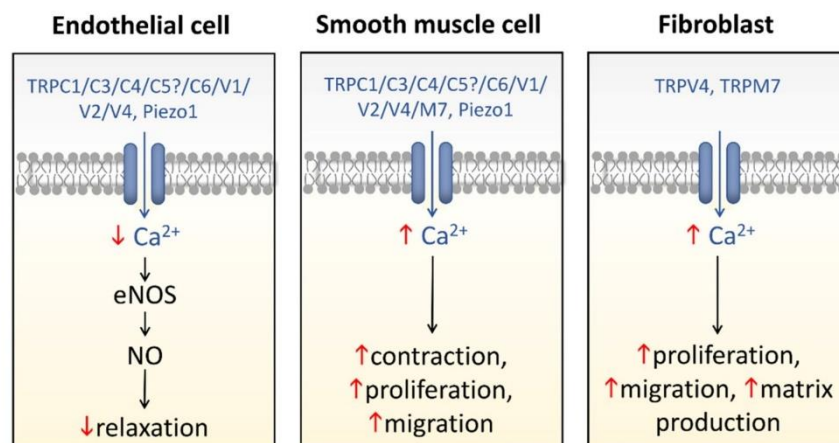
**Table 3.** Biophysical properties of mechanosensitive K<sup>+</sup> channels in pulmonary arterial vascular cells.

Channel	Cell Type (Species)	Conductance (pS)	Permeability	Activator	Inhibitor	PA Phenotype in KO Mice	References
BK <sub>Ca</sub>	rabbit and rat PASMCMC	273	K <sup>+</sup>	negative pressure, calcium	-	not described in PA	[170,174–176]
K <sub>ATP</sub>	human and rabbit PASMCMC	42–55 (pressure), 28 (Levcromakalim)	K <sup>+</sup>	negative and positive pressures, levcromakalim, iptakalim	intracellular ATP glibenclamide	not described in PA	[177–179]
TREK-1	mouse PA rat PASMCMC	90	K <sup>+</sup>	negative pressure	-	not described in PA	[180,181]
TREK-2	mouse and rat PAMC	-	K <sup>+</sup>	stretch	-	not described in PA	[180,181]

Whereas expression of K2P (TREK-1 especially) channels in PA has been confirmed [180,181], involvement of these channels in PH has not been described yet. K<sub>ATP</sub> channels have been shown to be expressed in rabbit and human PASMCMC where they are involved in the modulation of the resting membrane potential [178,179]. Furthermore, the K<sub>ATP</sub> opener, Iptakalim, has been shown to prevent pulmonary resistance vascular remodeling, cell proliferation, endothelial dysfunction [182,183], and PH [184]. Early studies showed that BK<sub>Ca</sub> channels were activated by stretch and arachidonic acid in rabbit PASMCMC [175]. Besides, their activation prevents the development of PH in rat [176,185]. However, the mechanosensitive part of the function of these K<sup>+</sup> channels has not been studied in detail in PA cells and further investigation needs to be done.

## 6. Conclusions

Mechanosensing is a key mechanism that intervenes in the regulation of the vascular tone. All the cellular layers of PA are able to sense mechanical forces, from PAEC to PASMCMC and PAAF. Each cell type responds differently and jointly to induce vasodilatation or vasoconstriction, depending on the physiological needs and the sensed pressure. During PH, where mechanical stimulations in the PA are altered, modification of cellular processes occurs, mainly mediated through SAC (e.g., TRP and Piezo channels), see schematic Figure 5. Stretch-induced signaling pathways have been shown to disturb PAAF evoked-fibrosis, PAEC evoked-vasodilatation, PASMCMC evoked-contraction, and also their proliferation and migration. Altogether these alterations are involved in the pathophysiological phenotypes observed in PH. Future studies should aim to elucidate, in more details, mechanistic pathways that involve SAC in PA with the objective to target SAC in a pre-clinical approach. However, caution must be taken as mechanosensing is a key cellular mechanism that should not be annihilated at any cost in the whole organism and organs.



**Figure 5.** Schematic view illustrating the multifunctional contribution of SAC in the pathogenesis of PH. Red arrows indicate PH-induced modifications of cellular processes in pulmonary arterial vascular cells.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.G., G.C., G.G., I.B., J.-F.Q., P.V., R.M., S.B., T.D., and V.F.-M.; drawing figures, G.G.; writing-original draft preparation, G.C., G.G., J.-F.Q., P.V., S.B., and T.D.; supervision, J.-F.Q. and T.D.; funding acquisition, C.G., I.B., J.-F.Q., P.V., R.M., T.D., and V.F.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the French National Research Agency (ANR), grant number ANR-19-CE44-0010-02 (the CANALBRET project); the New Aquitaine regional council (Région Nouvelle-Aquitaine), grant number AAPR2020I-2019-8151810 (the PHYSTRIG project); and the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM), grant number DPC20171138954.

**Acknowledgments:** In memory of our regretted colleague Anne-Marie Vacher.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Yamashiro, Y.; Yanagisawa, H. The Molecular Mechanism of Mechanotransduction in Vascular Homeostasis and Disease. *Clin. Sci.* **2020**, *134*, 2399–2418. [[CrossRef](#)]
2. Bayliss, W.M. On the Local Reactions of the Arterial Wall to Changes of Internal Pressure. *J. Physiol.* **1902**, *28*, 220–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Liu, F.; Haeger, C.M.; Dieffenbach, P.B.; Sicard, D.; Chrobak, I.; Coronata, A.M.; Suarez Velandia, M.M.; Vitali, S.; Colas, R.A.; Norris, P.C.; et al. Distal Vessel Stiffening Is an Early and Pivotal Mechanobiological Regulator of Vascular Remodeling and Pulmonary Hypertension. *JCI Insight* **2016**, *1*, e86987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Galie, N.; Humbert, M.; Vachiery, J.L.; Gibbs, S.; Lang, I.; Torbicki, A.; Simonneau, G.; Peacock, A.; Vonk Noordegraaf, A.; Beghetti, M.; et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: The Joint 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: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* **2016**, *37*, 67–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Humbert, M.; Galie, N.; McLaughlin, V.V.; Rubin, L.J.; Simonneau, G. An Insider View on the World Symposium on Pulmonary Hypertension. *Lancet Respir. Med.* **2019**, *7*, 484–485. [[CrossRef](#)]
6. Broughton, B.R.; Walker, B.R.; Resta, T.C. Chronic Hypoxia Induces Rho kinase-Dependent Myogenic Tone in Small Pulmonary Arteries. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2008**, *294*, L797–L806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. De La Roque, E.D.; Thiaudiere, E.; Ducret, T.; Marthan, R.; Franconi, J.M.; Guibert, C.; Parzy, E. Effect of Chronic Hypoxia on Pulmonary Artery Blood Velocity in Rats as Assessed by Electrocardiography-Triggered Three-Dimensional Time-Resolved MR Angiography. *NMR Biomed.* **2011**, *24*, 225–230. [[CrossRef](#)]
8. Wu, D.; Birukov, K. Endothelial Cell Mechano-Metabolomic Coupling to Disease States in the Lung Microvasculature. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 172. [[CrossRef](#)]
9. Song, S.; Yamamura, A.; Yamamura, H.; Ayon, R.J.; Smith, K.A.; Tang, H.; Makino, A.; Yuan, J.X. Flow Shear Stress Enhances Intracellular  $Ca^{2+}$  Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2014**, *307*, C373–C383. [[CrossRef](#)]



10. Ingber, D.E. Cellular Mechanotransduction: Putting All the Pieces Together again. *FASEB J.* **2006**, *20*, 811–827. [[CrossRef](#)]
11. Corey, D.P.; Hudspeth, A.J. Response Latency of Vertebrate Hair Cells. *Biophys. J.* **1979**, *26*, 499–506. [[CrossRef](#)]
12. Guharay, F.; Sachs, F. Stretch-Activated Single Ion Channel Currents in Tissue-Cultured Embryonic Chick Skeletal Muscle. *J. Physiol.* **1984**, *352*, 685–701. [[CrossRef](#)]
13. Folgering, J.H.; Sharif-Naeini, R.; Dedman, A.; Patel, A.; Delmas, P.; Honore, E. Molecular Basis of the Mammalian Pressure-Sensitive Ion Channels: Focus on Vascular Mechanotransduction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2008**, *97*, 180–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Beech, D.J.; Kalli, A.C. Force Sensing by Piezo Channels in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 2228–2239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Douguet, D.; Patel, A.; Xu, A.; Vanhoutte, P.M.; Honore, E. Piezo Ion Channels in Cardiovascular Mechanobiology. *Trends Pharmacol. Sci.* **2019**, *40*, 956–970. [[CrossRef](#)]
16. Bialecki, R.A.; Kulik, T.J.; Colucci, W.S. Stretching Increases Calcium Influx and Efflux in Cultured Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol.* **1992**, *263*, L602–L606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Park, K.S.; Kim, Y.; Lee, Y.H.; Earm, Y.E.; Ho, W.K. Mechanosensitive Cation Channels in Arterial Smooth Muscle Cells Are Activated by Diacylglycerol and Inhibited by Phospholipase C Inhibitor. *Circ. Res.* **2003**, *93*, 557–564. [[CrossRef](#)]
18. Park, K.S.; Lee, H.A.; Earm, K.H.; Ko, J.H.; Earm, Y.E.; Kim, S.J. Differential Distribution of Mechanosensitive Nonselective Cation Channels in Systemic and Pulmonary Arterial Myocytes of Rabbits. *J. Vasc. Res.* **2006**, *43*, 347–354. [[CrossRef](#)]
19. Ducret, T.; El Arrouchi, J.; Courtois, A.; Quignard, J.F.; Marthan, R.; Savineau, J.P. Stretch-Activated Channels in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from Normoxic and Chronically Hypoxic Rats. *Cell Calcium* **2010**, *48*, 251–259. [[CrossRef](#)]
20. Gilbert, G.; Ducret, T.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Quignard, J.F. Stretch-Induced Ca<sup>2+</sup> Signalling in Vascular Smooth Muscle Cells Depends on Ca<sup>2+</sup> Store Segregation. *Cardiovasc. Res.* **2014**, *103*, 313–323. [[CrossRef](#)]
21. Parpaite, T.; Cardouat, G.; Mauroux, M.; Gillibert-Duplantier, J.; Robillard, P.; Quignard, J.F.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Ducret, T. Effect of Hypoxia on TRPV1 and TRPV4 Channels in Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Pflugers Arch.* **2016**, *468*, 111–130. [[CrossRef](#)]
22. Kim, H.J.; Yoo, H.Y.; Jang, J.H.; Lin, H.Y.; Seo, E.Y.; Zhang, Y.H.; Kim, S.J. Wall Stretch and Thromboxane A<sub>2</sub> Activate NO Synthase (eNOS) in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Akt-Dependent Phosphorylation. *Pflugers Arch.* **2016**, *468*, 705–716. [[CrossRef](#)]
23. Yang, X.R.; Lin, A.H.; Hughes, J.M.; Flavahan, N.A.; Cao, Y.N.; Liedtke, W.; Sham, J.S. Upregulation of Osmo-Mechanosensitive TRPV4 Channel Facilitates Chronic Hypoxia-Induced Myogenic Tone and Pulmonary Hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2012**, *302*, L555–L568. [[CrossRef](#)]
24. Lee, H.A.; Baek, E.B.; Park, K.S.; Jung, H.J.; Kim, J.I.; Kim, S.J.; Earm, Y.E. Mechanosensitive Nonselective Cation Channel Facilitation by Endothelin-1 Is Regulated by Protein Kinase C in Arterial Myocytes. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *76*, 224–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gilbert, G.; Ducret, T.; Savineau, J.P.; Marthan, R.; Quignard, J.F. Caveolae Are Involved in Mechanotransduction during Pulmonary Hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2016**, *310*, L1078–L1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lhomme, A.; Gilbert, G.; Pele, T.; Deweirdt, J.; Henrion, D.; Baudrimont, I.; Campagnac, M.; Marthan, R.; Guibert, C.; Ducret, T.; et al. Stretch-Activated Piezo1 Channel in Endothelial Cells Relaxes Mouse Intrapulmonary Arteries. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2019**, *60*, 650–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Winston, F.K.; Thibault, L.E.; Macarak, E.J. An Analysis of the Time-Dependent Changes in Intracellular Calcium Concentration in Endothelial Cells in Culture Induced by Mechanical Stimulation. *J. Biomech. Eng.* **1993**, *115*, 160–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Gnanasambandam, R.; Ghatak, C.; Yasmann, A.; Nishizawa, K.; Sachs, F.; Ladokhin, A.S.; Sukharev, S.I.; Suchyna, T.M. GsMTx4: Mechanism of Inhibiting Mechanosensitive Ion Channels. *Biophys. J.* **2017**, *112*, 31–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kefauver, J.M.; Ward, A.B.; Patapoutian, A. Discoveries in Structure and Physiology of Mechanically Activated Ion Channels. *Nature* **2020**, *587*, 567–576. [[CrossRef](#)]
30. Delmas, P.; Hao, J.; Rodat-Despoix, L. Molecular Mechanisms of Mechanotransduction in Mammalian Sensory Neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12*, 139–153. [[CrossRef](#)]
31. Ranade, S.S.; Syeda, R.; Patapoutian, A. Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron* **2015**, *87*, 1162–1179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Deweirdt, J.; Ducret, T.; Quignard, J.F.; Freund-Michel, V.; Lacomme, S.; Gontier, E.; Muller, B.; Marthan, R.; Guibert, C.; Baudrimont, I. Effects of FW2 Nanoparticles Toxicity in a New In Vitro Pulmonary Vascular Cells Model Mimicking Endothelial Dysfunction. *Cardiovasc. Toxicol.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wang, A.; Cao, S.; Stowe, J.C.; Valdez-Jasso, D. Substrate Stiffness and Stretch Regulate Profibrotic Mechanosignaling in Pulmonary Arterial Adventitial Fibroblasts. *Cells* **2021**, *10*, 1000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dunham-Snary, K.J.; Wu, D.; Sykes, E.A.; Thakrar, A.; Parlow, L.R.G.; Mewburn, J.D.; Parlow, J.L.; Archer, S.L. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: From Molecular Mechanisms to Medicine. *Chest* **2017**, *151*, 181–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Staruschenko, A.; Jeske, N.A.; Akopian, A.N. Contribution of TRPV1-TRPA1 Interaction to the Single Channel Properties of the TRPA1 Channel. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 15167–15177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Inoue, R.; Jian, Z.; Kawarabayashi, Y. Mechanosensitive TRP Channels in Cardiovascular Pathophysiology. *Pharmacol. Ther.* **2009**, *123*, 371–385. [[CrossRef](#)]

37. Inoue, R.; Jensen, L.J.; Shi, J.; Morita, H.; Nishida, M.; Honda, A.; Ito, Y. Transient Receptor Potential Channels in Cardiovascular Function and Disease. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 119–131. [[CrossRef](#)]
38. Watanabe, H.; Murakami, M.; Ohba, T.; Takahashi, Y.; Ito, H. TRP Channel and Cardiovascular Disease. *Pharmacol. Ther.* **2008**, *118*, 337–351. [[CrossRef](#)]
39. Morelli, M.B.; Amantini, C.; Liberati, S.; Santoni, M.; Nabissi, M. TRP Channels: New Potential Therapeutic Approaches in CNS Neuropathies. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2013**, *12*, 274–293. [[CrossRef](#)]
40. Walker, R.L.; Koh, S.D.; Sergeant, G.P.; Sanders, K.M.; Horowitz, B. TRPC4 currents have properties similar to the pacemaker current in interstitial cells of Cajal. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2002**, *283*, C1637–C1645. [[CrossRef](#)]
41. Freichel, M.; Tsvilovskyy, V.; Camacho-Londono, J.E. TRPC4- and TRPC4-Containing Channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2014**, *222*, 85–128. [[CrossRef](#)]
42. Vazquez, G.; Wedel, B.J.; Aziz, O.; Trebak, M.; Putney, J.W., Jr. The Mammalian TRPC Cation Channels. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1742*, 21–36. [[CrossRef](#)]
43. Beech, D.J. Integration of Transient Receptor Potential Canonical Channels with Lipids. *Acta Physiol.* **2012**, *204*, 227–237. [[CrossRef](#)]
44. Tiruppathi, C.; Freichel, M.; Vogel, S.M.; Paria, B.C.; Mehta, D.; Flockerzi, V.; Malik, A.B. Impairment of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in TRPC4<sup>-/-</sup> Mice Interferes with Increase in Lung Microvascular Permeability. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 70–76. [[CrossRef](#)]
45. Tiruppathi, C.; Ahmed, G.U.; Vogel, S.M.; Malik, A.B. Ca<sup>2+</sup> Signaling, TRP Channels, and Endothelial Permeability. *Microcirculation* **2006**, *13*, 693–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. 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. [[CrossRef](#)]
47. Francis, M.; Xu, N.; Zhou, C.; Stevens, T. Transient Receptor Potential Channel 4 Encodes a Vascular Permeability Defect and High-Frequency Ca<sup>2+</sup> Transients in Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Pathol.* **2016**, *186*, 1701–1709. [[CrossRef](#)]
48. McDaniel, S.S.; Platoshyn, O.; Wang, J.; Yu, Y.; Sweeney, M.; Krick, S.; Rubin, L.J.; Yuan, J.X. Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry in Agonist-Induced Pulmonary Vasoconstriction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2001**, *280*, L870–L880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Wang, J.; Shimoda, L.A.; Sylvester, J.T. Capacitative Calcium Entry and TRPC Channel Proteins Are Expressed in Rat Distal Pulmonary Arterial Smooth Muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2004**, *286*, L848–L858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. 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. Enhanced Expression of Transient Receptor Potential Channels in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13861–13866. [[CrossRef](#)]
51. Grimm, C.; Kraft, R.; Sauerbruch, S.; Schultz, G.; Harteneck, C. Molecular and Functional Characterization of the Melastatin-Related Cation Channel TRPM3. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21493–21501. [[CrossRef](#)]
52. Nilius, B.; Owsianik, G.; Voets, T.; Peters, J.A. Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 165–217. [[CrossRef](#)]
53. Launay, P.; Fleig, A.; Perraud, A.L.; Scharenberg, A.M.; Penner, R.; Kinet, J.P. TRPM4 Is a Ca<sup>2+</sup>-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell* **2002**, *109*, 397–407. [[CrossRef](#)]
54. Nilius, B.; Prenen, J.; Janssens, A.; Owsianik, G.; Wang, C.; Zhu, M.X.; Voets, T. The selectivity filter of the cation channel TRPM4. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22899–22906. [[CrossRef](#)]
55. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Monteilh-Zoller, M.K.; Hermosura, M.C.; Nadler, M.J.; Scharenberg, A.M.; Penner, R.; Fleig, A. TRPM7 Provides an Ion Channel Mechanism for Cellular Entry of Trace Metal Ions. *J. Gen. Physiol.* **2003**, *121*, 49–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Runnels, L.W.; Yue, L.; Clapham, D.E. TRP-PLIK, a Bifunctional Protein with Kinase and Ion Channel Activities. *Science* **2001**, *291*, 1043–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Numata, T.; Shimizu, T.; Okada, Y. TRPM7 Is a Stretch- and Swelling-Activated Cation Channel Involved in Volume Regulation in Human Epithelial Cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2007**, *292*, C460–C467. [[CrossRef](#)]
59. Hiraishi, K.; Kurahara, L.H.; Feng, J.; Yamamura, A.; Cui, Y.; Yahiro, E.; Yokomise, H.; Go, T.; Ishikawa, K.; Yokota, N.; et al. Substantial Involvement of TRPM7 Inhibition in the Therapeutic Effect of *Ophiocordyceps sinensis* on Pulmonary Hypertension. *Transl. Res.* **2021**, *233*, 127–143. [[CrossRef](#)]
60. Earley, S.; Brayden, J.E. Transient Receptor Potential Channels in the Vasculature. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 645–690. [[CrossRef](#)]
61. Du, J.; Fu, J.; Xia, X.M.; Shen, B. The Functions of TRPP2 in the Vascular System. *Acta Pharmacol. Sin.* **2016**, *37*, 13–18. [[CrossRef](#)]
62. Guo, J.; Zhao, R.; Zhou, M.; Li, J.; Yao, X.; Du, J.; Chen, J.; Shen, B. TRPP2 and STIM1 form a Microdomain to Regulate Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry and Blood Vessel Tone. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sang, D.; Bai, S.; Yin, S.; Jiang, S.; Ye, L.; Hou, W.; Yao, Y.; Wang, H.; Shen, Y.; Shen, B.; et al. Role of TRPP2 in Mouse Airway Smooth Muscle Tension and Respiration. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2019**, *317*, L466–L474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. 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. [[CrossRef](#)]



65. Dahan, D.; Ducret, T.; Quignard, J.F.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Esteve, E. Implication of the Ryanodine Receptor in TRPV4-Induced Calcium Response in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from Normoxic and Chronically Hypoxic Rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2012**, *303*, L824–L833. [[CrossRef](#)]
66. Strotmann, R.; Harteneck, C.; Nunnenmacher, K.; Schultz, G.; Plant, T.D. OTRPC4, a Nonselective Cation Channel That Confers Sensitivity to Extracellular Osmolarity. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 695–702. [[CrossRef](#)]
67. Firth, A.L.; Remillard, C.V.; Yuan, J.X. TRP Channels in Hypertension. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1772*, 895–906. [[CrossRef](#)]
68. Lin, M.J.; Leung, G.P.; Zhang, W.M.; Yang, X.R.; Yip, K.P.; Tse, C.M.; Sham, J.S. Chronic Hypoxia-Induced Upregulation of Store-Operated and Receptor-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells: A Novel Mechanism of Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 496–505. [[CrossRef](#)]
69. 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. USA* **1995**, *92*, 9652–9656. [[CrossRef](#)]
70. Thakore, P.; Earley, S. Transient Receptor Potential Channels and Endothelial Cell Calcium Signaling. *Compr. Physiol.* **2019**, *9*, 1249–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Malczyk, M.; Veith, C.; Fuchs, B.; Hofmann, K.; Storch, U.; Schermuly, R.T.; Witznath, 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Kini, V.; Chavez, A.; Mehta, D. A New Role for PTEN in Regulating Transient Receptor Potential Canonical Channel 6-Mediated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry, Endothelial Permeability, and Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 33082–33091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Liu, X.R.; Zhang, M.F.; Yang, N.; Liu, Q.; Wang, R.X.; Cao, Y.N.; Yang, X.R.; Sham, J.S.; Lin, M.J. Enhanced Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry and TRPC Channel Expression in Pulmonary Arteries of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2012**, *302*, C77–C87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Yun, X.; Chen, Y.; Yang, K.; Wang, S.; Lu, W.; Wang, J. Upregulation of Canonical Transient Receptor Potential Channel in the Pulmonary Arterial Smooth Muscle of a Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension Rat Model. *Hypertens. Res.* **2015**, *38*, 821–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Lu, W.; Ran, P.; Zhang, D.; Peng, G.; Li, B.; Zhong, N.; Wang, J. Sildenafil Inhibits Chronically Hypoxic Upregulation of Canonical Transient Receptor Potential Expression in Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2010**, *298*, C114–C123. [[CrossRef](#)]
76. Xia, Y.; Yang, X.R.; Fu, Z.; Paudel, O.; Abramowitz, J.; Birnbaumer, L.; Sham, J.S. Classical Transient Receptor Potential 1 and 6 Contribute to Hypoxic Pulmonary Hypertension through Differential Regulation of Pulmonary Vascular Functions. *Hypertension* **2014**, *63*, 173–180. [[CrossRef](#)]
77. Zhang, Y.; Wang, Y.; Yang, K.; Tian, L.; Fu, X.; Wang, Y.; Sun, Y.; Jiang, Q.; Lu, W.; Wang, J. BMP4 Increases the Expression of TRPC and Basal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  via the p38MAPK and ERK1/2 Pathways Independent of BMPRII in PASMCS. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112695. [[CrossRef](#)]
78. Li, X.; Lu, W.; Fu, X.; Zhang, Y.; Yang, K.; Zhong, N.; Ran, P.; Wang, J. BMP4 Increases Canonical Transient Receptor Potential Protein Expression by Activating p38 MAPK and ERK1/2 Signaling Pathways in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *49*, 212–220. [[CrossRef](#)]
79. 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 Int.* **2014**, *2014*, 316214. [[CrossRef](#)]
80. Wang, J.; Yang, K.; Xu, L.; Zhang, Y.; Lai, N.; Jiang, H.; Zhang, Y.; Zhong, N.; Ran, P.; Lu, W. Sildenafil Inhibits Hypoxia-Induced Transient Receptor Potential Canonical Protein Expression in Pulmonary Arterial Smooth Muscle via cGMP-PKG-PPARgamma Axis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *49*, 231–240. [[CrossRef](#)]
81. Gonzalez-Cobos, J.C.; Trebak, M. TRPC Channels in Smooth Muscle Cells. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2010**, *15*, 1023–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Rodat, L.; Savineau, J.P.; Marthan, R.; Guibert, C. Effect of Chronic Hypoxia on Voltage-Independent Calcium Influx Activated by 5-HT in Rat Intrapulmonary Arteries. *Pflugers Arch.* **2007**, *454*, 41–51. [[CrossRef](#)]
83. Zhang, S.; Patel, H.H.; Murray, F.; Remillard, C.V.; Schach, C.; Thistlethwaite, P.A.; Insel, P.A.; Yuan, J.X. Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Normal Subjects and IPAH Patients Show Divergent cAMP-Mediated Effects on TRPC Expression and Capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  Entry. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2007**, *292*, L1202–L1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Chen, X.; Yang, D.; Ma, S.; He, H.; Luo, Z.; Feng, X.; Cao, T.; Ma, L.; Yan, Z.; Liu, D.; et al. Increased rhythmicity in hypertensive arterial smooth muscle is linked to transient receptor potential canonical channels. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 2483–2494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Negri, S.; Faris, P.; Berra-Romani, R.; Guerra, G.; Moccia, F. Endothelial Transient Receptor Potential Channels and Vascular Remodeling: Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Entry for Angiogenesis, Arteriogenesis and Vasculogenesis. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1618. [[CrossRef](#)]
86. Singh, I.; Knezevic, N.; Ahmed, G.U.; Kini, V.; Malik, A.B.; Mehta, D. Galphaq-TRPC6-Mediated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry Induces RhoA Activation and Resultant Endothelial Cell Shape Change in Response to Thrombin. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 7833–7843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Malczyk, M.; Erb, A.; Veith, C.; Ghofrani, H.A.; Schermuly, R.T.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Weissmann, N.; Sydykov, A. The Role of Transient Receptor Potential Channel 6 Channels in the Pulmonary Vasculature. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Ng, L.C.; Gurney, A.M. Store-Operated Channels Mediate Ca<sup>2+</sup> Influx and Contraction in Rat Pulmonary Artery. *Circ. Res.* **2001**, *89*, 923–929. [[CrossRef](#)]
89. Xu, L.; Chen, Y.; Yang, K.; Wang, Y.; Tian, L.; Zhang, J.; Wang, E.W.; Sun, D.; Lu, W.; Wang, J. Chronic Hypoxia Increases TRPC6 Expression and Basal Intracellular Ca<sup>2+</sup> Concentration in Rat Distal Pulmonary venous Smooth Muscle. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112007. [[CrossRef](#)]
90. Kunichika, N.; Landsberg, J.W.; Yu, Y.; Kunichika, H.; Thistlethwaite, P.A.; Rubin, L.J.; Yuan, J.X. Bosentan Inhibits Transient Receptor Potential Channel Expression in Pulmonary Vascular Myocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2004**, *170*, 1101–1107. [[CrossRef](#)]
91. Wang, J.; Jiang, Q.; Wan, L.; Yang, K.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Wang, E.; Lai, N.; Zhao, L.; Jiang, H.; et al. Sodium Tanshinone IIA Sulfonate Inhibits Canonical Transient Receptor Potential Expression in Pulmonary Arterial Smooth Muscle from Pulmonary hypertensive Rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *48*, 125–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Fernandez, R.A.; Wan, J.; Song, S.; Smith, K.A.; Gu, Y.; Tauseef, M.; Tang, H.; Makino, A.; Mehta, D.; Yuan, J.X. Upregulated Expression of STIM2, TRPC6, and Orai2 Contributes to the Transition of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from a Contractile to Proliferative Phenotype. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2015**, *308*, C581–C593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Smith, K.A.; Voiriot, G.; Tang, H.; Fraidenburg, D.R.; Song, S.; Yamamura, H.; Yamamura, A.; Guo, Q.; Wan, J.; Pohl, N.M.; et al. Notch Activation of Ca<sup>2+</sup> Signaling in the Development of Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2015**, *53*, 355–367. [[CrossRef](#)]
95. Dong, F.; Zhang, J.; Zhu, S.; Lan, T.; Yang, J.; Li, L. Chrysin Alleviates Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension by Reducing Intracellular Calcium Concentration in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2019**, *74*, 426–435. [[CrossRef](#)]
96. Dong, F.; Zhang, J.; Chen, X.; Zhang, S.; Zhu, L.; Peng, Y.; Guo, Z. Chrysin Alleviates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats through Regulation of Intracellular Calcium Homeostasis in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2020**, *75*, 596–602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Kaymak, E.; Akin, A.T.; Tufan, E.; Basaran, K.E.; Taheri, S.; Ozdamar, S.; Yakan, B. The Effect of Chloroquine on the TRPC1, TRPC6, and CaSR in the Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells in Hypoxia-Induced Experimental Pulmonary Artery Hypertension. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2021**, *35*, e22636. [[CrossRef](#)]
98. Jiang, Y.; Zhou, Y.; Peng, G.; Liu, N.; Tian, H.; Pan, D.; Liu, L.; Yang, X.; Li, C.; Li, W.; et al. Topotecan Prevents Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension and Inhibits Hypoxia-Inducible Factor-1alpha and TRPC Channels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *104*, 161–170. [[CrossRef](#)]
99. Ciura, S.; Bourque, C.W. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Required for Intrinsic Osmoreception in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons and for Normal Thirst Responses to Systemic Hyperosmolality. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 9069–9075. [[CrossRef](#)]
100. Naeini, R.S.; Witty, M.F.; Seguela, P.; Bourque, C.W. An N-Terminal Variant of Trpv1 Channel Is Required for Osmosensory Transduction. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 93–98. [[CrossRef](#)]
101. Muraki, K.; Iwata, Y.; Katanosaka, Y.; Ito, T.; Ohya, S.; Shigekawa, M.; Imaizumi, Y. TRPV2 Is a Component of Osmotically Sensitive Cation Channels in Murine Aortic Myocytes. *Circ. Res.* **2003**, *93*, 829–838. [[CrossRef](#)]
102. Liedtke, W.; Choe, Y.; Marti-Renom, M.A.; Bell, A.M.; Denis, C.S.; Sali, A.; Hudspeth, A.J.; Friedman, J.M.; Heller, S. Vanilloid Receptor-Related Osmotically Activated Channel (VR-OAC), a Candidate Vertebrate Osmoreceptor. *Cell* **2000**, *103*, 525–535. [[CrossRef](#)]
103. Nilius, B.; Prenen, J.; Wissenbach, U.; Boddling, M.; Droogmans, G. Differential Activation of the Volume-Sensitive Cation Channel TRP12 (OTRPC4) and Volume-Regulated Anion Currents in HEK-293 Cells. *Pflugers Arch.* **2001**, *443*, 227–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Sharif-Naeini, R.; Dedman, A.; Folgering, J.H.; Duprat, F.; Patel, A.; Nilius, B.; Honore, E. TRP Channels and Mechanosensory Transduction: Insights into the Arterial Myogenic Response. *Pflugers Arch.* **2008**, *456*, 529–540. [[CrossRef](#)]
105. Soya, M.; Sato, M.; Sobhan, U.; Tsumura, M.; Ichinohe, T.; Tazaki, M.; Shibukawa, Y. Plasma membrane stretch activates transient receptor potential vanilloid and ankyrin channels in Merkel cells from hamster buccal mucosa. *Cell Calcium* **2014**, *55*, 208–218. [[CrossRef](#)]
106. Baranowska-Kuczko, M.; Kozłowska, H.; Kloza, M.; Sadowska, O.; Kozłowski, M.; Kusaczuk, M.; Kasacka, I.; Malinowska, B. Vasodilatory Effects of Cannabidiol in Human Pulmonary and Rat Small Mesenteric Arteries: Modification by Hypertension and the Potential Pharmacological Opportunities. *J. Hypertens.* **2020**, *38*, 896–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Martin, E.; Dahan, D.; Cardouat, G.; Gillibert-Duplantier, J.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Ducret, T. Involvement of TRPV1 and TRPV4 Channels in Migration of Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Pflugers Arch.* **2012**, *464*, 261–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



108. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Yang, X.R.; Lin, M.J.; McIntosh, L.S.; Sham, J.S. 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–L1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Peng, G.; Lu, W.; Li, X.; Chen, Y.; Zhong, N.; Ran, P.; Wang, J. Expression of Store-Operated  $Ca^{2+}$  Entry and Transient Receptor Potential Canonical and Vanilloid-Related Proteins in Rat Distal Pulmonary Venous Smooth Muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2010**, *299*, L621–L630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Dubes, V.; Parpaite, T.; Ducret, T.; Quignard, J.F.; Mornet, S.; Reinhardt, N.; Baudrimont, I.; Dubois, M.; Freund-Michel, V.; Marthan, R.; et al. Calcium Signalling Induced by In Vitro Exposure to Silicium Dioxide Nanoparticles in Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Toxicology* **2017**, *375*, 37–47. [[CrossRef](#)]
112. Yoo, H.Y.; Park, S.J.; Seo, E.Y.; Park, K.S.; Han, J.A.; Kim, K.S.; Shin, D.H.; Earm, Y.E.; Zhang, Y.H.; Kim, S.J. Role of Thromboxane  $A_2$ -Activated Nonselective Cation Channels in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction of Rat. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2012**, *302*, C307–C317. [[CrossRef](#)]
113. Marziano, C.; Hong, K.; Cope, E.L.; Kotlikoff, M.I.; Isakson, B.E.; Sonkusare, S.K. Nitric Oxide-Dependent Feedback Loop Regulates Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Channel Cooperativity and Endothelial Function in Small Pulmonary Arteries. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e007157. [[CrossRef](#)]
114. Ottolini, M.; Daneva, Z.; Chen, Y.L.; Cope, E.L.; Kasetti, R.B.; Zode, G.S.; Sonkusare, S.K. Mechanisms Underlying Selective Coupling of Endothelial  $Ca^{2+}$  Signals with eNOS vs. IK/SK Channels in Systemic and Pulmonary Arteries. *J. Physiol.* **2020**, *598*, 3577–3596. [[CrossRef](#)]
115. Ducret, T.; Guibert, C.; Marthan, R.; Savineau, J.P. Serotonin-Induced Activation of TRPV4-like Current in Rat Intrapulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Cell Calcium* **2008**, *43*, 315–323. [[CrossRef](#)]
116. Xia, Y.; Fu, Z.; Hu, J.; Huang, C.; Paudel, O.; Cai, S.; Liedtke, W.; Sham, J.S. 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. [[CrossRef](#)]
117. Yao, Z.; Wang, C. A Novel Mechanism of Sildenafil Improving the Excessive Proliferation and  $H_2S$  Production in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2019**, *74*, 355–363. [[CrossRef](#)]
118. Cussac, L.A.; Cardouat, G.; Tiruchellvam Pillai, N.; Campagnac, M.; Robillard, P.; Montillaud, A.; Guibert, C.; Gailly, P.; Marthan, R.; Quignard, J.F.; et al. TRPV4 Channel Mediates Adventitial Fibroblast Activation and Adventitial Remodeling in Pulmonary Hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2020**, *318*, L135–L146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Sukumaran, S.V.; Singh, T.U.; Parida, S.; Reddy, C.E.N.; Thangamalai, R.; Kandasamy, K.; Singh, V.; Mishra, S.K. TRPV4 Channel Activation Leads to Endothelium-Dependent Relaxation Mediated by Nitric Oxide and Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Rat Pulmonary Artery. *Pharmacol. Res.* **2013**, *78*, 18–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Suresh, K.; Servinsky, L.; Jiang, H.; Bigham, Z.; Yun, X.; Kliment, C.; Huetsch, J.; Damarla, M.; Shimoda, L.A. Reactive Oxygen Species Induced  $Ca^{2+}$  Influx via TRPV4 and Microvascular Endothelial Dysfunction in the SU5416/Hypoxia Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2018**, *314*, L893–L907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Xia, Y.; Xia, L.; Jin, Z.; Jin, R.; Paudel, O.; Sham, J.S.K. Cytochrome P450 Epoxide-Dependent Activation of TRPV4 Channel Participates in Enhanced Serotonin-Induced Pulmonary Vasoconstriction in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Anal. Cell. Pathol.* **2020**, *2020*, 8927381. [[CrossRef](#)]
122. Goldenberg, N.M.; Wang, L.; Ranke, H.; Liedtke, W.; Tabuchi, A.; Kuebler, W.M. TRPV4 Is Required for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Anesthesiology* **2015**, *122*, 1338–1348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Morita, H.; Honda, A.; Inoue, R.; Ito, Y.; Abe, K.; Nelson, M.T.; Brayden, J.E. Membrane Stretch-Induced Activation of a TRPM4-like Nonselective Cation Channel in Cerebral Artery Myocytes. *J. Pharmacol. Sci.* **2007**, *103*, 417–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Numata, T.; Shimizu, T.; Okada, Y. Direct mechano-stress sensitivity of TRPM7 channel. *Cell. Physiol. Biochem.* **2007**, *19*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Earley, S. TRPM4 Channels in Smooth Muscle Function. *Pflügers Arch.* **2013**, *465*, 1223–1231. [[CrossRef](#)]
126. Mathar, I.; Vennekens, R.; Meissner, M.; Kees, F.; Van der Mieren, G.; Londono, J.E.C.; Uhl, S.; Voets, T.; Hummel, B.; van den Bergh, A.; et al. Increased Catecholamine Secretion Contributes to Hypertension in TRPM4-Deficient Mice. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 3267–3279. [[CrossRef](#)]
127. Touyz, R.M. Transient Receptor Potential Melastatin 6 and 7 Channels, Magnesium Transport, and Vascular Biology: Implications in Hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *294*, H1103–H1118. [[CrossRef](#)]
128. Xing, J.; Wang, M.; Hong, J.; Gao, Y.; Liu, Y.; Gu, H.; Dong, J.; Li, L. TRPM7 channel inhibition exacerbates pulmonary arterial hypertension through MEK/ERK pathway. *Aging* **2019**, *11*, 4050–4065. [[CrossRef](#)]
129. Corey, D.P.; Garcia-Anoveros, J.; Holt, J.R.; Kwan, K.Y.; Lin, S.Y.; Vollrath, M.A.; Amalfitano, A.; Cheung, E.L.; Derfler, B.H.; Duggan, A.; et al. TRPA1 Is a Candidate for the Mechanosensitive Transduction Channel of Vertebrate Hair Cells. *Nature* **2004**, *432*, 723–730. [[CrossRef](#)]
130. Sharif-Naeni, R.; Folgering, J.H.; Bichet, D.; Duprat, F.; Lauritzen, I.; Arhatte, M.; Jodar, M.; Dedman, A.; Chatelain, F.C.; Schulte, U.; et al. Polycystin-1 and -2 Dosage Regulates Pressure Sensing. *Cell* **2009**, *139*, 587–596. [[CrossRef](#)]



131. Narayanan, D.; Bulley, S.; Leo, M.D.; Burris, S.K.; Gabrick, K.S.; Boop, F.A.; Jaggar, J.H. Smooth Muscle Cell Transient Receptor Potential Polycystin-2 (TRPP2) Channels Contribute to the Myogenic Response in Cerebral Arteries. *J. Physiol.* **2013**, *591*, 5031–5046. [[CrossRef](#)]
132. 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. [[CrossRef](#)]
133. Zhao, Q.; Zhou, H.; Chi, S.; Wang, Y.; Wang, J.; Geng, J.; Wu, K.; Liu, W.; Zhang, T.; Dong, M.Q.; et al. Structure and Mechanogating Mechanism of the Piezo1 Channel. *Nature* **2018**, *554*, 487–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Gnanasambandam, R.; Bae, C.; Gottlieb, P.A.; Sachs, F. Ionic Selectivity and Permeation Properties of Human PIEZO1 Channels. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125503. [[CrossRef](#)]
135. Morley, L.C.; Shi, J.; Gaunt, H.J.; Hyman, A.J.; Webster, P.J.; Williams, C.; Forbes, K.; Walker, J.J.; Simpson, N.A.B.; Beech, D.J. Piezo1 Channels Are Mechanosensors in Human Fetoplacental Endothelial Cells. *Mol. Hum. Reprod.* **2018**, *24*, 510–520. [[CrossRef](#)]
136. Shin, K.C.; Park, H.J.; Kim, J.G.; Lee, I.H.; Cho, H.; Park, C.; Sung, T.S.; Koh, S.D.; Park, S.W.; Bae, Y.M. The Piezo2 Ion Channel Is Mechanically Activated by Low-Threshold Positive Pressure. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6446. [[CrossRef](#)]
137. Qiu, Z.; Guo, J.; Kala, S.; Zhu, J.; Xian, Q.; Qiu, W.; Li, G.; Zhu, T.; Meng, L.; Zhang, R.; et al. The Mechanosensitive Ion Channel Piezo1 Significantly Mediates In Vitro Ultrasonic Stimulation of Neurons. *iScience* **2019**, *21*, 448–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Du, G.; Li, L.; Zhang, X.; Liu, J.; Hao, J.; Zhu, J.; Wu, H.; Chen, W.; Zhang, Q. Roles of TRPV4 and Piezo Channels in Stretch-Evoked Ca<sup>2+</sup> Response in Chondrocytes. *Exp. Biol. Med.* **2020**, *245*, 180–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Syeda, R.; Xu, J.; Dubin, A.E.; Coste, B.; Mathur, J.; Huynh, T.; Matzen, J.; Lao, J.; Tully, D.C.; Engels, I.H.; et al. Chemical Activation of the Mechanotransduction Channel Piezo1. *eLife* **2015**, *4*, e07369. [[CrossRef](#)]
140. Lacroix, J.J.; Botello-Smith, W.M.; Luo, Y. Probing the Gating Mechanism of the Mechanosensitive Channel Piezo1 with the Small Molecule Yoda1. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Wang, Y.; Chi, S.; Guo, H.; Li, G.; Wang, L.; Zhao, Q.; Rao, Y.; Zu, L.; He, W.; Xiao, B. A Lever-like Transduction Pathway for Long-Distance Chemical- and Mechano-Gating of the Mechanosensitive Piezo1 Channel. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Bae, C.; Sachs, F.; Gottlieb, P.A. The Mechanosensitive Ion Channel Piezo1 Is Inhibited by the Peptide GsMTx4. *Biochemistry* **2011**, *50*, 6295–6300. [[CrossRef](#)]
143. Alcaïno, C.; Knutson, K.; Gottlieb, P.A.; Farrugia, G.; Beyder, A. Mechanosensitive ion Channel Piezo2 Is Inhibited by D-GsMTx4. *Channels* **2017**, *11*, 245–253. [[CrossRef](#)]
144. Coste, B.; Xiao, B.; Santos, J.S.; Syeda, R.; Grandl, J.; Spencer, K.S.; Kim, S.E.; Schmidt, M.; Mathur, J.; Dubin, A.E.; et al. Piezo Proteins Are Pore-Forming Subunits of Mechanically Activated Channels. *Nature* **2012**, *483*, 176–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Evans, E.L.; Cuthbertson, K.; Endesh, N.; Rode, B.; Blythe, N.M.; Hyman, A.J.; Hall, S.J.; Gaunt, H.J.; Ludlow, M.J.; Foster, R.; et al. Yoda1 Analogue (Dooku1) Which Antagonizes Yoda1-Evoked Activation of Piezo1 and Aortic Relaxation. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 1744–1759. [[CrossRef](#)]
146. Liu, S.; Pan, X.; Cheng, W.; Deng, B.; He, Y.; Zhang, L.; Ning, Y.; Li, J. Tubeimoside I Antagonizes Yoda1-Evoked Piezo1 Channel Activation. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. 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*, 3162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Jiang, L.; Zhang, Y.; Lu, D.; Huang, T.; Yan, K.; Yang, W.; Gao, J. Mechanosensitive Piezo1 Channel Activation Promotes Ventilator-Induced Lung Injury via Disruption of Endothelial Junctions in ARDS Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *556*, 79–86. [[CrossRef](#)]
149. Liao, J.; Lu, W.; Chen, Y.; Duan, X.; Zhang, C.; Luo, X.; Lin, Z.; Chen, J.; Liu, S.; Yan, H.; et al. Upregulation of Piezo1 (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1) Enhances the Intracellular Free Calcium in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patients. *Hypertension* **2021**, *77*, 1974–1989. [[CrossRef](#)]
150. Bhattacharya, J.; Hough, R.F. Piezo1 in the Lung: At Last! *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2019**, *60*, 609–610. [[CrossRef](#)]
151. Li, J.; Hou, B.; Tumova, S.; Muraki, K.; Bruns, A.; Ludlow, M.J.; Sedo, A.; Hyman, A.J.; McKeown, L.; Young, R.S.; et al. Piezo1 Integration of Vascular Architecture with Physiological Force. *Nature* **2014**, *515*, 279–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Lukacs, V.; Mathur, J.; Mao, R.; Bayrak-Toydemir, P.; Procter, M.; Cahalan, S.M.; Kim, H.J.; Bandell, M.; Longo, N.; Day, R.W.; et al. Impaired PIEZO1 Function in Patients with a Novel Autosomal Recessive Congenital Lymphatic Dysplasia. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Retailleau, K.; Duprat, F.; Arhatte, M.; Ranade, S.S.; Peyronnet, R.; Martins, J.R.; Jodar, M.; Moro, C.; Offermanns, S.; Feng, Y.; et al. Piezo1 in Smooth Muscle Cells Is Involved in Hypertension-Dependent Arterial Remodeling. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 1161–1171. [[CrossRef](#)]
154. Allison, S.J. Hypertension: Mechanosensation by PIEZO1 in Blood Pressure Control. *Nat. Rev. Nephrol.* **2017**, *13*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Wang, S.; Chennupati, R.; Kaur, H.; Iring, A.; Wettschureck, N.; Offermanns, S. Endothelial Cation Channel PIEZO1 Controls Blood Pressure by Mediating Flow-Induced ATP Release. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 4527–4536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Iring, A.; Jin, Y.J.; Albarran-Juarez, J.; Siragusa, M.; Wang, S.; Dancs, P.T.; Nakayama, A.; Tonack, S.; Chen, M.; Kunne, C.; et al. Shear Stress-Induced Endothelial Adrenomedullin Signaling Regulates Vascular Tone and Blood Pressure. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 2775–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



157. John, L.; Ko, N.L.; Gokin, A.; Gokina, N.; Mandala, M.; Osol, G. The Piezo1 Cation Channel Mediates Uterine Artery Shear Stress Mechanotransduction and Vasodilation during Rat Pregnancy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H1019–H1026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Rode, B.; Shi, J.; Endesh, N.; Drinkhill, M.J.; Webster, P.J.; Lotteau, S.J.; Bailey, M.A.; Yuldasheva, N.Y.; Ludlow, M.J.; Cubbon, R.M.; et al. Piezo1 Channels Sense Whole Body Physical Activity to Reset Cardiovascular Homeostasis and Enhance Performance. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 350. [[CrossRef](#)]
159. Dora, K.A. Endothelial-Smooth Muscle Cell Interactions in the Regulation of Vascular Tone in Skeletal Muscle. *Microcirculation* **2016**, *23*, 626–630. [[CrossRef](#)]
160. Genet, N.; Billaud, M.; Rossignol, R.; Dubois, M.; Gillibert-Duplantier, J.; Isakson, B.E.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Guibert, C. Signaling Pathways Linked to Serotonin-Induced Superoxide Anion Production: A Physiological Role for Mitochondria in Pulmonary Arteries. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 76. [[CrossRef](#)]
161. Billaud, M.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Guibert, C. Vascular Smooth Muscle Modulates Endothelial Control of Vasoreactivity via Reactive Oxygen Species Production through Myoendothelial Communications. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. McHugh, B.J.; Buttery, R.; Lad, Y.; Banks, S.; Haslett, C.; Sethi, T. Integrin Activation by Fam38A uses a Novel Mechanism of R-Ras Targeting to the Endoplasmic Reticulum. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 51–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Solis, A.G.; Bielecki, P.; Steach, H.R.; Sharma, L.; Harman, C.C.D.; Yun, S.; de Zoete, M.R.; Warnock, J.N.; To, S.D.F.; York, A.G.; et al. Mechanosensation of Cyclical Force by PIEZO1 Is Essential for Innate Immunity. *Nature* **2019**, *573*, 69–74. [[CrossRef](#)]
164. Sun, Y.; Leng, P.; Song, M.; Li, D.; Guo, P.; Xu, X.; Gao, H.; Li, Z.; Li, C.; Zhang, H. Piezo1 Activates the NLRP3 Inflammasome in Nucleus Pulposus Cell-Mediated by Ca<sup>2+</sup>/NF- $\kappa$ B Pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *85*, 106681. [[CrossRef](#)]
165. Albarran-Juarez, J.; Iring, A.; Wang, S.; Joseph, S.; Grimm, M.; Strilic, B.; Wettschureck, N.; Althoff, T.F.; Offermanns, S. Piezo1 and Gq/G11 Promote Endothelial Inflammation Depending on Flow Pattern and Integrin Activation. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 2655–2672. [[CrossRef](#)]
166. Fulton, D.J.R.; Li, X.; Bordan, Z.; Haigh, S.; Bentley, A.; Chen, F.; Barman, S.A. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Development of Pulmonary Hypertension. *Antioxidants* **2017**, *6*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Sun, Y.; Li, M.; Liu, G.; Zhang, X.; Zhi, L.; Zhao, J.; Wang, G. The Function of Piezo1 in Colon Cancer Metastasis and Its Potential Regulatory Mechanism. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2020**, *146*, 1139–1152. [[CrossRef](#)]
168. Chen, X.; Wanggou, S.; Bodalia, A.; Zhu, M.; Dong, W.; Fan, J.J.; Yin, W.C.; Min, H.K.; Hu, M.; Draghici, D.; et al. A Feedforward Mechanism Mediated by Mechanosensitive Ion Channel PIEZO1 and Tissue Mechanics Promotes Glioma Aggression. *Neuron* **2018**, *100*, 799–815.e7. [[CrossRef](#)]
169. Richter, K.; Kiefer, K.P.; Grzesik, B.A.; Clauss, W.G.; Fronius, M. Hydrostatic Pressure Activates ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels in Lung Epithelium by ATP Release through Pannexin and Connexin Hemichannels. *FASEB J.* **2014**, *28*, 45–55. [[CrossRef](#)]
170. Xin, F.; Cheng, Y.; Ren, J.; Zhang, S.; Liu, P.; Zhao, H.; Huang, H.; Wang, W. The Extracellular Loop of the Auxiliary beta1-Subunit Is Involved in the Regulation of BKCa Channel Mechanosensitivity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2018**, *315*, C485–C493. [[CrossRef](#)]
171. Wiedmann, F.; Rinne, S.; Donner, B.; Decher, N.; Katus, H.A.; Schmidt, C. Mechanosensitive TREK-1 Two-Pore-Domain Potassium (K2P) Channels in the Cardiovascular System. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2021**, *159*, 126–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Xu, Z.; Chen, Z.M.; Wu, X.; Zhang, L.; Cao, Y.; Zhou, P. Distinct Molecular Mechanisms Underlying Potassium Efflux for NLRP3 Inflammasome Activation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 609441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Mondejar-Parreno, G.; Cogolludo, A.; Perez-Vizcaino, F. Potassium (K<sup>+</sup>) Channels in the Pulmonary Vasculature: Implications in Pulmonary Hypertension Physiological, Pathophysiological and Pharmacological Regulation. *Pharmacol. Ther.* **2021**, *225*, 107835. [[CrossRef](#)]
174. Tang, Q.Y.; Qi, Z.; Naruse, K.; Sokabe, M. Characterization of a Functionally Expressed Stretch-Activated BKCa Channel Cloned from Chick Ventricular Myocytes. *J. Membr. Biol.* **2003**, *196*, 185–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Kirber, M.T.; Ordway, R.W.; Clapp, L.H.; Walsh, J.V., Jr.; Singer, J.J. Both Membrane Stretch and Fatty Acids Directly Activate Large Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Vascular Smooth Muscle Cells. *FEBS Lett.* **1992**, *297*, 24–28. [[CrossRef](#)]
176. Ferraz, A.P.; Seara, F.A.C.; Baptista, E.F.; Barenco, T.S.; Sottani, T.B.B.; Souza, N.S.C.; Domingos, A.E.; Barbosa, R.A.Q.; Takiya, C.M.; Couto, M.T.; et al. BKCa Channel Activation Attenuates the Pathophysiological Progression of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Wistar Rats. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2020**, *35*, 719–732. [[CrossRef](#)]
177. Huang, H.; Liang, L.; Liu, P.; Wei, H.; Sachs, F.; Niu, W.; Wang, W. Mechanical Effects on KATP Channel Gating in Rat Ventricular Myocytes. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63337. [[CrossRef](#)]
178. Clapp, L.H.; Gurney, A.M. ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels Regulate Resting Potential of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, H916–H920. [[CrossRef](#)]
179. Cui, Y.; Tran, S.; Tinker, A.; Clapp, L.H. The Molecular Composition of K(ATP) Channels in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells and Their Modulation by Growth. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2002**, *26*, 135–143. [[CrossRef](#)]
180. Koh, S.D.; Monaghan, K.; Sergeant, G.P.; Ro, S.; Walker, R.L.; Sanders, K.M.; Horowitz, B. TREK-1 Regulation by Nitric Oxide and cGMP-Dependent Protein Kinase. An Essential Role in Smooth Muscle Inhibitory Neurotransmission. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44338–44346. [[CrossRef](#)]
181. Gardener, M.J.; Johnson, I.T.; Burnham, M.P.; Edwards, G.; Heagerty, A.M.; Weston, A.H. Functional Evidence of a Role for Two-Pore Domain Potassium Channels in Rat Mesenteric and Pulmonary Arteries. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 192–202. [[CrossRef](#)]

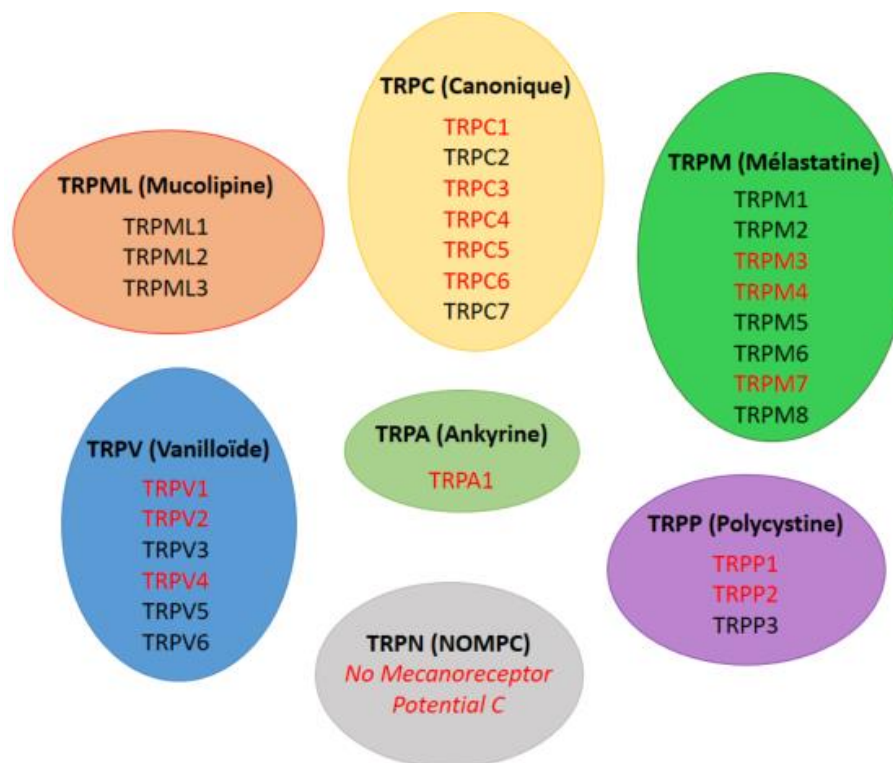
182. Xie, W.; Wang, H.; Ding, J.; Wang, H.; Hu, G. Anti-Proliferating Effect of Iptakalim, a Novel KATP Channel Opener, in Cultured Rabbit Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *511*, 81–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. He, M.; Cui, T.; Cai, Q.; Wang, H.; Kong, H.; Xie, W. Iptakalim Ameliorates Hypoxia-Impaired Human Endothelial Colony-Forming Cells Proliferation, Migration, and Angiogenesis via Akt/eNOS Pathways. *Pulm. Circ.* **2019**, *9*, 2045894019875417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Li, J.; Long, C.; Cui, W.; Wang, H. Iptakalim Ameliorates Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2013**, *18*, 60–69. [[CrossRef](#)]
185. Hayabuchi, Y. The Action of Smooth Muscle Cell Potassium Channels in the Pathology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Pediatr. Cardiol.* **2017**, *38*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## 4.2. Les canaux TRP

De nombreux canaux appartenant à différentes sous-familles de TRP sont exprimés au niveau vasculaire pulmonaire, et parmi ceux-ci, certains font partie des SAC pouvant ainsi jouer un rôle important dans le maintien du tonus myogénique, voire dans le développement de l'HTP.

### 4.2.1. Description

Les canaux TRP pour *Transient Receptor Potential* sont une super famille contenant des canaux mécanosensibles et comprenant 7 sous-familles [Figure 10] qui sont les TRPA (ankyrine), TRPC (canonique), TRPM (mélastatine), TRPML (mucoïpine), TRPN (ou NOMPC pour *No Mecanoreceptor Potential C*), TRPP (polycystine) et TRPV (vanilloïde) [32].

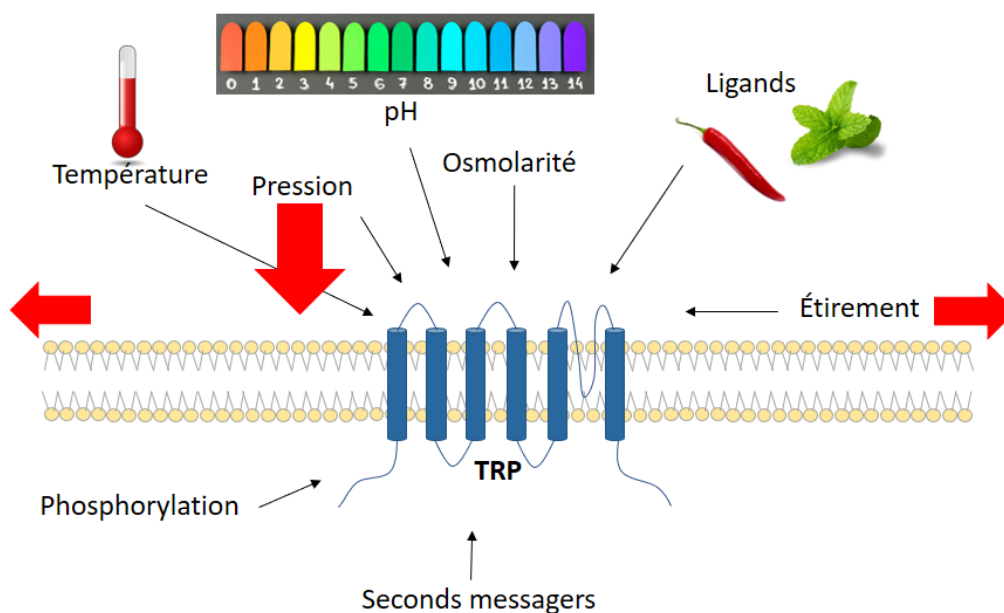


**Figure 10 : Différentes sous-familles de TRP.**

Les canaux décrits comme mécanosensibles dans la littérature sont indiqués en rouge sur cette figure.

Le premier canal TRP a été identifié chez *Drosophila melanogaster* où un mutant présentait une réponse transitoire lors d'électrorétinogrammes après une stimulation lumineuse prolongée [33, 34] suggérant son implication dans la phototransduction.

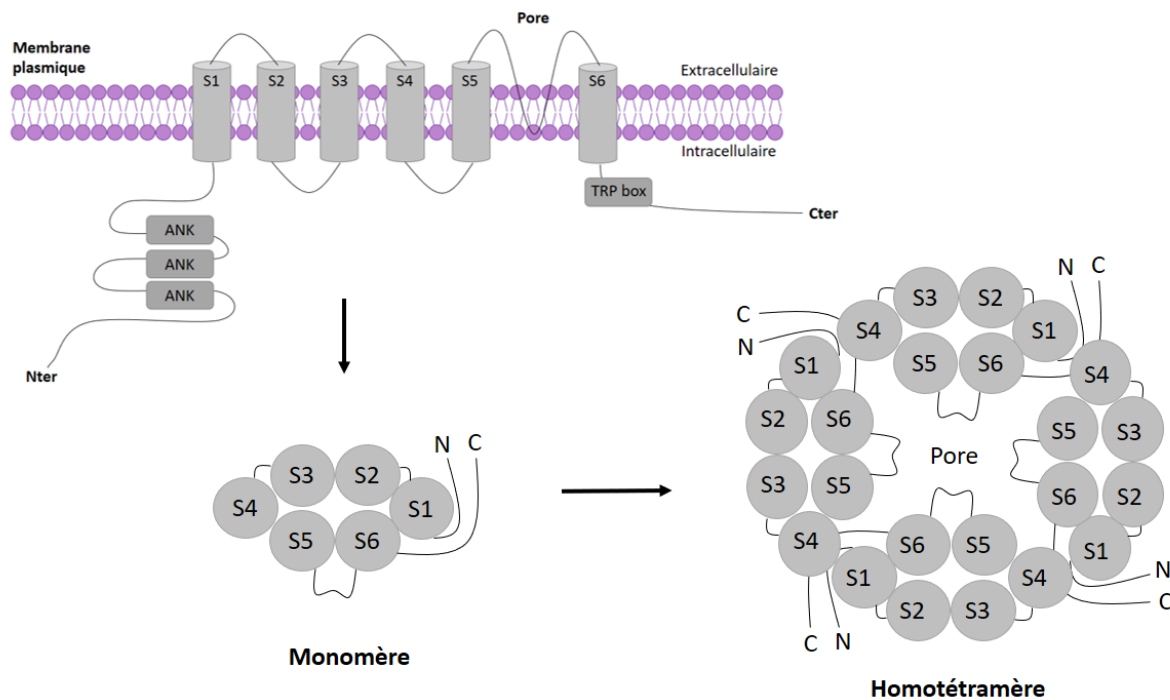
Les canaux TRP sont exprimés de façon ubiquitaire dans l'organisme (excepté les TRPN qui ne sont pas exprimés chez les mammifères). Ils jouent un rôle essentiel dans la transduction de stimuli physiques et chimiques en signaux biologiques. Ce sont des canaux polymodaux et ils sont notamment sensibles à des facteurs comme la température, la pression membranaire, l'osmolarité et le pH, et sont donc impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques [Figure 11]. Ils peuvent être activés par des RCPG et récepteurs tyrosine kinase qui activent les PLC pouvant ainsi moduler l'activité des canaux TRP via l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub>, la production de DAG, ou la production d'IP<sub>3</sub> associée à la libération de Ca<sup>2+</sup> des stocks réticulaires. Les TRP peuvent également être activés par des ligands ou par activation directe via une modification de la température, des stimuli mécaniques ou une phosphorylation du canal. La chaleur et le gonflement des cellules peuvent indirectement activer les TRP via des seconds messagers ou via d'autres mécanismes [35].



**Figure 11 : Différents modes d'activation des TRP.**

Ce sont des canaux qui s'assemblent en tétramères [Figure 12]. Chaque monomère possède 6 domaines transmembranaires (ou segments numérotés de S1 à S6) et dont les extrémités N- et C-terminales sont cytosoliques. Le pore du canal est formé par une boucle hydrophobe entre les segments transmembranaires S5 et S6 permettant le passage non sélectif de cations dont le Ca<sup>2+</sup>. Les TRP possèdent des domaines de répétitions de type ankyrine en N-ter (ANK ou ARD pour *Ankyrin Repeat Domain*), mais aussi en C-ter un domaine TRP contenant des motifs consensus appelés TRP box et qui sont plus ou moins conservés selon les sous-familles. Ces extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques contiennent de nombreux autres sites de régulation et d'interaction avec les protéines. De nombreux sites de phosphorylation des protéines kinases A et C ont été identifiés ainsi que des domaines reconnaissant la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et SH<sub>2</sub> (Src-homology-2) [36].





**Figure 12 : Structure des TRP et assemblage en tétramère.**

La plupart des TRP sont perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  et sont donc impliqués dans divers processus physiologiques [32, 35, 37]. Certains TRP jouent un rôle de mécanotransduction et thermotransduction chez des Invertébrés. En effet, *Caenorhabditis elegans* exprime des TRPN, TRPV et TRPA, et les drosophiles expriment des TRPV, TRPN (NOMPC), TRPA et TRPP [38]. Au niveau de la vision, TRP chez la drosophile a été identifié comme un canal sensible à la lumière et perméable au  $\text{Ca}^{2+}$  [39].

Chez les mammifères, les TRP, en plus d'être mécanosensibles et thermosensibles, peuvent être osmosensibles (comme les TRPV) [40].

Les TRP peuvent être impliqués dans les systèmes sensoriels, et certains sont exprimés dans le système gustatif comme TRPM5, TRPM4 et TRPV1 qui sont exprimés dans les cellules du goût et TRPP dans les cellules de la transduction du goût de type III. TRPV1, TRPM8 et TRPA1 sont, eux, exprimés dans les nerfs sensoriels généraux au niveau des papilles gustatives [41].

Au niveau de la peau, TRPV4, activé dans les kératinocytes de souris par la chaleur ou par des agonistes, accélère la régénération de la peau. Ce canal permet également la sensibilité à la température, à la douleur et participe au phénomène de démangeaison. D'ailleurs plusieurs TRP sont impliqués dans les mécanismes de douleur que ce soit la sensibilité au froid (TRPA1, TRPM8), la douleur nociceptive (TRPA1, TRPV3, TRPV4), la douleur inflammatoire (TRPA1, TRPM2, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4), la douleur neuropathique (TRPM3, TRPM8, TRPV1, TRPV4), la douleur viscérale (TRPV1, TRPV4) ou encore la migraine (TRPV4) [42].

Au niveau rénal, ce sont principalement les TRPC et TRPM (TRPM6 et 7) qui sont exprimés et qui jouent un rôle important dans la fonction rénale. On retrouve par exemple TRPC1 dans les cellules mésangiales glomérulaires, alors que TRPC3 est impliqué dans la fibrose rénale, TRPC5 est associé à la défaillance rénale. TRPC6, quant à lui, a un rôle rénal physiologique et sa fonction est altérée par des mutations héréditaires [43]. TRPV4 est impliqué dans la mécanosensibilité permettant la régulation de la sécrétion de rénine au niveau de l'appareil

juxtaglomérulaire et le contrôle de la réabsorption d'albumine au niveau du tubule proximal [44, 45].

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques, elles aussi, expriment des TRP pouvant jouer un rôle dans le diabète. TRPA1, TRPC1/4/6, TRPM1/2/3/4/5/8, TRPP3 et TRPV1/2/4/5/6 y ont notamment été décrits [46].

Au niveau du cerveau, on retrouve des TRPC, TRPM et TRPV avec en particulier TRPC3, TRPC6, TRPC7, TRPM2 et TRPV1 dans les neurones et la glie. Ils sont associés à des maladies neurodégénératives, maladies mentales ou à l'épilepsie. Les TRP sont impliqués dans la direction du cône de croissance neuronal, le guidage des cellules et la chimiotaxie. TRPV4 a un rôle dans l'excitabilité neuronale, et le complexe Aquaporine-4 - TRPV4 est essentiel pour le contrôle du volume cellulaire dans les astrocytes [47].

Au niveau du cœur, de nombreux TRP sont exprimés, notamment dans les cardiomyocytes avec des TRPC, TRPM, TRPV, TRPP et TRPA et dans les fibroblastes cardiaques avec TRPC, TRPM, TRPV, TRPA1 où ils permettent la régulation de la contractilité et du remodelage cardiaques. Les TRP dans le cœur contribuent aussi à la régulation de la conduction cardiaque et sont impliqués dans les arythmies [48].

Les canaux TRP peuvent être impliqués dans la pathogenèse des voies aériennes, parmi eux, TRPA1 (système de défense des poumons, toux, bronchoconstriction), TRPV1 (neurones sensoriels primaires, fibres C et A $\delta$ ), TRPV4 (interaction TRPV4-ATP-P2X3 dans l'osmosensibilité impliquée dans les réflexes sensoriels nerveux des voies aériennes, défense des voies aériennes, contraction CML bronchiques) et TRPM8 (rôle mineur et études contradictoires, constriction en réponse à une baisse de température, effet inhibiteur du menthol sur la toux, inhibition prolifération et migration des cellules épithéliales des voies aériennes dans le modèle de l'asthme et rôle dans la production de mucus et de médiateurs inflammatoires). Les TRP jouent un rôle dans la protection des voies aériennes contre des particules étrangères et participent à la réponse aux médiateurs inflammatoires pouvant mener à l'inflammation neurogène, l'hyperréactivité des voies aériennes ou une toux anormale associées à l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la toux chronique [49].

#### 4.2.2. TRP au niveau vasculaire et dans l'hypertension pulmonaire

Les canaux TRP sont aussi exprimés dans le système vasculaire et notamment dans les artères pulmonaires où ils jouent un rôle dans le maintien et les dérégulations des fonctions vasculaires.

Les TRP sont notamment impliqués dans la vasculogenèse, l'angiogenèse et l'artériogenèse où les canaux TRPV1 à 4 jouent un rôle important dans ces fonctions vasculaires. TRPV1 et 4 peuvent contrôler le remodelage vasculaire en favorisant la prolifération et la migration des CML vasculaires grâce à l'entrée de  $Ca^{2+}$  extracellulaire en conditions pathologiques comme dans l'HTP [50]. Leur expression au niveau endothélial permet de favoriser la vasodilatation des artères pulmonaires, un mécanisme pouvant contrebalancer les effets vasoconstricteurs lors de l'HTP [50]. TRPC1, 3 et 6 jouent également un rôle dans la prolifération et la migration cellulaires au niveau vasculaire pulmonaire via la SOCE et la ROCE [25].

L'expression de TRPM2, 3, 4, 7 et 8 et TRPV1, 2, 3 et 4 a été mise en évidence dans les artères pulmonaires et aortes de rat avec une expression plus importante de TRPM8 et TRPV4 pour chaque sous-famille. L'expression fonctionnelle des TRPM8 et TRPV4 dans les CMLAP et CML aortiques a également été évaluée grâce à des courants  $Ca^{2+}$  activés par leurs agonistes (menthol et 4 $\alpha$ -PDD respectivement) [51]. TRPM7 est un canal mécanosensible perméable aux cations divalents, avec une perméabilité au  $Mg^{2+}$  supérieure à celle du  $Ca^{2+}$ , et contribue à de

nombreux processus associés à l'HTP dont l'inflammation, la fibrose, la migration et la prolifération cellulaires [25].

L'implication des TRP, et plus globalement des SAC, a été mise en évidence lors de l'hypoxie chronique menant à l'HTP. En effet, l'hypoxie chronique augmente l'expression de TRPV1 et 4 dans les CMLAP, augmentant ainsi la réponse à une stimulation mécanique, ainsi qu'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  au repos induisant un tonus myogénique plus élevé [50]. L'activité des canaux SAC mesurée en patch-clamp en réponse à un étirement et la réponse calcique induite par choc hypotonique sont plus importantes dans les CMLAP de rats hypoxiques chroniques avec une réponse calcique augmentée de 95 % [27].

## 4.3. TRPV4

### 4.3.1. Description

TRPV4 est un canal de la famille des TRP dont l'expression est très importante chez l'Homme. C'est un canal cationique à rectification sortante sensible aux forces mécaniques [36]. Différentes conductances ont été obtenues pour TRPV4 dans différentes publications dans des HEK293, entre environ 30 à 60 pS de conductance unitaire pour des potentiels négatifs (-60 mV) et jusqu'à 90 à 100 pS à des potentiels positifs (+60 mV) [52, 53]. Il est principalement exprimé dans les cellules épithéliales, musculaires lisses et endothéliales d'une grande variété de tissus. Il a notamment été identifié dans le rein, le cœur ou les poumons et vaisseaux dont les vaisseaux pulmonaires. Ce canal a été décrit pour la première fois en 2000 [52, 54, 55] sous les noms de VR-OAC, OTRPC4, TRP-12 ou encore VRL-2 avant la mise en place de la nomenclature actuelle (TRPV4).

C'est une protéine de 98 kDa (871 acides aminés) qui possède, comme tous les TRP, 6 domaines transmembranaires et des extrémités N- et C-terminales cytosoliques. Le pore du canal est formé par les acides aminés de la boucle située entre les segments transmembranaires S5 et S6 (aa 663-686) [Figure 13]. Bien qu'il présente de nombreuses similarités de séquences avec d'autres membres de la famille TRPV, TRPV4 formerait préférentiellement des homotétramères [56]. Mais TRPV4 pourrait tout de même former des canaux hétéromériques avec d'autres TRPV plus particulièrement TRPV1 à 3 [57] ou encore TRPC1 [58] et TRPC6 [59].

Son activation peut être déclenchée par un stress mécanique, un gonflement des cellules (osmosensibilité), mais aussi par la chaleur (entre 25 et 33°C dans des HEK293 [56]). Il peut être activé par les forces de cisaillement dues au flux sanguin [60, 61]. TRPV4 peut également être activé par des agonistes sélectifs dont le 4 $\alpha$ -PDD et le GSK1016790A ou bien par les produits du métabolisme de l'acide arachidonique comme les EET (acides époxyeicosatriénoïques). C'est un canal perméable aux cations dont le Ca<sup>2+</sup> qui joue donc un rôle dans l'homéostasie calcique. Le Ca<sup>2+</sup> a un rôle à la fois de potentialisateur et dans l'inactivation du canal (cf. Modulation par le Ca<sup>2+</sup> et interaction avec la calmoduline). La perméabilité de TRPV4 au Ca<sup>2+</sup> par rapport au Na<sup>+</sup> est de 6.9 (il présente également une perméabilité Mg<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> = 2.5). Cette sélectivité est déterminée principalement par les acides aminés Asp682 (en C-ter du pore), Met680 (au niveau du centre du filtre de sélectivité) et Asp672 (régulant la perméabilité) [Figure 13] [62].

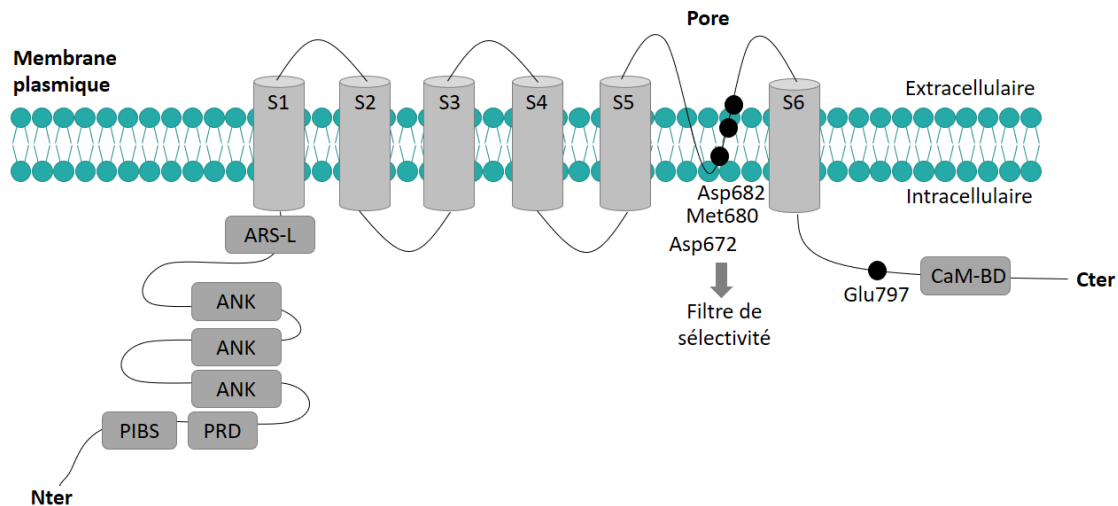
Le domaine N-terminal (aa 1-465) contient 3 domaines ankyrine (ANK ou ARD) importants dans l'oligomérisation du canal et dans l'activation du canal via 4 $\alpha$ -PDD et la chaleur. Ces domaines permettent l'interaction avec de nombreuses protéines et participent à la formation des structures tétramériques des canaux en interagissant avec les domaines C-ter des autres sous-unités. Un site de liaison aux phosphoinositides (PIBS, aa 121-125) est également présent dans cette queue N-ter permettant l'activation du canal via des stimuli physiologiques, ainsi qu'un domaine riche en prolines (PRD, aa 132-144) impliqué dans la liaison et régulation de la kinase C et de la PACSIN3 (*Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein*), et un site de reconnaissance arachidonate-like (ARS-L, aa 402-408). Le domaine C-terminal contient des domaines de liaison à la calmoduline (CaM-BD, aa 812-831), ainsi qu'un motif de liaison PDZ et un domaine d'oligomérisation. Une mutation de l'acide aminé E797 du C-ter entraîne un défaut dans l'inactivation du canal due au Ca<sup>2+</sup> [36, 62].

Des caractérisations électrophysiologiques de courants TRPV4 ont été réalisées notamment dans des HEK en réponse au GSK1016790A [63] ou dans des fibroblastes pulmonaires humains [64] où les densités de courant mesurées en configuration cellule entière sont respectivement de 710  $\pm$  144 pA/pF à +60 mV avec 10 nM de GSK1016790A dans les HEK transfectées avec

TRPV4 et  $-5.1 \pm 2.1$  pA/pF à  $-80$  mV et  $16.0 \pm 4.5$  pA/pF à  $+80$  mV avec 300 nM de GSK1016790A dans les fibroblastes où le potentiel d'inversion est de  $-5.5 \pm 7.3$  mV.

TRPV4 a été identifié comme un canal activé par l'osmolarité, notamment par les stimuli hypotoniques. Le gonflement cellulaire induit par la réponse osmotique active la phospholipase A2 qui produit l'acide arachidonique. Celui-ci est métabolisé en EET, qui active directement le canal, via le cytochrome P450.

TRPV4 est également sensible à la température. Il est activé par des stimuli de chaleur modérée avec un seuil d'activation entre 25 et 34°C selon les types cellulaires. Cette activation dépendante de la température implique des voies de signalisation endogènes [65].



**Figure 13 : Schéma de la structure de TRPV4.**

*PIBS = site de liaison aux phosphoinositides, PRD = domaine riche en proline, ANK = domaines ankyrine, ARS-L = site de reconnaissance arachidonate-like, S = segment transmembranaire, CaM-BD = domaines de liaison à la calmoduline.*

Parmi les TRP, TRPV4 est particulièrement impliqué dans l'HTP. En effet, de nombreuses études montrent son expression dans le système vasculaire et notamment les artères pulmonaires où son fonctionnement a été très étudié.

#### 4.3.2. TRPV4 au niveau vasculaire

Les canaux TRPV4 sont exprimés dans de nombreux tissus dont les vaisseaux sanguins. De nombreuses études ont donc été menées afin de mettre en évidence le rôle de TRPV4 dans ces vaisseaux. Il est exprimé à la fois dans les CE, où il joue un rôle dans la vasodilatation [66], dans les CML, participant aux phénomènes de contraction, migration et prolifération [7, 67–70], ainsi que dans les fibroblastes adventitiels pulmonaires, où il est impliqué dans les processus de remodelage [10].

Dans les CE, TRPV4 interagit avec la NO synthase endothéliale (eNOS) favorisant la production de NO, conduisant à la vasorelaxation [66]. Son activation permettrait de stimuler des voies dépendantes du NO et des canaux  $BK_{Ca}$  dans le système vasculaire rétinale chez les rats favorisant la vasodilatation de ces vaisseaux [71]. TRPV4 est aussi exprimé dans les CE des artérioles cremaster de rat où il favorise la vasodilatation des artérioles dépendant de l'endothélium via les canaux  $K_{Ca}$ . Cette dilatation en réponse au GSK est augmentée pour des

artérioles conditionnées aux forces de cisaillement sans modification de l'expression de TRPV4. Une voie de signalisation impliquant les récepteurs muscariniques M3 à l'ACh a été identifiée comme interagissant avec le canal TRPV4 et menant à son ouverture [61]. En réponse à des forces mécaniques, TRPV4 permet également le contrôle de la localisation et l'activation de VEGFR2 dans les CE en induisant la translocation du facteur de transcription YAP dans le noyau via la voie des Rho-Kinases, jouant ainsi un rôle dans la régulation de l'angiogenèse [72].

Au niveau des CML, l'expression de TRPV4 participe au maintien de l'homéostasie calcique et du tonus myogénique [73]. Son activation va favoriser la contraction des CML, mais aussi leur migration et prolifération [7, 69, 70, 74].

#### 4.3.3. TRPV4 dans l'HTP

TRPV4 a été particulièrement étudié au niveau des artères pulmonaires à la fois dans les CE, les CML et les fibroblastes afin de comprendre les effets de l'hypoxie et de l'étirement pouvant mener à l'HTP.

Lors de l'HTP, une dysfonction endothéliale va entraîner la diminution de la production de NO, essentielle à la régulation du tonus myogénique physiologique. Une étude suggère l'implication de TRPV4 dans la dysfonction endothéliale induite par l'AngII dans des artères mésentériques de souris [65]. Ainsi, la voie de relaxation impliquant l'entrée de calcium via TRPV4 dans les CE est dérégulée en condition pathologique. En effet, dans un modèle de rats SUGEN soumis à l'hypoxie, l'augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriales entraîne une augmentation de l'influx calcique via TRPV4 dans les CE d'artères pulmonaires favorisant les réponses migratoires et prolifératives conduisant à la formation de lésions plexiformes [75].

L'expression de protéines TRPV4 a été montrée dans des artères intrapulmonaires (AIP) de rat dé-endothélialisées ainsi que leur activité fonctionnelle en réponse au 4 $\alpha$ -PDD. Ainsi, les CMLAP expriment des canaux TRPV4 fonctionnels, et ceci quel que soit le phénotype des cellules (contractiles ou prolifératives). Dans ces cellules, les canaux TRPV4 sont impliqués dans leur migration et dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et de tubuline [74]. La 5-HT exerce des effets vasoconstricteurs et mitogènes dans les artères pulmonaires dépendant de la concentration en calcium intracellulaire. Elle induit une hyperréactivité et une prolifération des CML jouant un rôle majeur dans le remodelage vasculaire et l'augmentation des résistances vasculaires qui caractérisent l'HTP. La 5-HT active un influx calcique via un métabolite de l'acide arachidonique (5',6'-EET). Cette réponse calcique à la sérotonine est biphasique et présente une phase transitoire et une phase maintenue. La 5-HT agit sur la voie du cytochrome P450 époxygénase dans les CMLAP. L'expression du cytochrome P450 et la production d'EET sont toutes les deux augmentées après une exposition à l'hypoxie chronique. Il a été montré que l'influx calcique maintenu pouvait être médié par TRPV4 et une implication de courants TRPV4-like a été mise en évidence dans la potentialisation de la prolifération des CMLAP induite par la 5-HT [7]. Dans une étude de l'hypoxie *in vitro*, une augmentation des réponses calciques TRPV4 en réponse à 4  $\alpha$ -PDD a été montrée dans des CMLAP cultivées en hypoxie bien qu'aucune différence n'ait été observée au niveau de l'expression des ARNm et protéines TRPV4 par rapport aux cellules cultivées en normoxie [18]. D'autres études montrent que l'hypoxie chronique induit une plus forte expression de TRPV4 dans des cultures primaires de CMLAP issues de rats hypoxiques chroniques, en plus de l'augmentation des réponses calciques associées [68, 73]. Le tonus myogénique dans les micro-vaisseaux pulmonaires est également augmenté en réponse à l'hypoxie, et la délétion du gène TRPV4 réduit l'HTP induite par l'hypoxie chronique [73].

En corrélation avec ces résultats, le remodelage adventitial associé à l'HTP est diminué chez les souris *trpv4<sup>-/-</sup>* hypoxiques chroniques et monocrotaline. En effet, TRPV4 est aussi exprimé dans les fibroblastes artériels adventitiels pulmonaires (PAF). Son activation stimule la prolifération des fibroblastes ainsi que leur migration. De plus, TRPV4 potentialise le dépôt de matrice extracellulaire par les fibroblastes pouvant ainsi moduler la rigidité de la matrice et contribuer au remodelage adventitial ayant lieu dans l'HTP [10].

#### 4.3.4. Interaction avec le cytosquelette

TRPV4 est capable d'interagir avec le cytosquelette pouvant modifier son activité et agir sur les adhésions cellulaires. Il a notamment été identifié comme un régulateur des microtubules et de l'actine pouvant former un complexe supramoléculaire. Celui-ci contient des protéines du cytosquelette et des kinases régulatrices et permet d'intégrer les signaux de différents messagers intracellulaires et cascades de signalisation en interagissant avec l'actine et la tubuline via son domaine Cter. Par exemple, MAP7 (*microtubule-associated protein 7*) qui interagit aussi avec les microfilaments d'actine favorise la présence de TRPV4 à la membrane plasmique et augmente ainsi son activité. De plus, l'interaction entre TRPV4 et la F-actine est essentielle pour l'activation du canal en réponse à un gonflement cellulaire et la tubuline est en compétition avec l'actine pour lier la queue C-ter de TRPV4 [62]. Une stabilisation des microtubules réduisant les influx calciques médié par TRPV4 indique que la dynamique du cytosquelette est un régulateur important de l'activité du canal [76]. Une autre étude a montré que l'influx calcique des canaux TRPV4 régule l'interaction entre la protéine de liaison à l'actine Flightless-1 (Fli1) et la Myosine non musculaire IIA (NMMIIA) dans les fibroblastes de souris permettant la formation d'extensions cellulaires et le remodelage du collagène. Ces flux localisés de  $Ca^{2+}$  sont concentrés au niveau des extensions des cellules en croissance qui sont enrichies en canaux TRPV4 [77]. De plus, un stress mécanique local appliqué aux intégrines  $\beta 1$  peut induire une réponse calcique quasiment instantanée médiée par TRPV4 au niveau des adhésions focales à la surface membranaire [78] suggérant un rôle important de TRPV4 dans l'intégration des signaux mécaniques au niveau de la matrice vers le cytosquelette, permettant de réguler l'adhésion et la migration des cellules.

#### 4.3.5. Mécanismes d'adressage à la membrane

TRPV4, pour être exprimé et fonctionnel à la membrane plasmique, doit y être adressé. La régulation du nombre de canaux présents à la membrane implique différents acteurs et mécanismes qui favorisent l'expression membranaire de TRPV4 ou, au contraire, sa rétention dans le RE ou son endocytose.

OS-9 est une protéine associée au réticulum endoplasmique qui se lie à TRPV4 et interagit avec d'autres TRP. L'interaction d'OS-9 avec TRPV4 se fait au niveau du RE et la déplétion d'OS-9 facilite le relargage de TRPV4 du RE. OS-9 s'associe majoritairement avec la forme monomérique de TRPV4 et prévient sa polyubiquitination au niveau du RE diminuant l'abondance de TRPV4 à la membrane plasmique [79].

Les PACSIN sont une famille de protéines qui consiste en 3 membres impliqués dans le trafic vésiculaire synaptique des membranes et la régulation des processus d'endocytose médiés par la dynamine. Les 3 PACSIN se lient à TRPV4 mais seule la PACIN 3 inhibe l'endocytose de TRPV4 [80].

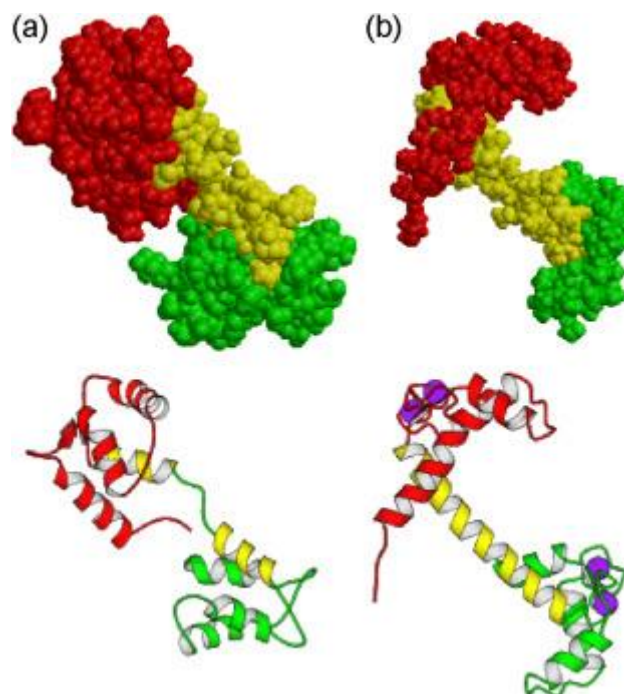
Les forces de cisaillement sensibilisent l'activation de TRPV4 par son agoniste GSK1016790A en augmentant la densité de canaux exprimés à la surface membranaire. L'importance de la Tyrosine 110 a été mise en évidence dans cette activation de TRPV4 aux forces de cisaillement ainsi qu'à son trafic et adressage. Les forces de cisaillement stimulent alors l'exocytose de

TRPV4 via un mécanisme dépendant de la voie de la clathrine en activant la eNOS via les voies PKA et Akt. Ainsi, le NO joue un rôle de régulation dans l'exocytose en nitrosylant la dynamine pour augmenter son assemblage et donc l'exocytose et l'endocytose dépendantes de la dynamine [60].

La réponse TRPV4 au GSK1016790A induit une réduction de la densité de ces canaux à la membrane plasmique. Il existe deux modes de trafic membranaire pour les canaux TRPV4 qui sont la fusion partielle et la fusion complète. Celles-ci augmentent et diminuent respectivement en réponse au pic de  $Ca^{2+}$  intracellulaire induit par l'activation des canaux par le GSK à la membrane. D'autre part, une endocytose des canaux TRPV4 a lieu suite à une stimulation au GSK. Ce processus est contrôlé par les voies PKC/PI3K et RhoA qui induisent l'internalisation des TRPV4 [81]. Le  $\beta$ -arrestine recrutée par l'activation des récepteurs à l'AngII est aussi capable de diminuer l'expression des canaux TRPV4 à la surface de la cellule et la réponse calcique médiée par TRPV4 en favorisant l'internalisation du canal comme il a été montré dans les cellules musculaires lisses vasculaires et dans les systèmes de surexpression cellulaires [82].

#### 4.3.6. Modulation par le $Ca^{2+}$ et interaction avec la calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine capable de se lier au  $Ca^{2+}$  et convertir un signal calcique en modifications biochimiques et cellulaires. La CaM possède un motif structural connu sous le nom de « *E-F hand* » composé d'une hélice en Nter (l'hélice E) et en Cter (l'hélice F) et d'une boucle centrale permettant la liaison au  $Ca^{2+}$ . La CaM est composée de 4 domaines « *E-F hand* » [83]. C'est donc un senseur calcique dont la conformation va être modifiée lors de sa liaison au  $Ca^{2+}$  [Figure 14][84]. La CaM est très conservée et est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes participant aux voies de signalisation régulant de nombreux processus physiologiques comme la croissance, la prolifération et la régulation de nombreuses protéines dont les canaux ioniques [83, 85].



**Figure 14 : Structure de la calmoduline (CaM).**

Représentation schématique de la calmoduline (a) libre et (b) liée au  $Ca^{2+}$ . Les structures sont présentées en modèles « cartoon » et « space-filling ». En rouge : domaine Nter, en vert : domaine Cter, en jaune : linker central, en violet : ions  $Ca^{2+}$ . D'après Yang et al. 2004 [84].



En effet, des domaines de liaison à la CaM sont présents sur les TRP notamment des TRPC, mais aussi des TRPV et TRPM. Le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  est d'ailleurs impliqué dans la désensibilisation de TRPV1 et dans la régulation de l'activation de TRPV4 [85]. Au niveau vasculaire, il a été montré que la production de NO en réponse aux forces de cisaillement est dépendante du  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  dans les CE [86].

L'interaction entre TRPV4 et la CaM liée au  $\text{Ca}^{2+}$  induit une sensibilisation du canal via le récepteur à l' $\text{IP}_3$  qui sensibilise TRPV4 aux stimuli mécaniques et osmotiques mais aussi aux EET [87, 88]. En effet, la délétion du site de fixation à la CaM de TRPV4 en Cter empêche cette sensibilisation [89].

La CaM peut aussi se fixer au niveau du domaine ankyrine où elle entre en compétition avec l'ATP modulant ainsi l'activité de TRPV4 selon la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [90].

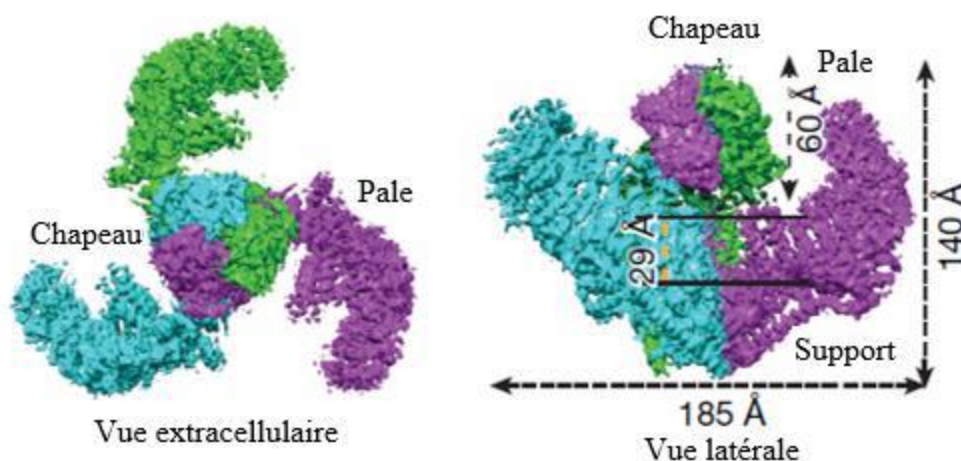
Mais il existe également un mécanisme de régulation avec un effet inhibiteur du  $\text{Ca}^{2+}$  sur TRPV4. En revanche ce mécanisme semble indépendant de la CaM [89]. En effet, l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inhibe l'activation de TRPV4 en réponse au  $4\alpha\text{-PDD}$  avec un IC50 de 406 nM [91].

Ainsi le  $\text{Ca}^{2+}$  peut moduler l'activité du canal TRPV4 selon sa concentration. Il peut, d'une part, le sensibiliser aux stimuli mécaniques et agonistes, notamment via sa liaison à la CaM qui interagit avec des domaines intracellulaires de TRPV4. D'autre part, à forte concentration, le  $\text{Ca}^{2+}$  peut inhiber l'activation du canal, un mécanisme permettant de réguler l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules.

## 4.4. Piezo1

### 4.4.1. Description

Il existe deux types de canaux Piezo codés par les gènes *Piezo1* et *Piezo2* (ou précédemment connus sous les noms *Fam38A* et *Fam38B* respectivement). Décrit pour la première fois dans des neurones par Coste *et al.* [92], Piezo1 est un canal mécanosensible qui s'organise en un complexe homotrimérique [Figure 15] dont les monomères de 286 kDa composés de 38 domaines transmembranaires forment une hélice à 3 pales entourant le pore du canal [93, 94]. Piezo1 est perméable aux cations (avec une perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  supérieure à celle du sodium ou du césium) et possède une conductance unitaire d'environ 20 à 30 pS [92, 95].



**Figure 15 : Structure de Piezo1.**

Vues extracellulaire et latérale de la reconstruction de Piezo1 par cryo-électromicroscopie à une résolution de 3.97 Å d'après Zhao *et al.* 2018 [93]. Les couleurs représentent les différentes sous-unités.

Piezo1 peut être activé par différents stimuli comme les forces de cisaillement, la tension membranaire, l'osmolarité ou encore les ultrasons [25] mais aussi par des agonistes sélectifs comme Yoda1 et Jedi1/2.

#### 4.4.2. Piezo1 au niveau vasculaire pulmonaire

Piezo1 est exprimé au niveau vasculaire et joue un rôle majeur dans le développement vasculaire *in utero*. En effet, sa délétion n'est pas viable et induit une mort embryonnaire chez les souris dont le remodelage vasculaire en réponse au flux sanguin a été perturbé [96].

Au niveau vasculaire pulmonaire, Piezo1 est exprimé à la fois dans les CE et dans les CML. Dans les CE, Piezo1 contribue à la relaxation des artères intrapulmonaires de souris [95] grâce à la production de NO par la eNOS [97]. Dans les CML, il participe à la contraction et la prolifération des cellules via l'activation d'un influx calcique (provenant du milieu extracellulaire et des stocks intracellulaires) [98]. Son expression est d'ailleurs augmentée dans les CML de patients souffrant d'HTP idiopathique, induisant une augmentation de la prolifération cellulaire [98].

### 4.5. Revue « Implication des canaux mécanosensibles Piezo1 et TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire »

La mini-revue présentée ci-dessous et publiée dans la Revue des Maladies Respiratoires en 2022, est une revue de vulgarisation décrivant l'intérêt de l'étude des canaux mécanosensibles Piezo1 et TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire et leur implication au niveau des CE, CML et fibroblastes des artères pulmonaires.



Disponible en ligne sur

**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



RECHERCHE EN PNEUMOLOGIE

## Implication des canaux mécanosensibles Piezo1 et TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire



*Involvement of the Piezo1 and TRPV4 stretch-activated channels in pulmonary hypertension*

S. Barbeau<sup>a,\*,b</sup>, T. Porto Ribeiro<sup>a,b</sup>, G. Gilbert<sup>c</sup>,  
G. Cardouat<sup>a,b</sup>, I. Baudrimont<sup>a,b</sup>, V. Freund-Michel<sup>a,b</sup>,  
C. Guibert<sup>a,b</sup>, R. Marthan<sup>a,b</sup>, P. Vacher<sup>a,b</sup>,  
J.-F. Quignard<sup>a,b,1</sup>, T. Ducret<sup>a,b,1</sup>

<sup>a</sup> Université de Bordeaux, centre de recherche cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, 33600 Pessac, France

<sup>b</sup> Inserm, centre de recherche cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, 33600 Pessac, France

<sup>c</sup> ORPHY, UFR sciences et techniques, université de Brest, EA 4324, 29238 Brest, France

Reçu le 5 janvier 2022 ; accepté le 5 janvier 2022

Disponible sur Internet le 10 février 2022

### MOTS CLÉS

Hypertension pulmonaire ;  
Canaux mécanosensibles ;  
Hypoxie ;  
Calcium

**Résumé** L'hypertension pulmonaire est une pathologie de la circulation pulmonaire qui se traduit par un remodelage et une hyperréactivité des artères pulmonaires. La balance, vasodilatation/vasoconstriction est modifiée en faveur d'une constriction via, entre autres, la prolifération de cellules musculaires lisses et le développement d'une dysfonction endothéliale. De plus, les artères pulmonaires subissent une modification des contraintes mécaniques conduisant à une modification de l'activation de canaux mécanosensibles tels que Piezo1 et TRPV4. Ces canaux ioniques sont sensibles à l'étirement et leur activation peut induire de nombreuses réponses physiologiques cellulaires jouant un rôle important dans le développement et le maintien de la pathologie.

© 2022 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [solene.barbeau@u-bordeaux.fr](mailto:solene.barbeau@u-bordeaux.fr) (S. Barbeau).

<sup>1</sup> Co-derniers auteurs.



**KEYWORDS**

Pulmonary hypertension;  
Stretch-activated channels;  
Hypoxia;  
Calcium

**Summary** Pulmonary hypertension is a pulmonary circulation pathology characterized by remodelling and hyperreactivity of the pulmonary arteries. Vasodilatation/vasoconstriction balance is modified in favour of constriction via, among other things, the proliferation of smooth muscle cells and the development of endothelial dysfunction. In addition, the pulmonary arteries undergo modification of mechanical forces, inducing modified activation of stretch-activated channels (SAC) such as Piezo1 and TRPV4. These ionic channels are sensitive to stretch and their activation can induce various cellular physiological responses, which strongly contribute to development and continuation of the pathology.

© 2022 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire (HTP) se définit par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au-delà de 25 mmHg au repos lors d'un cathétérisme cardiaque droit. Cette augmentation chronique des pressions pulmonaires conduit à une hypertrophie ventriculaire droite qui peut mener à une insuffisance cardiaque et au décès des patients. On distingue 5 groupes d'HTP selon leurs caractéristiques hémodynamiques et cliniques et leur étiologie : l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (groupe 1) qui regroupe entre autres les formes idiopathiques, héréditaires, induites par certains médicaments ou certaines pathologies comme les connectivites ou l'hypertension portale ; l'HTP due à une pathologie cardiaque gauche (groupe 2) ; l'HTP due à une pathologie pulmonaire et/ou à l'hypoxie (groupe 3) ; l'HTP associée à des obstructions pulmonaires (groupe 4) dont les HTP thromboemboliques chroniques, et enfin, l'HTP avec des mécanismes multifactoriels incertains (groupe 5) [1] (Tableau 1).

Parmi ces différents groupes d'HTP, l'HTAP (également appelée HTP précapillaire) est une maladie multifactorielle de la circulation pulmonaire qui se définit par une PAPm au repos strictement supérieure à 20 mmHg en présence d'une pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO)  $\leq$  15 mmHg et d'une résistance vasculaire pulmonaire supérieure à 3 unités Wood [1]. Au niveau physiopathologique, l'HTAP se traduit par un remodelage et une hyperactivité des artères pulmonaires de petit diamètre inférieur à 500  $\mu$ m [2]. En effet, un épaississement de la media, constituée principalement de cellules musculaires lisses (CML) vasculaires impliquées dans la vasoconstriction, est observé, ainsi qu'un remodelage adventitial avec la prolifération et la migration de fibroblastes, et également une prolifération de cellules endothéliales (CE) conduisant à la formation de lésions vasculaires de type néointimales et/ou complexes comme les lésions pléxiformes et singulières appelées SiMFIS (pour *singular millimetric fibrovascular lesions*) [2]. Même si la contribution de ces lésions vasculaires complexes reste encore mystérieuse, elles sont souvent absentes dans les différents modèles animaux d'HTP. Néanmoins, des lésions vasculaires proches peuvent se développer dans des modèles animaux d'HTP sévères qui combinent de l'hypoxie chronique à une injection de monocrotaline [3], ou de l'hypoxie chronique couplée à une injection d'un bloqueur du récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (modèle

de rat Sugén [SU5416] + hypoxie) [4]. De plus, une dysfonction endothéliale est également observée au niveau de l'intima comme le reflètent les altérations de la balance vasodilatation/vasoconstriction qui favorisent la constriction. Enfin, les artères pulmonaires subissent une modification des contraintes mécaniques dont l'augmentation du tonus myogénique (augmentation de la pression intraluminaire et des tensions pariétales) et la diminution du débit sanguin (diminution des forces de cisaillement) [5–7]. Cette altération des contraintes mécaniques au niveau des artères pulmonaires induit une modification de l'activation de canaux mécanosensibles.

## Canaux mécanosensibles

Les canaux mécanosensibles (ou SAC pour *stretch-activated channels*) sont des canaux ioniques capables de convertir un stimulus mécanique en signal biologique. Ils sont sensibles à différentes forces mécaniques comme des forces de pression, tension ou cisaillement qui induisent des contraintes mécaniques au niveau de la membrane plasmique ou du cytosquelette sous-jacent conduisant à leur ouverture. Au niveau vasculaire pulmonaire, les SAC cationiques non sélectifs sont perméables au calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et leur activation peut induire de nombreuses réponses physiologiques (contraction, prolifération, migration, etc.). Parmi les SAC, Piezo1 et TRPV4 (pour *transient receptor potential vanilloid 4*) sont largement exprimés au niveau des artères pulmonaires, jouant un rôle important dans le maintien du tonus myogénique [8].

## Implication de Piezo1 et TRPV4 dans l'HTP

L'expression et l'activation des SAC ont été principalement étudiées dans un modèle animal d'HTP de groupe 3 (rats hypoxiques chroniques), où les rats sont placés dans un caisson hypobare (50 kPa) pendant 1 à 3 semaines [9]. Les effets de l'hypoxie peuvent également être évalués sur des cultures primaires de CML d'artères pulmonaires (CMLAP) conditionnées in vitro à 1 % de dioxygène ( $\text{O}_2$ ) pendant 48 h à l'aide d'un incubateur tri-gaz [10].

Piezo1 est un canal mécanosensible qui s'organise en un complexe homotrimérique dont les monomères de 286 kDa forment une hélice à 3 pales entourant le pore du canal. Il

**Tableau 1** Classification des hypertensions pulmonaires (d'après [1]).

1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)	1.1 Idiopathique 1.2 Héritable 1.3 Induite par les médicaments et toxiques 1.4 HTAP associée à : 1.4.1 connectivite 1.4.2 infection par le VIH 1.4.3 hypertension portale 1.4.4 cardiopathie congénitale 1.4.5 bilharziose 1.5 HTAP avec réponse aux antagonistes calciques 1.6 HTAP avec signes d'atteinte veineuse / capillaire (maladie veino-occlusive pulmonaire / hémangiomasose capillaire pulmonaire) 1.7 Syndrome de l'HTP persistante du nouveau-né
2. Hypertension pulmonaire due à une cardiopathie gauche	2.1 Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée 2.2 Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection diminuée 2.3 Valvulopathie 2.4 Maladies cardiovasculaires congénitales ou acquises entraînant une HTP post-capillaire
3. Hypertension pulmonaire due à une maladie respiratoire chronique ou à une hypoxie	3.1 Maladie respiratoire obstructive 3.2 Maladie respiratoire restrictive 3.3 Autres maladies pulmonaires mixtes restrictives et obstructives 3.4 Hypoxie sans maladie pulmonaire 3.5 Anomalies du développement pulmonaire
4. Hypertension pulmonaire due à une obstruction des artères pulmonaires	4.1 HTP thrombo-embolique chronique 4.2 Autres causes d'obstruction artérielles pulmonaires
5. Hypertension pulmonaire de mécanisme incertain ou multifactoriel	5.1 Maladies hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndromes myéloprolifératifs 5.2 Maladies systémiques et métaboliques: histiocytose Langerhansienne, maladie de Gaucher, neurofibromatose, sarcoïdose 5.3 Autres : insuffisance rénale avec ou sans hémodialyse, médiastinite fibreuse 5.4 Cardiopathie congénitale complexe

est non sélectif pour le passage de cations (avec une perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  supérieure à celle du sodium ou du césium) et possède une conductance unitaire d'environ 30 pS [11,12].

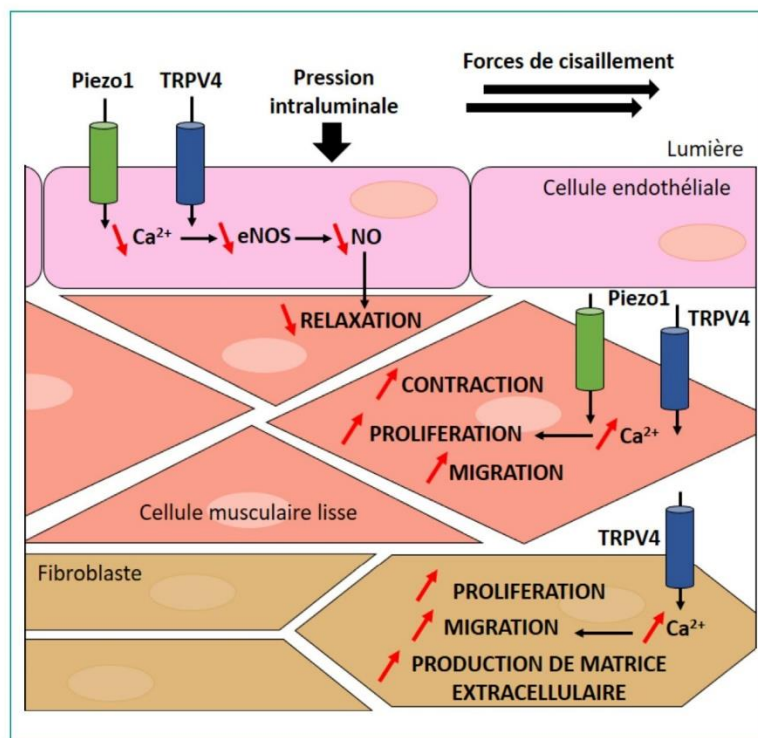
Piezo1 joue un rôle majeur dans le développement vasculaire in utero. Ainsi, sa délétion induit une mort embryonnaire [13]. Il a été montré chez des souris que Piezo1 dans les CE contribue à la relaxation des artères intrapulmonaires [11] via la production de monoxyde d'azote (NO) par la NO synthase endothéliale (eNOS) [11,14]. Il est aussi exprimé dans les CMLAP humaines, et plus particulièrement dans les CMLAP provenant de sujets atteints d'HTP.

TRPV4 est un canal polymodal de la large famille des TRP (pour *transient receptor potential*). C'est un canal cationique non sélectif (avec une perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  très supérieure à celle au sodium [ $\text{Na}^+$ ] à rectification sortante. Sa conductance est d'environ 30 pS pour des potentiels négatifs [15]. Il s'assemble en homotétramères ou hétérotétramères pour former le canal. Un monomère est constitué de 871 acides aminés (98 kDa) et possède 6 domaines

transmembranaires avec des extrémités N- et C-terminales cytosoliques. TRPV4 est sensible au stress mécanique (étirement, forces de cisaillement, osmolarité), mais aussi à la température, au pH ou aux produits du métabolisme de l'acide arachidonique comme les acides époxyeicosatriénoïques (EET) [16].

L'expression de TRPV4, ainsi que les courants ioniques transmembranaires en réponse à un de ses agonistes, sont augmentés dans des CMLAP issues de rats hypoxiques [17]. De plus, lors d'un conditionnement in vitro de CMLAP à l'hypoxie (1 %  $\text{O}_2$  pendant 48 h), les cellules présentent une concentration calcique intracellulaire basale plus élevée, associée à une probabilité d'ouverture des SAC plus importante, ainsi qu'une augmentation de l'amplitude des réponses calciques médiées par TRPV4 [10]. TRPV4 est également exprimé dans les fibroblastes adventitiels pulmonaires, où son activation induit leur prolifération et migration, ainsi que la production de matrice extracellulaire, participant au remodelage adventiciel observé dans l'HTP [18].





**Figure 1.** Schéma de l'implication des canaux mécanosensibles Piezo1 et TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire. Les flèches rouges indiquent les modifications induites au cours du développement de l'hypertension pulmonaire au niveau des cellules endothéliales, musculaires lisses et fibroblastes des artères pulmonaires.

## Conclusion et perspectives

Les SAC, et tout particulièrement TRPV4 et Piezo1, sont donc des acteurs majeurs dans le contrôle et la régulation du tonus vasculaire pulmonaire. Au niveau endothélial, les SAC participent à la production de NO impliqué dans la vasodilatation, alors qu'au niveau des CMLAP, leur activation favorise les processus de contraction, prolifération et migration impliqués dans les phénomènes d'hyperréactivité et de remodelage.

L'altération des forces mécaniques au niveau vasculaire pulmonaire lors de l'HTP modifie l'activation des SAC, induisant des réponses cellulaires dérégulées. Ainsi, les SAC sont suractivés au niveau des CMLAP amplifiant la réponse calcique menant à leur contraction, prolifération et migration, tandis que les réponses calciques au niveau des CE sont diminuées, limitant la production de NO, l'ensemble de ces phénomènes induisant une vasoconstriction des artères pulmonaires (Fig. 1).

Une meilleure compréhension des voies de signalisation impliquant les SAC au cours du développement de l'HTP apparaît être essentielle et pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement de l'HTP.

## Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## Références

- [1] Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019;53:1801913.
- [2] Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J* 2019;53:1801887.
- [3] Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, et al. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. *J Vasc Res* 2012;49:33–42.
- [4] Abe K, Toba M, Alzoubi A, et al. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010;121:2747–54.
- [5] Broughton BRS, Walker BR, Resta TC. Chronic hypoxia induces Rho kinase-dependent myogenic tone in small pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L797–806.
- [6] de La Roque ED, Thiaudière E, Ducret T, et al. Effect of chronic hypoxia on pulmonary artery blood velocity in rats as assessed by electrocardiography-triggered three-dimensional time-resolved MR angiography. *NMR Biomed* 2011;24:225–30.
- [7] Wu D, Birukov K. Endothelial cell mechano-metabolomic Coupling to disease states in the lung microvasculature. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:172.
- [8] Barbeau S, Gilbert G, Cardouat G, et al. Mechanosensitivity in pulmonary circulation: Pathophysiological relevance of stretch-activated channels in pulmonary hypertension. *Biomolecules* 2021;11:1389.
- [9] Ducret T, El Arrouchi J, Courtois A, et al. Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells

- from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell Calcium* 2010;48:251–9.
- [10] Parpaite T, Cardouat G, Mauroux M, et al. Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 2016;468:111–30.
- [11] Lhomme A, Gilbert G, Pele T, et al. Stretch-activated Piezo1 channel in endothelial cells relaxes mouse intrapulmonary Arteries. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019;60:650–8.
- [12] Coste B, Mathur J, Schmidt M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 2010;330:55–60.
- [13] Ranade SS, Qiu Z, Woo S-H, et al. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:10347–52.
- [14] Wang S, Chennupati R, Kaur H, et al. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. *J Clin Invest* 2016;126:4527–36.
- [15] Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, et al. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2000;2:695–702.
- [16] Goldenberg NM, Ravindran K, Kuebler WM. TRPV4: physiological role and therapeutic potential in respiratory diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2015;388:421–36.
- [17] Dahan D, Ducret T, Quignard J-F, et al. Implication of the ryanodine receptor in TRPV4-induced calcium response in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L824–33.
- [18] Cussac L-A, Cardouat G, Tiruchellvam Pillai N, et al. TRPV4 channel mediates adventitial fibroblast activation and adventitial remodeling in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2020;318:L135–46.

## 5. Contraintes environnementales

Différents facteurs sont impliqués dans le développement de l'HTP. D'une part, l'**hypoxie**, qui lorsqu'elle est chronique, peut mener à la pathologie, et qui sert donc de modèle à l'étude de l'HTP *in vivo* et *in vitro*. Et d'autre part, les **contraintes mécaniques** associées à l'augmentation des pressions subies par les cellules au sein des vaisseaux pulmonaires jouant un rôle important dans la dérégulation de la signalisation calcique.

**TRPV4 est un canal polymodal** pouvant être sensible à différents facteurs physiques. De précédentes études ont permis de montrer son **implication dans l'HTP**, sa **modulation par l'hypoxie**, ainsi que sa **mécanosensibilité**. Ainsi, il semblerait que la variation de la concentration en O<sub>2</sub> et les stress mécaniques soient des paramètres environnementaux importants dans l'activation et la régulation de SAC comme TRPV4.

### 5.1. Hypoxie

#### 5.1.1. Modèle d'hypoxie

L'hypoxie se définit par une diminution du niveau de dioxygène (O<sub>2</sub>) par rapport à un niveau dit « normoxique ». La diffusion d'oxygène aux cellules est nécessaire à leur survie et croissance, et sa distribution (via diffusion passive ou système circulatoire) est un élément crucial au sein de la vie sur Terre.

Au niveau atmosphérique, l'air sec contient 78.09 % de diazote (N<sub>2</sub>), 20.95 % de dioxygène et 0.039 % de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en plus d'autres gaz (< 1 %). On parle alors généralement de normoxie pour une concentration en O<sub>2</sub> de 21 %. Le terme « normoxie » se réfère alors aux conditions atmosphériques de pressions partielles en O<sub>2</sub> (PPO<sub>2</sub>) utilisées pour la culture cellulaire standard, et non aux réelles PPO<sub>2</sub> dans le microenvironnement physiologique des cellules au sein d'un tissu, où l'on parle de « physioxie ». La physioxie est propre à chaque tissu et les PPO<sub>2</sub> sont souvent bien plus faibles que les 0.21 atm utilisées en culture. Par la suite, les termes de « normoxie » et d'« hypoxie » seront donc utilisés pour différencier les conditions de culture à 21 % d'O<sub>2</sub> et 1 % ou 10 % d'O<sub>2</sub>, respectivement, dans les incubateurs. Les cellules peuvent ainsi être cultivées en hypoxie chronique à différents niveaux (1 % et 10 % O<sub>2</sub> ici) pendant 48 h, un temps qui a été défini pour induire un niveau de calcium basal plus élevé et des réponses calciques plus importantes à l'hypoosmolarité dans des CMLAP en culture [18]. Dans ce cas, certains types d'incubateurs permettent l'injection de N<sub>2</sub>, et ainsi le contrôle du niveau d'O<sub>2</sub> en dessous du niveau atmosphérique. À noter que dans un incubateur de culture cellulaire classique, le niveau de CO<sub>2</sub> est maintenu à 5 %, et le pourcentage réel en O<sub>2</sub> est alors inférieur à 21 % (autour de 18.6 %) [99]. Malgré tout, les cellules cultivées dans ces incubateurs seront dites normoxiques (21 % O<sub>2</sub>) correspondant à la concentration atmosphérique en O<sub>2</sub>.

L'hypoxie est donc exprimée en concentration en O<sub>2</sub> dans l'atmosphère mais la diffusion d'O<sub>2</sub> aux cellules passe par des échanges avec le milieu de culture. En effet, l'oxygène doit diffuser à travers le milieu sur une distance bien supérieure à la distance de diffusion dans des tissus de mammifères (< 200 µm) [99]. Ainsi, bien que la concentration en O<sub>2</sub> s'équilibre rapidement dans l'incubateur au niveau gazeux, la faible solubilité de l'O<sub>2</sub> en milieu aqueux retarde l'équilibre en O<sub>2</sub> dans le milieu de culture qui peut nécessiter plus de 3 h pour atteindre la PPO<sub>2</sub> voulue [100].

Pour l'étude de l'hypoxie chronique sur des durées longues, ce délai est acceptable. En revanche, cela pose problème pour l'étude de l'hypoxie aiguë sur des temps courts ne permettant pas aux cellules d'être soumises à une PPO<sub>2</sub> faible instantanément. Ce problème peut être réglé en conditionnant des milieux en hypoxie pour que le milieu soit déjà à une

concentration en O<sub>2</sub> désirée ou en bullant une solution avec du N<sub>2</sub>, ce qui accélère la diffusion et l'équilibration du milieu.

Il existe des modèles animaux qui consistent à placer des animaux dans un caisson hypobare (0.5 atm où la PPO<sub>2</sub> est diminuée de moitié par rapport au milieu atmosphérique soit 0.1 atm équivalent à 10 % O<sub>2</sub>). Ces modèles sont très utilisés pour le rat et la souris. Ils développent une HTP s'approchant de l'hypertension de groupe 3 après un séjour de 3 semaines en hypoxie. On parle alors d'animaux hypoxiques chroniques. Malgré l'augmentation de la pression pulmonaire, de la réactivité vasculaire et du remodelage vasculaire observés dans ce modèle, il ne permet pas la formation de lésions plexiformes chez ces animaux. Ces lésions peuvent se développer dans certains modèles animaux d'HTP sévères combinant l'hypoxie chronique à une injection de monocrotaline, ou l'hypoxie chronique couplée à une injection d'un bloqueur du récepteur du VEGF (modèle de rat Sugén [SU5416] + hypoxie).

### 5.1.2. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

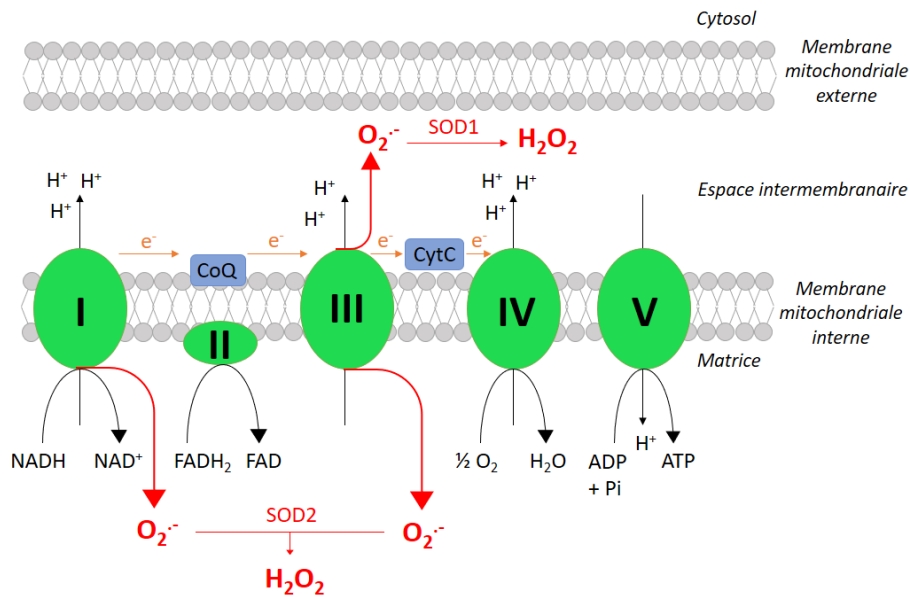
Les ROS (*Reactive Oxygen Species*) sont des espèces réactives de l'oxygène, dont des radicaux libres comme l'anion superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le radical hydroxyl (·OH), et des oxydants non radicaux comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) [101, 102].

En conditions physiologiques, la production de ROS est très régulée, participant à la signalisation cellulaire (en tant que messagers secondaires) et dont l'excès peut provoquer un stress oxydatif. Les sources de ROS peuvent être endogènes (chaîne de transport des électrons mitochondriale [Figure 16], NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydases (NOX)) ou exogènes (provenant de radiations, polluants, xénobiotiques subissant des cycles d'oxydoréduction) [101]. Pour protéger des dommages causés par un stress oxydatif, des antioxydants (endogènes comme par exemple la superoxide dismutase, ou exogènes comme la vitamine C) peuvent prévenir, réduire ou réparer ces dommages induits par les ROS [101]. Ceux-ci peuvent soit directement détoxifier les ROS déjà formés ; on parle alors de « *ROS scavenger* » ; soit inhiber leur formation ou encore réparer les dommages causés. Un stress oxydatif va donc être provoqué par un déséquilibre de la balance ROS / antioxydants en faveur d'une production de ROS ou par une diminution de l'activité des antioxydants. Le stress oxydatif peut mener à une dysfonction cellulaire voire la mort cellulaire [101].

En réponse à l'hypoxie, les cellules voient leur métabolisme modifié, en association avec des variations des niveaux de transcription et d'expression protéique. Parmi ces modifications, l'hypoxie induit notamment la stabilisation de facteurs de transcription HIF (*Hypoxia Inducible Factors*) favorisant la transcription de nombreux gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires. L'expression de protéines impliquées dans la glycolyse va être augmentée alors que les voies dépendantes de l'oxygène vont être réduites via une altération de la structure et donc de l'activité des complexes de la chaîne d'électrons [103].

Les mitochondries sont particulièrement affectées par un manque en dioxygène et la production de ROS via la chaîne respiratoire augmente lors d'une importante diminution de la PPO<sub>2</sub> [102] ; mais cette augmentation doit être régulée afin d'éviter une surproduction conduisant à la mort cellulaire [103]. L'hypoxie altère également la fusion et fission mitochondriales ainsi que la mitophagie et la phosphorylation oxydative via un remodelage de la chaîne de transport des électrons et de l'activité du cycle de Krebs [103]. À noter qu'en condition physiologique, les mitochondries produisent davantage de ROS lorsque la chaîne respiratoire fonctionne à faible régime, que le potentiel de membrane mitochondrial est élevé ou que les flux d'électrons sont altérés au niveau des complexes respiratoires, majoritairement par les complexes I et III [104].

En plus des mitochondries, la production de ROS en réponse à l'hypoxie est également favorisée au niveau des NOX à la membrane plasmique [102].



**Figure 16 : Production de ROS mitochondriales.**

En vert, complexes I à V de la chaîne respiratoire. En rouge, production de ROS (anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )). Abréviations : CoQ = Coenzyme Q, CytC = cytochrome C, FAD = flavine adénine dinucléotide, NADH = nicotinamide adénine dinucléotide, SOD = superoxyde dismutase.

### 5.1.3. Effet de l'hypoxie sur les TRP

Les effets de l'hypoxie aiguë ont été étudiés sur l'activation de TRPV1 en perfusant de l'azote en direct dans le milieu de cellules HEK293T pour atteindre une  $PO_2$  de 3 % [105]. L'hypoxie semble, d'une part, induire l'activation de TRPV1 mais d'autre part, diminuer la réponse TRPV1 à la capsaïcine. L'implication des ROS intra- et extracellulaires a été mise en évidence pour expliquer ces effets opposés. En effet, sous hypoxie, une diminution des ROS extracellulaires ou une augmentation des ROS intracellulaires favorisent l'activation de TRPV1 alors qu'une augmentation des ROS extracellulaires ou une diminution des ROS intracellulaires entraînent une inhibition de TRPV1 [105]. Il a également été décrit que l'application de tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) (un donneur de ROS qui induit la production de ROS intracellulaires) favorise la transmission synaptique excitatrice dans les neurones de la corne dorsale de la colonne vertébrale de rat via l'activation des canaux TRPV1 et TRPA1 [106]. Au niveau d'artères pulmonaires, une signalisation dépendant de l' $H_2O_2$  est impliquée dans la vasoconstriction [107]. Dans des CMLAP, l'ajout d' $H_2O_2$  dans une pipette de patch-clamp en configuration cellule attachée augmente la probabilité d'ouverture des SAC pouvant jouer un rôle dans la contractilité des artères. En parallèle, l' $H_2O_2$  favorise la phosphorylation de eNOS musculaire et donc son activation dépendante du  $Ca^{2+}$  permettant de contrebalancer ces effets contractiles [107].

D'autres études ont été effectuées en condition d'hypoxie chronique, où des cellules, voire des rats, sont exposés à des temps longs d'hypoxie. Des neurones du ganglion spinal soumis à 18-20 h d'hypoxie à 4 % d' $O_2$  présentent des courants entrants plus importants en réponse à la capsaïcine. L'hypoxie active HIF-1 $\alpha$  dans les neurones du ganglion spinal et induit la translocation de PKC $\epsilon$  qui va sensibiliser TRPV1 à son activation par la capsaïcine [108]. Chez



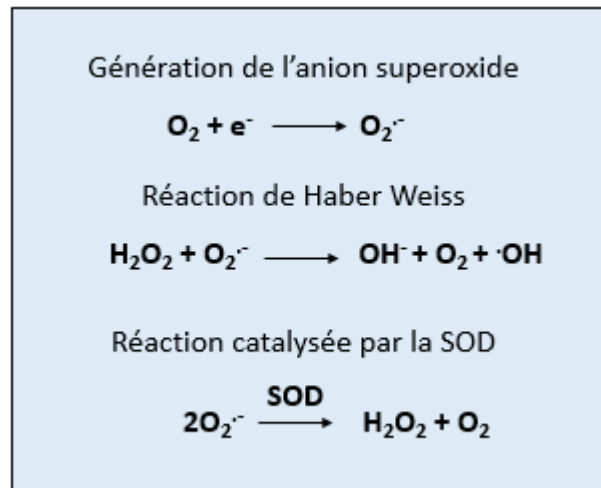
un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire de rat (SU5416/hypoxie), une augmentation de la production de ROS mitochondriales déclenche un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  via TRPV4 jouant ensuite un rôle dans la dérégulation du signal calcique dans les CE d'artères pulmonaires menant à des réponses prolifératives et migratoires exacerbées [75]. Des CMLAP de rats normoxiques, cultivées en condition d'hypoxie chronique (48 h à 1 %  $\text{O}_2$ ), présentent une amplitude des réponses calciques via TRPV4 et des réponses migratoires associées plus élevées suggérant une modification de l'activité des canaux par l'hypoxie chronique [18]. En revanche, les CMLAP ne présentent pas de modification d'expression de TRPV1 et TRPV4, mais TRPV1 est transloqué à la membrane [18]. Ces travaux mettent en évidence l'importance d'étudier l'expression membranaire des canaux ioniques dont l'adressage peut être perturbé, ou qui peuvent être relocalisés en réponse à différents stress comme une stimulation mécanique ou à l'hypoxie.

## 5.2. Hyperoxie

### 5.2.1. Hyperoxie et stress oxydatif

L'hyperoxie se définit par un niveau en  $\text{O}_2$  supérieur à la normoxie. Elle est utilisée en clinique pour la prise en charge de patients souffrant notamment de sévères difficultés cardio-respiratoires jusqu'à 100 % d' $\text{O}_2$  même si les concentrations couramment utilisées varient entre 50 et 60 % d' $\text{O}_2$  [109]. De la même manière que décrit précédemment pour la normoxie et l'hypoxie, le terme « hyperoxie » se réfère aux conditions atmosphériques et non aux PPO<sub>2</sub> au niveau tissulaire. En effet, les cellules cultivées en « normoxie » subissent déjà une hyperoxie par rapport à la « physioxie ». Le terme « hyperoxie » sera donc utilisé pour définir des conditions de culture supérieure à 21 % d' $\text{O}_2$  dans les incubateurs (ici 60 %  $\text{O}_2$ ). Tout comme pour l'hypoxie, en culture cellulaire, l'équilibration du niveau d' $\text{O}_2$  en milieu aqueux est un processus lent qui peut nécessiter plus de 3 h pour atteindre la PPO<sub>2</sub> voulue [100].

En condition d'hyperoxie, la production de ROS par la chaîne de transport des électrons des mitochondries et par les NOX est augmentée, notamment  $\text{O}_2^{\cdot-}$  qui peut ensuite être converti en d'autres ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ) [Figure 17] [109, 110].  $\text{O}_2^{\cdot-}$  peut également réagir avec le NO pour former des péroxynitrites ( $\text{ONOO}^-$ ) qui sont des espèces réactives de l'azote (RNS, *Reactive Nitrogen Species*). Cette réaction, limitant la disponibilité du NO impliqué dans la vasodilatation au niveau vasculaire, va favoriser une vasoconstriction dite hyperoxique notamment au niveau du cœur, des muscles squelettiques et du cerveau [111, 112]. En revanche, aux niveaux pulmonaire et rénal, il n'y a pas de vasoconstriction en réponse à l'hyperoxie. Celle-ci semble peu affecter voire diminuer la pression artérielle pulmonaire mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore complètement décrits [112]. Les ROS jouent aussi un rôle dans la peroxydation des lipides constituant les membranes affectant ainsi leur stabilité et leur fonction pouvant initier des voies inflammatoires ou apoptotiques [111]. En effet, la surproduction de ROS en hyperoxie peut activer les voies de transduction des MAPK, dont les voies ERK 1/2, JNK, p38 et ERK 5 [113]. La voie ERK 1/2 est impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire, et sa phosphorylation en hyperoxie semble avoir un rôle à la fois de promoteur et d'inhibiteur de l'apoptose. L'activation de JNK en hyperoxie par les ROS et NOX1 déclenche des voies de stress et réponses immunitaires en plus de voies pro-apoptotiques. L'effet de l'activation de cette voie va dépendre du stimulus hyperoxique pouvant induire soit un effet apoptotique, soit protecteur en augmentant la survie cellulaire [113]. La durée et l'intensité de l'hyperoxie subie par les cellules va donc déterminer différentes réponses physiologiques pouvant aller de la survie à l'apoptose, et de la contraction de certains vaisseaux à la dilatation d'autres vaisseaux, via de nombreuses voies de signalisation activées par les ROS.



**Figure 17 : Production de ROS.**

*D'après Rajput et al. 2021.*

Afin d'étudier la dysplasie broncho-pulmonaire, une complication pouvant se développer suite à l'assistance respiratoire chez les enfants prématurés, un modèle animal de rats soumis à l'hyperoxie a été développé. Les rats sont placés dans une chambre hyperoxique dans les 24 h après leur naissance et sont exposés à 90 % O<sub>2</sub> pendant 14 jours. Ces rats présentent les caractéristiques de la dysplasie broncho-pulmonaire associée à une hypertension pulmonaire avec une augmentation de la pression systolique ventriculaire droite, une hypertrophie du ventricule droit, un remodelage vasculaire pulmonaire et une plus faible densité vasculaire pulmonaire [114].

### 5.2.2. Effet de l'hyperoxie sur les TRP

Les canaux TRP sont sensibles aux espèces réactives redox et notamment aux ROS. Parmi eux, TRPM2 a été identifié pour être activé par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TRPM7 par l'anoxie via les RNS, ou encore TRPV1, TRPC5 ou TRPA1 via des résidus Cystéines (Cys) [115]. En effet, les résidus Cys peuvent détecter des modifications redox dans l'environnement grâce à leur groupement sulfhydryle sensible aux modifications oxydatives. Concernant TRPV1 et TRPC5, ils sont activés via la modification des résidus Cys impliqués dans l'activation des canaux par le NO et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [115]. TRPA1, quant à lui, est également sensible au niveau d'O<sub>2</sub> via des modifications oxydatives de ses résidus Cys, mais il est aussi affecté par l'hypoxie via l'hydroxylation de résidus Proline. TRPA1 (chez les mammifères) est directement sensible à l'hyperoxie qui induit une augmentation des courants et réponses calciques TRPA1 lors d'une perfusion d'une solution bullée avec de l'O<sub>2</sub> [115].

### 5.3. Stress mécaniques

Au niveau cellulaire, il existe de nombreux stress mécaniques pouvant être perçus par les cellules. La déformation de la membrane plasmique est celle étudiée le plus couramment et peut être exercée par un étirement de la membrane directement via une pipette de patch-clamp, un « *poke* », un choc osmotique, des forces de cisaillement ou encore via des substrats flexibles. Mais les cellules sont également sensibles à la rigidité de la matrice extracellulaire ou de leur support de culture. De la même façon, les cellules peuvent être impactées par leur confluence, que ce soit au niveau des contraintes mécaniques subies (éventuellement forces de compression) ou bien de l'interaction entre les cellules. Au niveau physiologique, les cellules vasculaires sont notamment soumises à un étirement cyclique suivant le cycle cardiaque. Lors de nos travaux, nous nous sommes donc intéressés à deux types de stress mécaniques pouvant activer des SAC : la confluence et l'étirement cellulaires.

#### 5.3.1. La confluence cellulaire

La confluence cellulaire est un paramètre important dans l'étude de modèles cellulaires. En effet, une variation de la confluence peut modifier les contraintes mécaniques perçues par les cellules et les interactions entre les cellules dont la formation de jonctions.

Une étude des propriétés mécaniques d'ostéoblastes et de fibroblastes en microscopie à force atomique a montré que l'augmentation de la confluence induisait une rigidité cellulaire plus importante [116]. En plus de cet effet mécanique, la densité cellulaire peut réguler différentes voies de signalisation. Elle augmente notamment l'expression de la claudine-2 composant les jonctions serrées, ainsi que celle des protéines zonula occludens (ZO-1 et -2) qui sont impliquées dans la régulation de ces jonctions dans des cellules de lignée épithéliale [117]. Les contacts entre cellules permettent également de contrôler leur croissance et prolifération [118].

La modification de la confluence cellulaire peut aussi impacter les réponses calciques dans certains types cellulaires. En effet, une étude précédente a montré un effet de la confluence sur des cellules ostéoblastiques (MC3T3-E1) [119]. Celles-ci présentaient une concentration en calcium intracellulaire basal plus importante dans des cultures à forte densité cellulaire par rapport à des cellules cultivées à faible densité et les réponses calciques à différents agonistes étaient moins importantes à forte densité. L'étude suggère une implication de la densité cellulaire et de la formation des jonctions cellulaires dans la diminution de l'expression de récepteurs à l'IP<sub>3</sub> et du réticulum endoplasmique lisse menant à des réponses calciques atténuées dans les cellules MC3T3-E1 [119]. Mais les contacts entre cellules peuvent aussi jouer sur la sélectivité fonctionnelle de ligands, comme il a été montré dans une étude sur des cellules HEK-293 où certains ligands du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique induisaient une augmentation de l'AMPc intracellulaire sans activer ERK, seulement en condition de culture à forte densité cellulaire [120]. La confluence cellulaire semble d'ailleurs être un paramètre important dans l'étude de la voie de signalisation de l'AMPc. En effet, Belacel-Ouari *et al.* ont également mis en évidence l'influence de la densité cellulaire sur les réponses des récepteurs  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-adrénergiques dans des CML vasculaires de rats. À forte confluence, les réponses à l'isoprénaline impliquaient les récepteurs  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-adrénergiques, alors qu'à faible confluence, seulement les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques étaient impliqués, et l'augmentation de la concentration en AMPc était moins importante par rapport aux cellules cultivées à forte densité [121]. La modification de cette voie de signalisation par la confluence cellulaire peut jouer un rôle important dans différents processus physiologiques comme la contraction, la prolifération ou la migration.

### 5.3.2. Composition membranaire en cholestérol

La composition lipidique des membranes cellulaires varie selon l'environnement cellulaire, pouvant modifier leur rigidité. La confluence cellulaire induit des changements dans les proportions en acide phosphatidique, diacylglycérol et cholestérol membranaires [122]. Le cholestérol est notamment impliqué dans le remodelage de la membrane plasmique dépendant de la confluence dans des cellules endothéliales, induisant la redistribution de cavéoline et la régulation de la formation de jonctions adhérentes [123]. Ainsi, une modification de la quantité de cholestérol membranaire induit une modification de la rigidité pouvant impacter l'activation de canaux mécanosensibles tels que TRPV4. En effet, il a été montré que l'étirement cyclique pouvait également induire une diminution du ratio cholestérol/phosphatidylcholine au niveau membranaire et que le cholestérol régule l'activation de TRPV4 en réponse au GSK, son agoniste, ou à l'étirement [124].

L'hypoxie chronique peut également influencer la composition lipidique membranaire. Une étude a montré que des rats-taupes nus exposés à une hypoxie chronique présentaient un plus faible taux métabolique associé à une altération de l'abondance en cholestérol membranaire (diminution dans le cerveau et le foie et augmentation au niveau du cœur, des muscles et des reins) [125]. De plus, l'hypoxie chronique induit l'oxydation du cholestérol, pouvant altérer la dynamique des rafts lipidiques, comme démontré dans des neurones de l'hippocampe où la translocation du récepteur de la tyrosine kinase  $\beta$  était réduite [126].

Ainsi, la composition lipidique membranaire peut varier selon la confluence cellulaire ou en condition d'hypoxie. La modification de la proportion en cholestérol peut alors jouer un rôle important dans la rigidité membranaire et dans l'organisation des rafts lipidiques. De telles variations peuvent donc impacter différentes voies de signalisation via la modulation de l'activité de protéines mécanosensibles ou en dérégulant l'adressage de protéines notamment via l'altération des rafts lipidiques.

### 5.3.3. Effet de l'étirement

Au niveau vasculaire, les CMLAP sont également soumises à des contraintes mécaniques dues à la pression sanguine et aux tensions pariétales, et subissent donc un étirement. De précédentes expériences réalisées dans le laboratoire (résultats non publiés, cf. Thèse de Thibaud Parpaite [127]) ont montré que l'étirement cyclique dit « pathologique » de CMLAP de souris *in vitro* induisait une augmentation des réponses calciques à un agoniste de TRPV4, une relocalisation du canal à la membrane dans des zones à plus faible confluence, une prolifération des CMLAP ainsi qu'une réorganisation des cellules qui s'alignaient perpendiculairement à l'axe d'étirement. Cet alignement n'avait pas lieu pour des CMLAP issues de souris TRPV4-KO.

L'étirement physiologique des CML ne dépasse normalement pas 10 à 12 % d'étirement par rapport à leur longueur au repos [128]. Les niveaux physiologiques de tonus myogénique et pression luminale dans les artères pulmonaires sont très faibles et induisent une inhibition de la prolifération, une régulation du tonus et permettent un maintien du phénotype contractile normal des CML vasculaires. Lors d'une vasoconstriction maintenue, par exemple due à une hypoxie alvéolaire, l'étirement des CML augmente en raison d'une constriction des vaisseaux. On parle d'un étirement supraphysiologique lorsqu'il atteint 20 %. Des CMLAP soumises à un étirement cyclique supraphysiologique prolifèrent en réponse à l' $\text{ONOO}^-$  dérivé de NOS-1 [128].

La culture de cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines sous étirement cyclique uniaxial à 20 % d'étirement à une fréquence de 1 Hz induit des changements morphologiques après 15 min d'étirement. Les cellules commencent à s'orienter perpendiculairement à l'axe

d'étirement au bout de 30 min et le pourcentage de cellules orientées augmente avec le temps atteignant plus de 90 % des cellules perpendiculaires à l'axe d'étirement après 2 h [19]. Cet alignement s'accompagne d'une réorientation des fibres de stress. En revanche, il n'y a pas d'alignement si l'étirement a lieu en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ou en présence de  $\text{Gd}^{3+}$  suggérant une implication des SAC et de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induite dans l'alignement en réponse à l'étirement [127].



## **OBJECTIFS DE LA THÈSE**

TRPV4 est un canal cationique polymodal qui participe à de nombreux processus physiopathologiques notamment au niveau de la circulation pulmonaire où il est impliqué dans l'hypertension pulmonaire. De précédents résultats montrent que les CMLAP de rats présentent une homéostasie calcique dérégulée lors de l'hypertension pulmonaire et tout particulièrement en condition d'hypoxie chronique, menant à leur prolifération et à leur migration [68, 74]. Ces réponses sont dues en partie à une modification de l'activité de TRPV4. En effet, de précédentes études ont montré une surexpression de TRPV4 dans des artères intrapulmonaires de rats hypoxiques chroniques associée à une augmentation de l'amplitude des courants enregistrés en réponse à un agoniste de TRPV4 dans des CMLAP de rats hypoxiques [68]. De plus, un conditionnement de CMLAP en hypoxie à 1 % d'O<sub>2</sub> pendant 48 h entraîne une augmentation des réponses calciques en réponse à une stimulation avec une solution hypotonique ou à un agoniste de TRPV4, et une augmentation de la probabilité d'ouverture de canaux en réponse à un étirement de la membrane [18].

Ainsi, l'hypoxie semble capable de moduler les réponses médiées par TRPV4. Cependant, les types de modifications qui s'appliquent en réponse à l'hypoxie restent encore méconnus (expression et/ou activité), à savoir s'il y a notamment des modifications de conformation du canal, de conductance, d'interaction avec des protéines partenaires ou bien une relocalisation de celui-ci. Grâce à l'utilisation de sondes adaptées, la technique de BRET permet d'étudier ces différents paramètres. Dans le cadre d'un projet en collaboration avec l'équipe du Dr Yann Percherancier du laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système (Université de Bordeaux), différentes sondes BRET ont été produites pour répondre à ces questions (les sondes BRET seront détaillées dans la partie « Constructions BRET »). Parmi celles-ci, des sondes intermoléculaires pour évaluer des interactions protéiques, des sondes de première génération intramoléculaires associées à TRPV4 permettant d'étudier les changements conformationnels et enfin des sondes de seconde génération pour évaluer le passage d'espèces ioniques directement dans le nanoenvironnement du canal TRPV4 ont été utilisées. Un des objectifs de ce projet était d'utiliser la technique de BRET afin d'étudier l'effet de différents facteurs physiques comme la température, les radiofréquences, l'étirement et l'hypoxie sur différents canaux ioniques. Lors de ma thèse, je me suis donc intéressée aux effets de l'hypoxie sur TRPV4. Or, TRPV4 étant un canal mécanosensible, celui-ci peut également être affecté par d'autres paramètres physiques comme la densité cellulaire pouvant modifier la rigidité membranaire [116] et ainsi moduler l'activité du canal. Dans ce contexte, l'impact de la confluence cellulaire sur les réponses TRPV4 en hypoxie a été évalué [Figure 18].

Le premier objectif de ma thèse était donc de vérifier la fonctionnalité des sondes BRET et de caractériser l'activité du canal TRPV4 en présence de ces sondes par rapport au canal contrôle. Pour cela, la caractérisation fonctionnelle de TRPV4 exprimé dans des HEK293T a été effectuée pour les différentes constructions grâce à la technique de patch-clamp en configuration « cellule attachée » où différents paramètres (amplitude de courant unitaire, conductance unitaire, probabilité d'ouverture, occurrence des courants) ont été analysés. Ces résultats ne sont pas présentés dans une unique partie mais sont inclus aux autres résultats de ma thèse (figures supplémentaires des articles notamment).

Le deuxième objectif de ma thèse était d'étudier les effets de l'hypoxie sur TRPV4 selon la confluence cellulaire. Pour répondre à ces questions, les courants et les réponses calciques médiés par TRPV4 ont été mesurés dans des cellules cultivées en conditions de normoxie ou d'hypoxie chronique (1 % O<sub>2</sub> pendant 48 h) ensemencées soit à faible densité (non confluentes,

1x10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>), soit à forte densité (confluentes, 3x10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup>). Pour compléter ces premiers résultats, le but était d'élucider la manière dont TRPV4 est affecté par la confluence et l'hypoxie. Afin d'évaluer le passage des ions Ca<sup>2+</sup> au niveau du canal, l'interaction avec différents partenaires, et une éventuelle relocalisation, des sondes BRET intramoléculaires et intermoléculaires (décrites dans la partie « Constructions BRET ») ont été utilisées. La technique de BRET a également été complétée par d'autres approches afin de mettre en évidence la relocalisation du canal en condition d'hypoxie en imagerie confocale et par biotinylation de protéines de surface. Différents niveaux d'hypoxie chronique ont été étudiés grâce aux sondes BRET intramoléculaires et intermoléculaires, notamment à 1 % O<sub>2</sub> et à 10 % O<sub>2</sub> pendant 48 h correspondant à une hypoxie chronique intermédiaire.

Le troisième objectif de ma thèse était d'étudier l'activation de TRPV4 en réponse à l'hypoxie aiguë. La technique de BRET permettant des mesures directes en temps réel, l'effet de l'hypoxie aiguë sur TRPV4 a été évalué en utilisant ces mêmes sondes BRET. En effet, bien que les effets de l'hypoxie chronique sur TRPV4 aient été très étudiés, ceux de l'hypoxie aiguë sur ce canal sont très peu décrits dans la littérature. Or, bien que l'hypoxie chronique, étant notamment impliquée dans l'HTP, joue un rôle dans la modulation de TRPV4, l'hypoxie aiguë, qui peut avoir lieu ponctuellement au niveau des vaisseaux lors d'une hypoxie alvéolaire localisée, pourrait également moduler l'activité de TRPV4. Son activation pourrait ainsi participer au mécanisme de vasoconstriction hypoxique. Les expériences ont donc été réalisées avec un spectrophotomètre qui permet la mesure du BRET directement dans les incubateurs en normoxie et en hypoxie, où le niveau d'O<sub>2</sub> peut être ajusté au cours du temps.

Enfin, afin de mettre en évidence la modulation de TRPV4 par la concentration en O<sub>2</sub>, le quatrième objectif de ma thèse était d'étudier l'activation du canal en réponse à l'hyperoxie. Différentes sondes BRET ont été utilisées, et les cellules ont été cultivées en hyperoxie chronique (60 % O<sub>2</sub>).

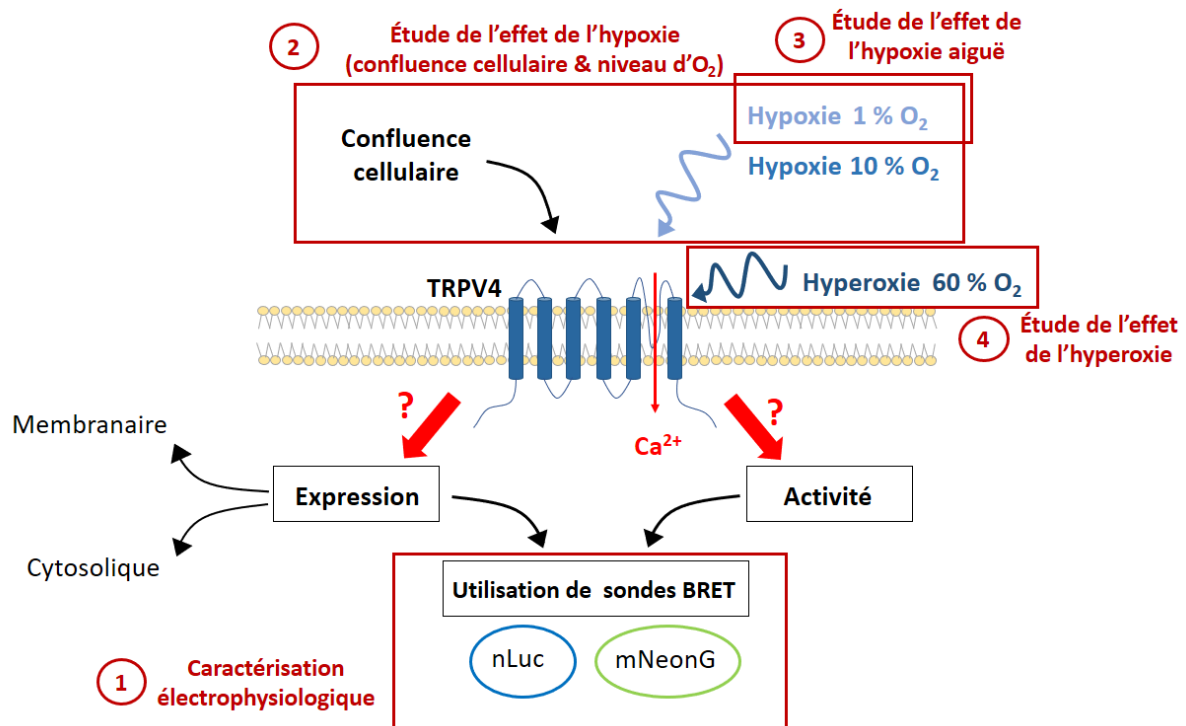


Figure 18 : Schéma récapitulatif des objectifs de la thèse.

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

# 1. Cellules utilisées

## 1.1. HEK293T

Des cellules de lignées HEK293T (ATCC #CRL 11554) ont été utilisées. Ce sont des cellules épithéliales embryonnaires issues de rein fœtal humain. L'ensemencement pour les expériences a été réalisé soit à  $1 \times 10^4$  cellules /  $\text{cm}^2$  correspondant à une « faible » densité, soit à  $3 \times 10^5$  cellules /  $\text{cm}^2$  correspondant à une « forte » densité cellulaire.

## 1.2. Cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires humaines

Les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires humaines (hCMLAP) ont été obtenues par explants sur des artères issues de lobectomies (CMLAP intrapulmonaires) ou de greffons pulmonaires de patients (CMLAP extrapulmonaires) grâce à une collaboration avec le CHU de Bordeaux. Ces cellules ont été utilisées jusqu'au 6<sup>e</sup> passage.

## 1.3. Culture des cellules

Les cellules en culture ont été cultivées dans un incubateur humide à 37°C, 21 % O<sub>2</sub>, 74 % N<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub> (condition de normoxie) dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma-Aldrich® D0822) supplémenté en acides aminés non essentiels (1 %) (Sigma M7145), antibiotiques (1 %) (Sigma-Aldrich® A5955) et Sérum de Veau Foetal (10 %) (Eurobio 5256 puis Eurobio S73136).

Les passages ont été réalisés lorsque les cellules ont atteint la confluence. Après rinçage au PBS, les cellules ont été laissées 3 min à 37°C en présence de Trypsine-EDTA (T3924 Sigma). Du milieu avec sérum a été ajouté pour inhiber l'action de l'enzyme, puis les cellules ont été centrifugées 5 min à 250 g avant d'être reprises dans du milieu et comptées à l'aide d'un compteur de cellules (LUNA Automated Cell Counter Logos Biosystems) avant ensemencement.

Afin d'étudier l'effet de la concentration de dioxygène, des cellules ont été cultivées soit dans des conditions d'hypoxie 1 % O<sub>2</sub> (94 % N<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>) ou 10 % O<sub>2</sub> (85 % N<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>), soit dans des conditions d'hyperoxie 60 % O<sub>2</sub> (35 % N<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>) pendant 48 h (chronique) dans un incubateur tri-gaz (Heracell 150i, ThermoScientific). De précédentes études au laboratoire [18] ont permis de déterminer ces valeurs pour l'étude de l'hypoxie chronique *in vitro* sur des CMLAP. En effet, après 48 h de culture en hypoxie (1 ou 10 % O<sub>2</sub>), les CMLAP présentaient une  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  plus élevée, et un pourcentage de cellules répondantes ainsi qu'une amplitude de réponse calcique augmentés par rapport aux cellules cultivées en normoxie. En revanche, après 24 h de culture en hypoxie, que ce soit à 1 ou 10 % O<sub>2</sub>, ni le pourcentage de cellules répondantes, ni l'amplitude de réponse calcique induite par l'hypotonie n'étaient modifiés.



## 2. Vecteurs / sondes

Toutes les séquences des vecteurs utilisés sont disponibles dans la section *Supplementary Material* au lien suivant : <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/7/954>.

### 2.1. Séquences

#### pcDNA3.1 - Lac Z (vecteur vide)

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATG  
CCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTGCTGAGTAGTGCGG  
GAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGC  
TTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATT  
GATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT  
GGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCC  
CCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA  
TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTA  
TCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT  
TGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC  
GCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGAC  
TCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAA  
AATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGT  
AGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACT  
GCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGT  
TTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGACCAGGTTGAGACGATTTACACTTTAT  
GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
CTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGTTTTGC  
ATGCCTGCAGGTGACTCTTGAGGACCCCCGGGTACCGAGCTCGAACTCGCCCTATAGTG  
AGTCGTATTACAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTGCTGACTGGGAAAACCTGGCG  
TTACCCAATTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG  
AGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGTAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACG  
CGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTA  
CACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGCTCCTTTCGCTTTCCTTCCCTTCTCGCCACGTT  
GCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTT  
TACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGTCGTCTCAGGAAGAATTCTGCAGATATC  
CAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA  
CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTG  
GAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTG  
AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG  
GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAA  
GAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGG  
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCT  
CCTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAA  
TCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTT  
GATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGA  
CGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAACCC  
TATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAA  
AATGAGCTGATTTAACAATAAATTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAG  
GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT  
AGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGC  
ATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCCGCCCTAA  
CTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGA  
GGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGG  
CCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGA  
GACAGGATGAGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGAGGTTCTCCGGC

CGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGA  
TGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCT  
GTCCGGTGGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGA  
CGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGC  
TATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAG  
TATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCAT  
CGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CTGATGGAAGCCGGTCTTG  
TCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGA ACTGTTCCGCC  
AGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGC  
TTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTG  
GGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTT  
GGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAG  
CGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAAT  
GACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTA  
TGAAAGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGG  
GGATCTCATGCTGGAGTCTTCGCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTAC  
AAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTT  
GTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTA  
GAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT  
CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG  
CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC  
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCT  
TCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAG  
CTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAAC  
ATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTT  
TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG  
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG  
CTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGC  
GTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCA  
AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTA ACT  
ATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTA  
ACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCT  
AACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC  
TTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTT  
TTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC  
TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG  
AGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCA  
ATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA  
CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGA  
TAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACC  
CACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGC  
AGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTA  
GAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCG  
TGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCG  
AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTT  
GTCAGAAGTAAGTTGGCCGCACTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT  
CTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGT GAGTACTCAACCAAGTCAT  
TCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATA  
CCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAA  
AACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA  
ACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGC  
AAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTC  
CTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTG  
AATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCAC  
CTGACGTC

**mNeonGreen (accepteur d'énergie)**

CGTCTCGAGGTCAAGCTTGGATCCGCCACCATGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACAT  
GGCCTCTCTCCCAGCGACACATGAGTTACACATCTTTGGCTCCATCAACGGTGTGGACTTT  
GACATGGTGGGTGAGGGCACCGCAATCCAAATGATGGTTATGAGGAGTTAAACCTGAA  
GTCCACCAAGGGTGACCTCCAGTTCTCCCCCTGGATTCTGGTCCCTCATATCGGGTATGGC  
TTCCATCAGTACCTGCCCTACCCTGACGGGATGTCGCCTTTCCAGGCCGCCATGGTAGATG  
GCTCCGGATACCAAGTCCATCGCACAATGCAGTTTGAAGATGGTGCCTCCCTTACTGTTA  
ACTACCGCTACACCTACGAGGGAAGCCACATCAAAGGAGAGGCCAGGTGAAGGGGACT  
GGTTTCCCTGCTGACGGTCTGTGATGACCAACTCGCTGACCGCTGCGGACTGGTGCAGG  
TCGAAGAAGACTTACCCCAACGACAAAACCATCATCAGTACCTTTAAGTGGAGTTACACC  
ACTGGAAATGGCAAGCGCTACCGGAGCACTGCGCGGACCACCTACACCTTTGCCAAGCC  
AATGGCGGCTAACTATCTGAAGAACCAGCCGATGTACGTGTTCCGTAAGACGGAGCTCAA  
GCACTCCAAGACCGAGCTCAACTTCAAGGAGTGGCAAAGGCCTTTACCGATGTGATGG  
GCATGGACGAGCTGTACAAGCGCATGCAAGATGCCTGAGACG

**Calflux (senseur calcique)**

CGTCTCGTGCCAGCGAAGAAGAGCTATCAGAGTGCTTTCGCATTTTTGACAAGGATGGAA  
ATGGTTTTATCGACAGGGAGGAATTTGGAGACATCATCCGCCTTACTGGAGAACAGCTCA  
CAGATGAGGATCCCGATGAGATATTTGGAGATTCAGACACAGACAAAAATGGAAGGATT  
GACTTTGATGAGTTCCTGAAGATGGTGGAGAATGTCCAGCCTCTGGCCGAGCTCTGAGAC  
G

**nanoLuciférase (donneur d'énergie exprimé en Nter de TRPV4)**

CGTCTCGGCTCATGGTCTTCACACTCGAAGATTTCTGTTGGGGACTGGCGACAGACAGCCG  
GCTACAACCTGGACCAAGTCTTGAACAGGGAGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCG  
GGGTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAATGGGCTGAAGATCG  
ACATCCATGTCATCATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGGCGACCAAATGGGCCAGATCGAAA  
AAATTTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGG  
CACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACGGCCGTATGA  
AGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCTGTGGAACGGCA  
ACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGAGTAACCA  
TCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAACGCATTCTGGCGGTACCGGTGAATTCTT  
GAGACG

**CAAX tag (avec STOP) (peptide d'ancrage membranaire exprimé en Cter de TRPV4)**

CGTCTCATTCTGGTGGAGGCGGATCTGGATCCGCCGGTACCATGGCCAGCAACAACACCG  
CCAGCGGTGGGAAAAAGAAGAAAAAGAAGTCAAAGACAAAGTGTGTAATTATGTGACCG  
CTCGAGTCTAGAGGAATGAGACG

**TRPV4 N-term (TRPV4 partie Nter)**

CGTCTCATTCTGGTGGAGGCGGATCTATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCCCGCGGGGGC  
CCGGGGAGGTGGCTGAGCTCCCCGGGGATGAGAGTGGCACCCAGGTGGGGAGGCTTTT  
CCTCTCTCCTCCCTGGCCAATCTGTTTGGAGGGGAGGATGGCTCCCTTTCGCCCTACCGG  
CTGATGCCAGTCGCCCTGCTGGCCCAGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTCC  
AGGGCGCCTTCCGCAAGGGGGTGGCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACCCTATATG  
AGTCTCGGTGGTGCCTGGGCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTGTTTACTACGGCA  
CCTATCGTCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAG  
CCGAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCTCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGG  
CCTATCTCTTTGACATCGTGTCCCGGGGCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCAT  
TCTTGCTGACCCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGGA  
AGACCTGCCTGCCAAGGCCTTGCTGAACCTGAGCAATGGCCGCAACGACACCATCCCTG  
TGCTGCTGGACATCGCGGAGCGCACCGGCAACATGAGGGAGTTCATTAACTCGCCCTTCC  
GTGACATCTACTATCGAGGTGAGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCTGCTGCAAAC  
ACTACGTGGAACCTTCTCGTGGCCCAGGGAGCTGATGTCCACGCCCAGGCCCGTGGGCGCT  
TCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTGTGCTGG  
CTGCCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCTGACGGAGAACCCCCACAAGAAGG

CGGACATGCGGGCGCCAGGACTCGCGAGGCAACACAGTGCTGCATGCGCTGGTGGCCATT  
GCTGACAACACCCGTGAGAACACCAAGTTTGTACCAAGATGTACGACCTGCTGCTGCTC  
AAGTGTGCCCCGCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGGCCGTGCTCAACAACGACGGCCTC  
TCGCCCCATGATGGCTGCCAAGACGGGCAAGATTGGGATCTTTCAGCACATCATCCGG  
CGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTA  
TGGGCCAGTGATTCCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGC  
CTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCGCCACGAGATGCTGGC  
TGTGGAGCCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTCGGGGCCTTCTCCTT  
CTACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACTCTCACCGCCTACTAC  
CAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGTACCCTTACCGCACCACGGTGGACTACCTGCGGCTG  
GCTGGCGAGGTCATTACGCTCTTCACTGGGGTCTGTCTTCTTCAACCAACATCAAAGACT  
TGAGACG

**TRPV4 C-term (avec STOP) (TRPV4 partie Cter sans fusion de sonde en Cter)**

CGTCTCAGACTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCATTGATGGCTCC  
TTCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCTGGTATCGTGTGTCAGCAGCCCTCTACCTGG  
CAGGGATCGAGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTGGGCTGGATGAATG  
CCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAGA  
TTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGCT  
TCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAG  
ACCAACTGCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTC  
CTCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACC  
AAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCCTCACCTTTGTGCTGC  
TCCTCAACATGCTCATTGCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCA  
AGCACATCTGGAAGCTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCG  
TATTCCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGGGAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACG  
GCACTCCTGACCGCAGGTGGTGTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACC  
AGAACTTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCAGTATTATGGC  
TTCTCGCATAACCGTGGGCGCCTCCGCAGGGATCGCTGGTCTCCTCGGTGGTACCCCGCGTG  
GTGGAACCTGAACAAGAAGCTCGAACCCGGACGAGGTGGTGGTGCCTCTGGACAGCATGGG  
GAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAGGACTGATGACG  
CCCCGCTCTAGGTACGGAATGAGACG

**TRPV4 C-term (sans STOP) (TRPV4 partie Cter avec fusion de sonde en Cter)**

CGTCTCAGACTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCATTGATGGCTCC  
TTCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCTGGTATCGTGTGTCAGCAGCCCTCTACCTGG  
CAGGGATCGAGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTGGGCTGGATGAATG  
CCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAGA  
TTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGCT  
TCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAG  
ACCAACTGCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTC  
CTCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACC  
AAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCCTCACCTTTGTGCTGC  
TCCTCAACATGCTCATTGCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCA  
AGCACATCTGGAAGCTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCG  
TATTCCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGGGAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACG  
GCACTCCTGACCGCAGGTGGTGTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACC  
AGAACTTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCAGTATTATGGC  
TTCTCGCATAACCGTGGGCGCCTCCGCAGGGATCGCTGGTCTCCTCGGTGGTACCCCGCGTG  
GTGGAACCTGAACAAGAAGCTCGAACCCGGACGAGGTGGTGGTGCCTCTGGACAGCATGGG  
GAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAGGACTGATGACG  
CCCCGCTCTAGGTACGGAATGAGACG

**YFP (avec STOP) (Tag fluorescent exprimé en Cter de TRPV4 et utilisé pour l'imagerie confocale)**

CGTCTCACGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCC  
ACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAG  
CGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGCTGATCT  
GCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGCG  
TGCAGTGCTTCGCCCCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCA  
TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG  
ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG  
CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACA  
GCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAG  
ATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGGCTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC  
CCCCATCGGGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCAA  
GCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCG  
CCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAACCGCTCGAGTCTAGAG  
GAATGAGACG

### **nLuc (avec STOP) (donneur d'énergie exprimé en Cter de TRPV4)**

CGTCTCACGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTATGGTCTTCCACTCGAAGATTCGTTG  
GGGACTGGCGACAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG  
TCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCTGAGCG  
GTGAAAATGGGCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGGGC  
ACCAAATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACT  
TTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGATCG  
ACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAA  
CAGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGC  
TCCCTGCTGTTCCGAGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAACGCATT  
CTGGCGTAACCGCTCGAGTCTAGAGGAATGAGACG

## **2.2. Transfection**

Les cellules ont été transfectées en présence de polyéthylèneimine (PEI, linear, Mr 25000 ; Cat. No. 23966 Polysciences, Warrington, PA) avec un ratio de PEI : ADN de 4 : 1. Pour un puits d'une plaque 6 puits (10 cm<sup>2</sup>), 8 µg de PEI ont été utilisés pour 2 µg d'ADN total dans 200 µL d'Opti-MEM ® (*Minimal Essential Medium* (Gibco)). Après 30 min d'incubation à 37°C, le mélange a été incubé en présence des cellules en suspension avant leur ensemencement [129].



### 3. Solutions d'enregistrement

#### 3.1. Solutions salines utilisées en patch-clamp

Concentration (en mM)				
	Cellule entière		Cellule attachée	
	Intrapipette	Extracellulaire	Intrapipette	Extracellulaire
NaCl	-	135	140	-
KCl	-	-	-	140
CsCl	130	5	-	-
EGTA	5	-	-	-
MgCl <sub>2</sub>	5.5	1	1.2	1.2
CaCl <sub>2</sub>	-	1	2.2	2.2
Na <sub>2</sub> ATP	5	-	-	-
Glucose	-	10	14	14
HEPES	5	10	10	10
TEA	-	-	10	-
Mannitol	Qsp 290 mOsm	Qsp 300 mOsm	Qsp 310 mOsm	Qsp 310 mOsm
pH	7.2 (NaOH)	7.4 (NaOH)	7.4 (NaOH)	7.4 (KOH)

**Tableau 3 : Solutions salines pour le patch-clamp.**

#### 3.2. KREBS-HEPES

	Concentration (en mM)
NaCl	118.4
KCl	4.7
CaCl <sub>2</sub>	2
MgSO <sub>4</sub>	1.2
NaHCO <sub>3</sub>	4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2
HEPES	10
6D-glucose	6
Mannitol	Qsp 300 mOsm
pH	7.4 (NaOH)

**Tableau 4 : Composition de la solution saline KREBS-HEPES.**

#### 3.3. Solution saline utilisée en BRET

	Concentration (en mM)
NaCl	145
KCl	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4
MgSO <sub>4</sub>	1
Glucose	10
HEPES	20
CaCl <sub>2</sub>	1
pH	7.4 (NaOH)

**Tableau 5 : Composition de la solution saline BRET.**

## 4. Liste des agonistes, antagonistes et autres produits utilisés

### 4.1. Agonistes

Agoniste	Canal	Concentration utilisée	Fournisseur	Référence
GSK1016790A	TRPV4	100 nM	Sigma	G0798
Capsaïcine	TRPV1	10 µM	Sigma	
Yoda1	Piezo1	20 µM	Sigma	SML1558

**Tableau 6 : Tableau des agonistes utilisés.**

### 4.2. Antagonistes

Antagoniste	Canal	Concentration utilisée	Fournisseur	Référence
HC067047	TRPV4	1 µM	Sigma	SML0143

**Tableau 7 : Tableau des antagonistes utilisés.**

### 4.3. Autres

Produit	Caractéristiques	Concentration utilisée	Fournisseur	Référence
Coéluentérazine H	Substrat Luciférase	5 µM	Prolume Nanolight Technology	301-1 hCTZ
Furimazine	Substrat Luciférase	1/500 <sup>e</sup>	Promega	Kit NanoGlo Luciferase Assay
Fluo-4 AM	Sonde calcique Kd 335 nM λexcitation 485 nm λémission 520 nm	2 µM	AAT Bioquest	20551
Fura-2 LR AM (Fura-PE3)	Sonde calcique Kd 145 nM λexcitation 340 / 380 nm λémission 510 nm	5 µM	ION Biosciences	IB-1061B
Biotine	EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin – Biotinylation de surface	0.5 mg/mL	ThermoFisher Scientific	21331
Streptavidine	Résine d'agarose streptavidine – Biotinylation de surface	-	ThermoFisher Scientific	20349

**Tableau 8 : Tableau des produits utilisés.**

## 5. Anticorps

Anticorps	Produit chez	Dilution	Fournisseur	Référence
TRPV4	Lapin	IF 1/200 WB 1/500	Abcam	ab191580
TRPV4 extracellulaire	Lapin	IF 1/100	Alomone	ACC-124
GAPDH	Souris	WB 1/1000	Sigma	G8795
$\alpha$ -SMA	Souris	IF 1/500	Sigma	A5228
Calponine	Lapin	IF 1/500	Abcam	ab46794
Vimentine	Souris	IF 1/500	Sigma	V6389

**Tableau 9 : Tableau des anticorps utilisés.**

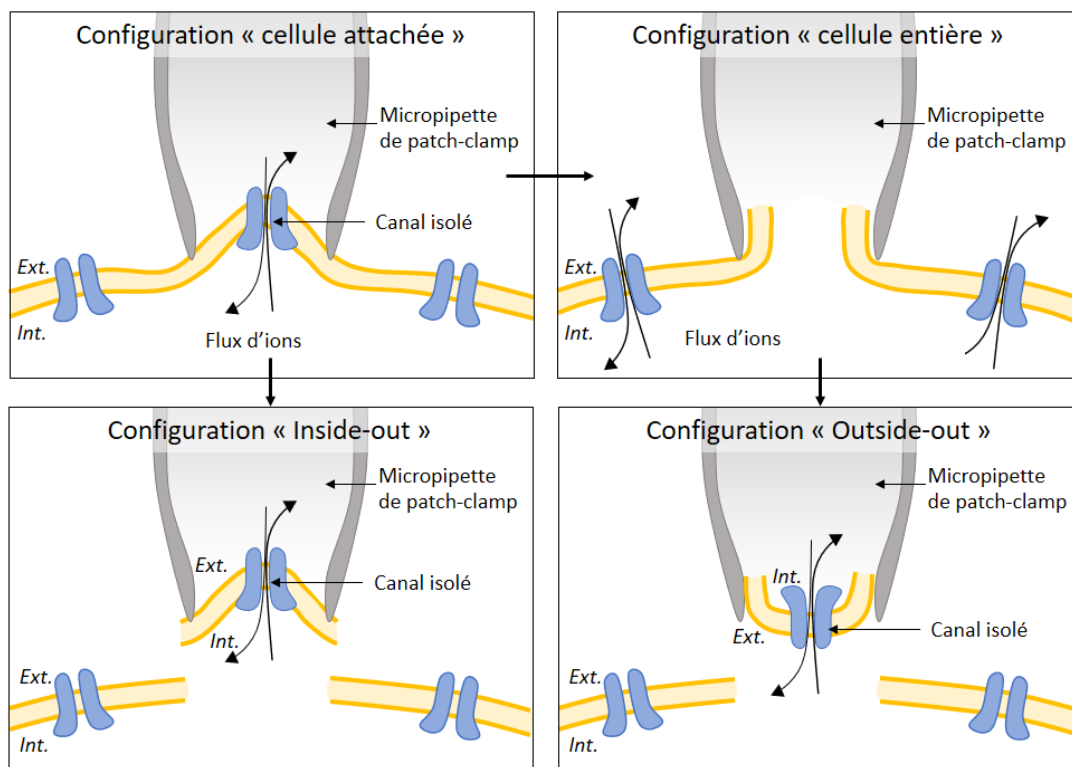
## 6. Patch-clamp

### 6.1. Principe

La technique de patch-clamp permet de mesurer l'intensité de courants ioniques au sein d'une membrane cellulaire [130]. Le principe repose sur la loi d'Ohm :  $U = R \times I$ , où  $U$  est la tension (potentiel),  $R$  la résistance et  $I$  le courant. Cette relation peut également s'exprimer ainsi :  $I = U \times G$ , où  $G$  est la conductance ( $G = 1/R$ ).

Une micropipette en verre remplie avec une solution ionique (conductrice) est mise en contact avec la membrane d'une cellule. Le but est de réaliser un scellement (« seal ») entre la membrane cellulaire contenant les canaux ioniques et la pipette en évitant les fuites afin d'obtenir un rapport signal / bruit optimal.

Il existe différentes configurations de patch-clamp [Figure 19]. Tout d'abord, la configuration « cellule attachée », où le scellement est réalisé à l'aide d'une dépression dans la micropipette au niveau de la membrane cellulaire. Cette configuration permet la mesure de courants unitaires au niveau de la portion de membrane présente sous la pipette, on enregistre alors des courants issus de canaux unitaires. Il y a ensuite la configuration « cellule entière », où à partir de la configuration cellule attachée, une dépression supplémentaire est appliquée dans la pipette de patch afin d'arracher le morceau de membrane sous la pipette et de donner accès à la mesure de l'ensemble de l'activité des canaux à la membrane cellulaire, la mesure est alors multicanalaire. Enfin, le patch excisé comprend les configurations « inside-out » et « outside-out » qui s'obtiennent en éloignant la micropipette de la cellule après avoir réalisé un scellement à partir des configurations cellule attachée et cellule entière respectivement.



**Figure 19 : Schémas des différentes configurations en patch-clamp.**

Schéma des configurations « cellule attachée », « cellule entière », « Inside-out » et « Outside-out ».

Lors des mesures, la pipette est connectée à un amplificateur permettant d'enregistrer des amplitudes de courant I de l'ordre du picoampère (pA) et d'imposer un potentiel (ou tension U). On parle de patch-clamp en mode **potentiel imposé** (ou « *voltage clamp* ») où le potentiel est maintenu constant. Ainsi, les variations de courants dépendent de la conductance qui représente la facilité des ions à traverser le pore d'un canal membranaire.

Lors de l'ouverture d'un canal, la conductance augmente (donc la résistance diminue) et le courant augmente avec le passage d'ions à travers le canal. Ce flux d'ions à travers le canal va dépendre du **gradient électrochimique** qui est la différence entre le potentiel imposé et le potentiel d'équilibre de l'ion concerné ( $V_{\text{imposé}} - E_{\text{ion}}$ ). Le potentiel d'équilibre d'un ion peut être calculé avec l'équation de Nernst :

$$E_{\text{ion}} = -\frac{RT}{ZF} \times \ln \left( \frac{[\text{ion}]_{\text{intracellulaire}}}{[\text{ion}]_{\text{extracellulaire}}} \right)$$

Avec R (constante des gaz parfaits) = 8.314 J.mol.K<sup>-1</sup>, T (température en Kelvin), F (constante de Faraday) = 96 485 C.mol<sup>-1</sup> et Z (valence de l'ion).

Le courant I est donc égal au produit de la conductance G et du gradient électrochimique de l'ion :  $I = G \times (V_{\text{imposé}} - E_{\text{ion}})$ .

## 6.2. Procédure expérimentale

Les cellules ont été placées dans un milieu extracellulaire correspondant au type d'enregistrement (cellule entière ou cellule attachée cf. Tableau 3). L'électrode de référence a été placée dans le milieu et les cellules ont été observées grâce à un microscope inversé (Nikon Diaphot). Les micropipettes en verre de borosilicate (GC150F-10, Harvard Apparatus, Phymep) ont été étirées à l'aide d'une étireuse (DMZ-Universal Puller) pour atteindre une résistance de 6 à 9 MΩ pour des enregistrements en cellule attachée et 4 à 5 MΩ pour des enregistrements en cellule entière. Les pipettes étaient reliées à un système de contrôle de pression intrapipette (High Speed Pressure Clamp-1, AlaScience Scientific Instruments) permettant de réaliser le scellement où la résistance atteint 1 GΩ. Ce système permet également de réaliser des dépressions ou surpressions dans la pipette et ainsi enregistrer des courants en réponse à une déformation de la membrane. Le déplacement des micropipettes a été contrôlé avec un micromanipulateur (MHW-3, Narishige). Les enregistrements ont été effectués en voltage imposé en configuration cellule attachée pour les courants unitaires ou cellule entière pour les courants globaux. L'agoniste a été préalablement ajouté dans la pipette utilisée pour le scellement pour les enregistrements en configuration cellule attachée. Pour les enregistrements en configuration cellule entière, l'agoniste a été éjecté à l'aide d'une pipette d'éjection grâce à un système d'éjection pneumatique (Picospitzer). Les courants, après amplification à l'aide d'un amplificateur RK400 (Biologic) et filtration (Humsilencer), ont été enregistrés avec le logiciel pClamp11 (Molecular Devices). Les analyses ont été réalisées avec le logiciel Clampfit 10.7 (Molecular Devices).

## 6.3. Les protocoles d'enregistrements

En configuration cellule entière, après le scellement, le potentiel a été imposé à -60 mV puis une rampe de potentiel a été appliquée de -60 à +60 mV pendant 650 ms toutes les 10 s pendant 3 min. L'agoniste a été éjecté pendant 5 s après 4 rampes et les courants activés par l'agoniste



ont été déterminés par la différence du courant maximal après éjection de l'agoniste avec le courant moyen avant éjection pour un potentiel donné. Les courants ont ensuite été normalisés par la capacitance membranaire.

En configuration cellule attachée, l'agoniste a été ajouté dans la pipette avant le scellement. Une fois celui-ci effectué, le potentiel a été imposé de -60 à +60 mV où les enregistrements ont été effectués pendant 1 s toutes les 2 s pendant 2 min. L'amplitude des courants unitaires a été déterminée ainsi que la probabilité d'ouverture et la conductance des canaux.

## 7. BRET (Transfert d'Énergie en Résonance de Bioluminescence)

### 7.1. Contexte

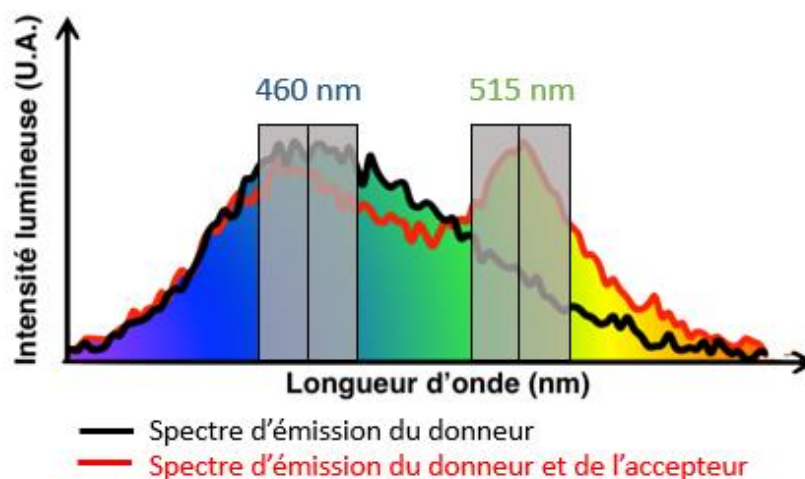
L'activation des canaux ioniques dont TRPV4 induit des changements conformationnels et des flux d'ions pouvant être étudiés grâce à des techniques de transfert d'énergie en résonance comme le BRET (Transfert d'Énergie en Résonance de Bioluminescence). L'étude de ces canaux ioniques avec le BRET a été réalisée dans le cadre du projet CANALBRET, financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), en collaboration avec plusieurs partenaires. Le consortium est composé des équipes du Dr Yann Percherancier (Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, Université de Bordeaux), du Pr Thomas Ducret (Centre de Recherche CardioThoracique de Bordeaux, Université de Bordeaux), du Dr Vincent Compan (Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Montpellier), du Dr Christel Franchet (Domain Therapeutics, Société anonyme située à Illkirch-Graffenstaden) et du Pr Jeremy Simpson (University College Dublin Conway Institute, Irlande). L'équipe de l'IMS (Yann Chappe et Alexandre Joushomme, doctorants) sous la direction du Dr Yann Percherancier, a designé et produit toutes les sondes BRET utilisées. Ils ont mis au point plusieurs constructions (décrites plus en détail dans la partie « Constructions BRET ») permettant d'étudier différents paramètres dont les interactions entre protéines, les changements conformationnels ou encore l'étude de concentrations ioniques dans le nanoenvironnement du canal d'intérêt. Ces constructions ont été appliquées à plusieurs canaux d'intérêt dont TRPV1, TRPV4, TRPM8, Piezo1, des canaux  $K_{Ca}$ ,  $Ca_v$  ou encore P2X5/7.

### 7.2. Principe

#### 7.2.1. Transfert d'Énergie en Résonance

Le transfert d'énergie en résonance (RET) est un phénomène biophysique caractérisé par un transfert d'énergie non radiatif (sans émission de photons) entre deux molécules distinctes, un donneur et un accepteur d'énergie [131]. Ce transfert d'énergie du donneur à l'état excité vers l'accepteur (non excité) se fait lorsque l'orientation des dipôles est favorable (parallèle), et dépend du recouvrement spectral et de la distance entre ces deux molécules. En effet, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir une partie du spectre d'absorption de l'accepteur et les molécules donneuse et accepteuse d'énergie doivent être situées à moins de 10 nm l'une de l'autre. L'accepteur, après transfert d'énergie non radiatif via le donneur, se retrouve alors à l'état excité et va émettre un photon à sa longueur d'onde d'émission afin de revenir à l'état fondamental. Le RET peut alors être évalué par le calcul du ratio entre l'intensité de lumière émise à la longueur d'onde de l'accepteur sur celle du donneur [Figure 20]. Ce transfert d'énergie permet d'étudier l'interaction entre protéines ainsi que des changements de conformation de protéines.

Les techniques alors utilisées pour l'étude de ces interactions sont le FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) et le BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) grâce à l'utilisation de protéines de fusion, fluorescentes pour le FRET (GFP (*Green Fluorescent Protein*) et dérivés) et bioluminescentes (Luciférase et dérivés) et fluorescentes pour le BRET. Le BRET a l'avantage de pouvoir étudier les interactions moléculaires en temps réel dans des cellules vivantes sans les exciter via un laser, évitant ainsi le photoblanchiment du fluorophore.



**Figure 20 : Spectres d'émission du donneur et de l'accepteur lors d'un transfert d'énergie.**

Les bandes passantes de mesure pour le calcul du ratio de transfert d'énergie en résonance sont indiquées en gris et dépendent du donneur et de l'accepteur d'énergie. Ici, les valeurs indiquées correspondent aux spectres de la nanoLuciférase et mNeonGreen.

### 7.2.2. Bioluminescence

La bioluminescence est un phénomène qui induit une émission de photons dans le spectre du visible [132]. C'est une réaction basée sur l'oxydation catalysée par une enzyme (luciférase) d'un substrat (luciférine) dont la décarboxylation de l'intermédiaire sous forme de peroxy-luciférine lié à la luciférase va fournir l'énergie nécessaire à l'excitation.

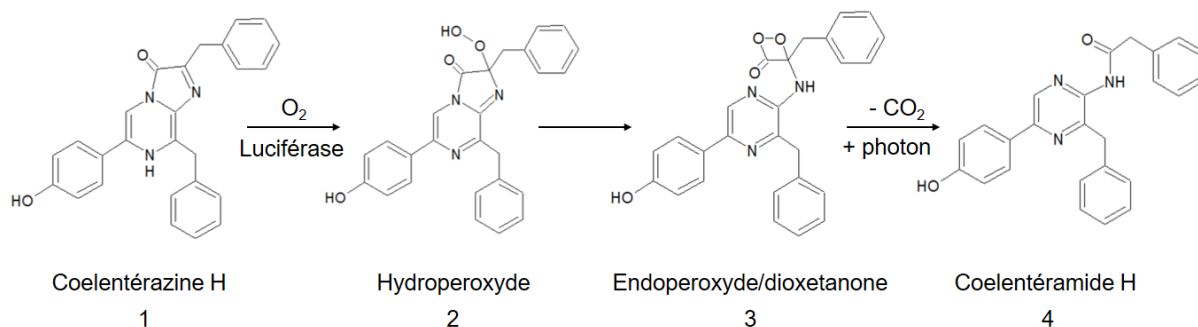
Lorsqu'un fluorophore est présent, l'énergie peut alors lui être transférée, le rendant excité, et induisant ainsi sa fluorescence. Le BRET a lieu lorsqu'un donneur d'énergie bioluminescent (comme la luciférase) transfère son état excité d'énergie à un accepteur fluorescent situé à une distance inférieure à 10 nm. Ce phénomène existe naturellement chez certaines bactéries, cnidaires, cténophores, dinoflagellés ou chez les lucioles.

### 7.2.3. BRET

La coelentérazine H (CoH) est une luciférine, c'est un substrat permettant la production de bioluminescence par la luciférase. Lors de cette étude, la **furimazine** (un analogue de la coelentérazine) a été utilisée, la protéine donneuse est la **nanoLuciférase (nLuc)** et l'accepteur d'énergie est une protéine fluorescente : **mNeonGreen (mNeonG)**.

La luciférase est une enzyme qui, en présence de son substrat, est capable d'émettre de la bioluminescence [133]. La nLuc est une enzyme dérivée de la partie catalytique de la luciférase de 19 kDa de chez *Oplophorus gracilirostris*, une espèce de crevette marine et qui présente une activité plus spécifique et une meilleure luminescence que celle d'autres luciférases couramment utilisées comme la rLuc (*Renilla Luciferase*) et la fLuc (*Firefly Luciferase*) [134]. La nLuc possède un spectre d'émission entre 400 et 600 nm avec un pic à 460 nm.

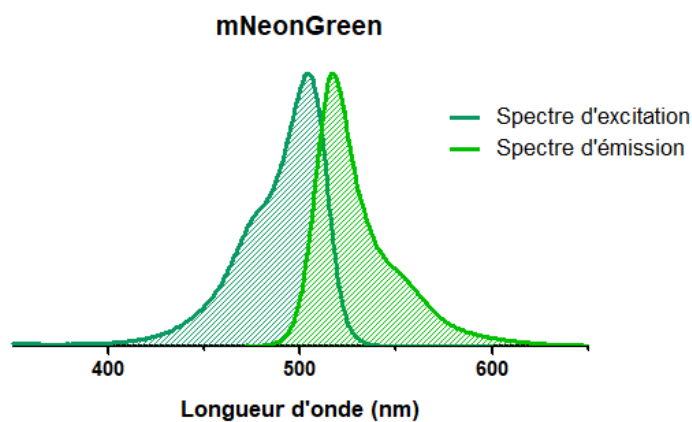
Au niveau marin, de nombreuses espèces utilisent la coelentérazine comme substrat pour produire de la lumière bleue [Figure 21]. La coelentérazine H, ou 2-Deoxycoelenterazine, est un dérivé de la coelentérazine dont un groupement hydroxyle a été retiré [135, 136].



**Figure 21 : Réaction permettant l'émission de bioluminescence.**

La réaction commence par une oxydation de la coelentérazine H (1) en hydroperoxyde (2) qui subit une cyclisation pour donner l'endoperoxyde/dioxetanone (3). Il y a ensuite sa décarboxylation qui mène à la formation de coelentéramide H (4) dans un état excité qui peut restituer de l'énergie via l'émission d'un photon ou via des processus non-radiatifs. (Figure adaptée de Coutant et al. 2020)

La protéine acceptrice est la protéine fluorescente mNeonG qui est dérivée d'une protéine fluorescente jaune de *Branchiostoma lanceolatum* (un céphalochordé). Son spectre d'excitation est situé entre 420 et 530 nm avec un pic à 506 nm, correspondant au spectre d'émission de la nLuc, pour une émission entre 500 et 590 nm avec un pic à 517 nm [Figure 22].



**Figure 22 : Spectres d'excitation et d'émission de mNeonGreen.**

#### 7.2.4. Constructions BRET

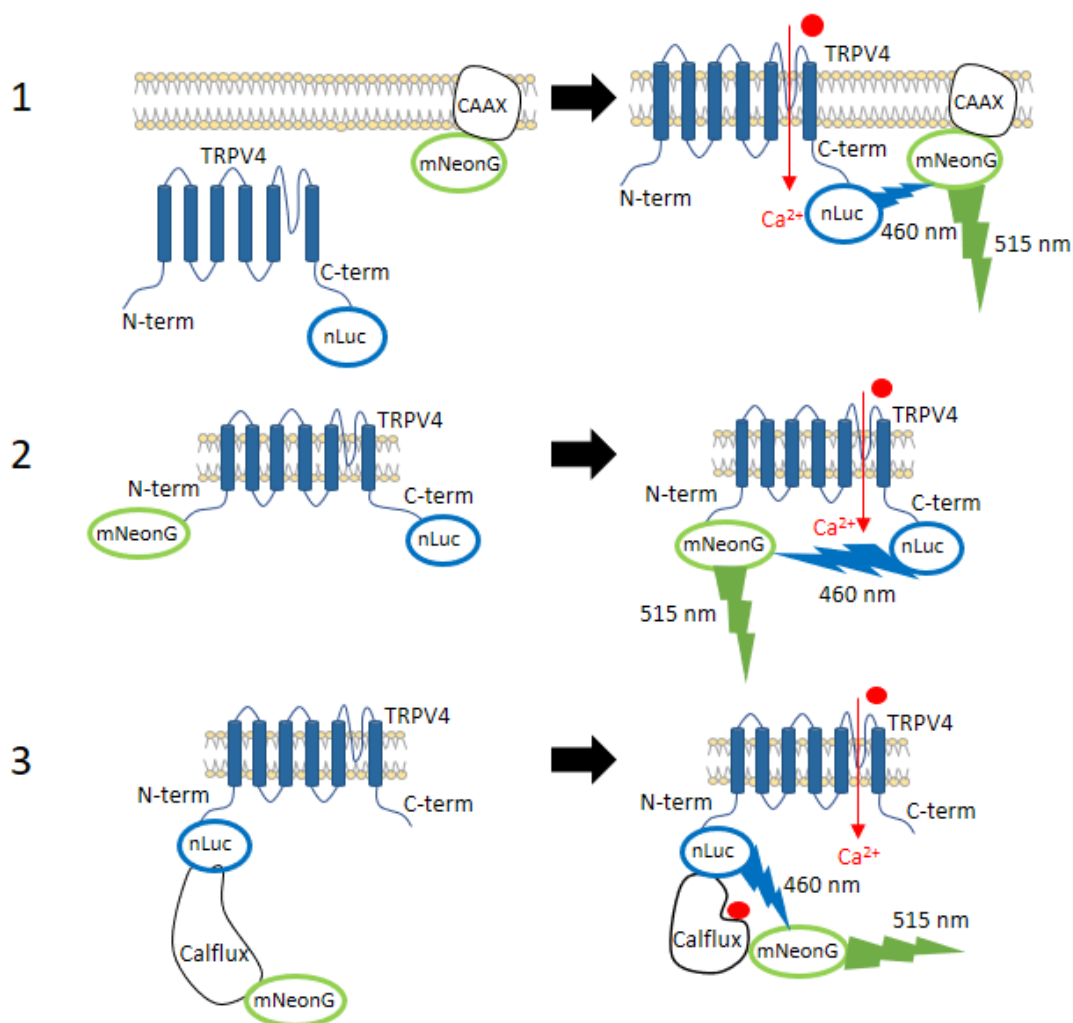
Différentes constructions ont été réalisées afin d'étudier les canaux ioniques notamment TRPV4 [Figure 23]. Dans le cadre de notre collaboration sur ce projet, toutes les sondes BRET que nous avons utilisées ont été produites par Yann Chappe et Alexandre Joushomme, doctorants au laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système (Université de Bordeaux) sous la direction du Dr Yann Percherancier.

Tout d'abord, le premier type de construction est une construction intermoléculaire où le donneur d'énergie (nLuc) est exprimé en Cter de TRPV4 et où l'accepteur (mNeonG) pourra être exprimé en Nter ou Cter d'autres protéines [Figure 23 (1)]. Ce type de construction permet

d'étudier l'interaction de TRPV4 avec d'autres protéines et ainsi de pouvoir identifier d'éventuels partenaires impliqués lors de son activation et/ou inactivation.

Un autre type de construction, intramoléculaire de première génération (1G), consiste à exprimer le donneur (nLuc) et l'accepteur (mNeonG) d'énergie aux deux extrémités de TRPV4 (cette construction n'est possible que pour les canaux dont les extrémités N- et C-terminales sont toutes deux soit intracellulaires, soit extracellulaires). Ainsi, il est possible d'étudier les changements de conformation du canal lors de son activité [Figure 23 (2)].

Enfin, les constructions dites de 2<sup>de</sup> génération (2G) permettent l'étude du passage d'un type d'ion au niveau du canal grâce à l'expression d'un senseur ionique d'intérêt encadré par le donneur et l'accepteur d'énergie. Par exemple, pour étudier les flux calciques, la calflux, un senseur calcique, peut être utilisée et encadrée par le donneur et l'accepteur d'énergie. La liaison du  $Ca^{2+}$  à la calflux va entraîner un changement de conformation de celle-ci, et donc un rapprochement du donneur et de l'accepteur d'énergie, se traduisant par une augmentation du



**Figure 23 : Schéma des différents types de construction utilisés pour les mesures de BRET.**

Les constructions sont à chaque fois représentées dans un état inactivé puis activé. (1) Construction intermoléculaire pour étudier les interactions protéiques (CAAX est un peptide d'ancrage membranaire). (2) Construction de première génération (1G) intramoléculaire pour étudier les changements de conformation du canal. (3) Construction de seconde génération (2G) composé d'un senseur calcique pouvant fixer des ions  $Ca^{2+}$ , rapprochant le donneur et l'accepteur favorisant ainsi l'émission d'un signal de BRET.



ratio de BRET observé. Ce type de construction peut être utilisé en soluble dans le cytosol, mais aussi être fusionné à un canal d'intérêt. Pour étudier les flux calciques au niveau de TRPV4, cette construction mNeonG-Calflux-nLuc a été liée à TRPV4 au niveau du Nter [Figure 23 (3)]. Cette configuration permet d'étudier la concentration en  $Ca^{2+}$  et donc le passage des ions  $Ca^{2+}$  directement lié à l'activation de TRPV4, dans son nanoenvironnement.

### 7.3. Calcul du ratio de BRET

Le BRET repose sur un transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur. En présence d'un substrat (coelentérazine H ou furimazine), une réaction enzymatique va permettre à la nanoLuciférase (nLuc) de produire de la bioluminescence. Si un accepteur (mNeonG) se trouve à proximité de la nLuc (moins de 10 nm), celle-ci va lui transférer de l'énergie et lui permettre d'émettre de la fluorescence. Le ratio entre la fluorescence émise par l'accepteur d'énergie et la luminescence émise par le donneur d'énergie traduit du rapprochement entre ces deux acteurs. Le BRET est alors calculé selon un ratio [129] :

$$BRET\ BRUT = \frac{\text{émission accepteur (mNeonG à } 515 \pm 20 \text{ nm)}}{\text{émission luciférase (nLuc à } 460 \pm 20 \text{ nm)}}$$

Le signal de BRET de fond est mesuré de la même manière pour des cellules transfectées avec uniquement la nLuciférase mais sans accepteur ; on obtient alors le BRET NET :

$$BRET\ NET = BRET\ BRUT - BRET\ de\ fond.$$

### 7.4. Procédure expérimentale pour le BRET avec lecteur de plaques

Les cellules HEK293T ont été transfectées selon le protocole décrit précédemment (cf. « Transfection ») avec par équivalent 6 puits : 0.01  $\mu$ g de mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 pour la sonde 2G, 0.02  $\mu$ g de mNeonG-Calflux-nLuc soluble + 0.02  $\mu$ g de TRPV4-WT pour la sonde Calflux soluble, et 0.01  $\mu$ g de TRPV4-nLuc et 2  $\mu$ g de mNeonG-CAAX ou -CaM pour les sondes intermoléculaires. Les cellules ont été mises en culture dans des plaques 96 puits blanches (655083 Greiner) à raison de 100 000 cellules par puits dans du DMEM sans rouge phénol (21063029 Gibco). Après 24 h, les cellules ont été soit laissées en normoxie, soit placées en hypoxie 1 %  $O_2$ , hypoxie 10 %  $O_2$  ou en hyperoxie 60 %  $O_2$  jusqu'à 48 h (effet chronique). Le jour des mesures, après avoir retiré 30 % du volume du milieu par puits, 10 % d'antagoniste (HC067047 à 1  $\mu$ M final pour TRPV4) ou de solution BRET (cf. Tableau 5), ainsi que 10 % de furimazine (1/500<sup>e</sup> final) ont été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant 30 min avant les mesures.

### 7.5. Mesure d'une concentration-réponse

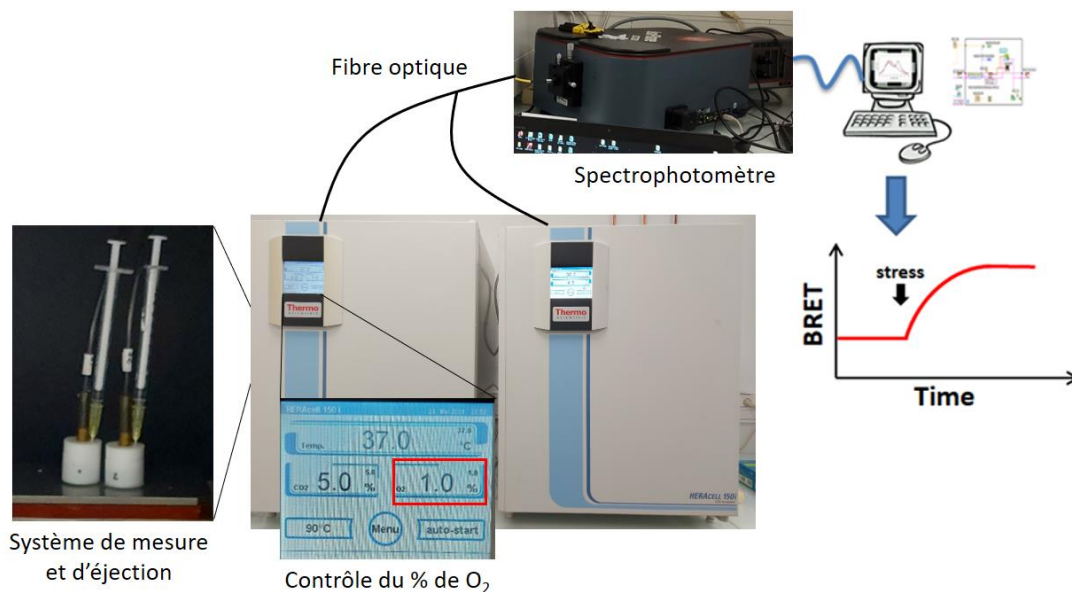
Juste avant les mesures de BRET, 10 % d'agoniste (GSK1016790A de 10 pM à 1  $\mu$ M final pour TRPV4) ont été ajoutés selon une gamme de concentrations croissantes. La lecture des plaques a ensuite été réalisée avec l'appareil Tristar2 (Berthold) grâce à des filtres de bioluminescence à  $460 \pm 20$  nm et  $515 \pm 20$  nm avec un temps d'intégration de 0.2 sec par filtre. Plusieurs lectures ont été faites pour chaque plaque. Le ratio 515 / 460 a été calculé donnant le BRET BRUT. À ce BRET BRUT a été retranché le BRET de fond (ratio de BRET pour des cellules transfectées avec nLuc sans accepteur) donnant le BRET NET. Des courbes de concentration-réponses à un agoniste ont ainsi pu être tracées.

## 7.6. Mesure d'une cinétique de réponse

Les plaques ont été placées dans l'appareil Tristar2 (Berthold) et après 30 s de mesure, l'agoniste a été éjecté grâce à une pompe automatique. Ainsi, l'évolution du BRET en réponse à un agoniste a pu être suivie dans le temps. Le temps d'intégration pour les filtres à 460 nm et 515 nm était de 0.2 sec. Le BRET NET a également été calculé de la même manière que décrit ci-dessus.

## 7.7. Procédure expérimentale pour le BRET avec spectrophotomètre

Les cellules ont été transfectées selon le protocole décrit précédemment (cf. « Transfection ») avec par équivalent 6 puits : 0.01 µg de mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 pour la sonde 2G, 0.01 µg de mNeonG-Calflux-nLuc soluble + 0.1 µg de TRPV4-WT pour la sonde Calflux soluble, et 0.01 µg de TRPV4-nLuc et 2 µg de mNeonG-CAAX ou -CaM pour les sondes intermoléculaires. Après 24 h, les cellules ont étéensemencées sur des lamelles de 12 mm de diamètres poly-lysines dans des plaques 24 puits à raison de 500 000 cellules par puits (correspondant à une « forte » confluence cellulaire). Les mesures ont été effectuées le lendemain avec un spectrophotomètre (IsoPlane SCT320) et deux fibres optiques placées respectivement dans un incubateur en normoxie, et un incubateur Tri-gaz dont la concentration en O<sub>2</sub> peut varier. Les lamelles ont été placées dans des cupules blanches opaques à fond argenté, dans une solution saline BRET avec de la furimazine (1/500<sup>e</sup>), et les fibres optiques ont mesuré en parallèle le BRET pour chacune des lamelles selon les bandes passantes 460 ± 20 nm pour le donneur et 517 ± 20 nm pour l'accepteur. Après 3 min de mesure en normoxie pour les deux lamelles, la solution saline a été remplacée par de la nouvelle solution saline BRET dans l'incubateur en normoxie, et par une solution saline BRET conditionnée en hypoxie 1 % O<sub>2</sub> pendant au moins 48 h, dans l'incubateur à hypoxie et le niveau d'O<sub>2</sub> a été abaissé à 1 % O<sub>2</sub>. Le BRET a été mesuré pendant la descente en hypoxie, puis à la fin de cette descente, 100 nM de GSK ont été éjectés sur chaque lamelle, et la mesure a été poursuivie pendant 5 min après ajout de l'agoniste. Les mesures de BRET et calculs de ratios ont été réalisés grâce aux logiciels LightField et LabView [Figure 24].



**Figure 24 : Dispositif de mesure de BRET en temps réel dans l'incubateur en hypoxie aiguë.**

## 8. Mesure calcique avec la sonde Fura-2 LR AM

### 8.1. Principe

Le Fura-2 Leak Resistant AM (ou Fura-PE3/AM), est une sonde calcique dérivée d'un chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$ , le BAPTA [Figure 25]. Cette sonde possède une partie capable de se lier aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et une partie jouant le rôle de chromophore. La fixation de 4 ions  $\text{Ca}^{2+}$  à la sonde induit un changement de conformation associé à une modification des propriétés de fluorescence de celle-ci. Ainsi, la sonde Fura-2 LR AM non liée à des ions  $\text{Ca}^{2+}$  émet de la fluorescence à 510 nm lorsqu'elle est excitée à 380 nm, alors que la sonde liée à des ions  $\text{Ca}^{2+}$  émet de la fluorescence à 510 nm lorsqu'elle est excitée à 340 nm. Le ratio entre ces deux valeurs de fluorescence ( $R(340/380)$ ) traduit la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) dans les cellules. On parle alors de sonde ratiométrique. En plus de permettre l'étude de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , les sondes ratiométriques présentent l'avantage d'éviter la mesure d'artéfacts liés à des variations d'intensité de fluorescence (cellules plus ou moins chargées, répartition hétérogène, dégradation, épaisseur des cellules, etc.).

La fonction acétométhyl ester (AM) présente sur la sonde lui permet de traverser les membranes plasmiques et donc d'entrer à l'intérieur des cellules. Dans le cytoplasme, ce groupement est clivé par des estérases endogènes, ce qui permet de piéger la sonde calcique à l'intérieur des cellules.

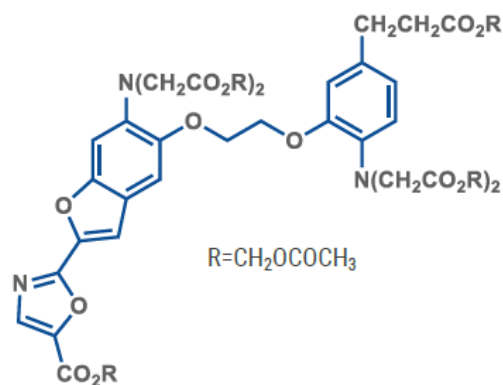


Figure 25 : Structure de la sonde Fura-2 LR AM.

### 8.2. Procédure expérimentale

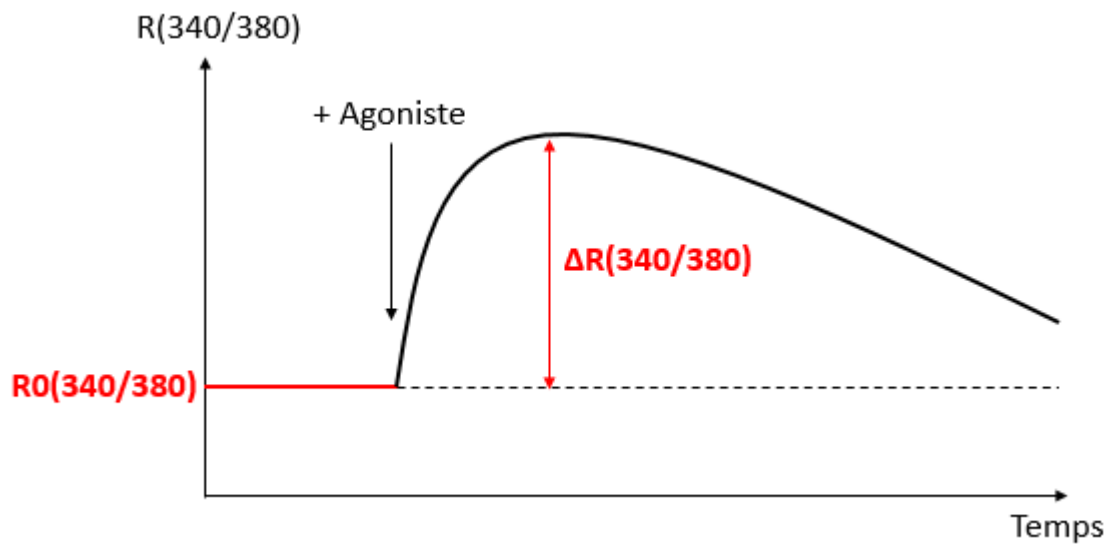
Les cellules ont été préalablement ensemencées sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre à raison de 100 000 cellules ou 3 millions de cellules par lamelle pour des mesures à faible et forte confluences respectivement. Elles ont été incubées 45 min à  $37^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière en présence de  $5 \mu\text{M}$  de Fura-2 LR AM (ION Biosciences, sonde ratiométrique à double excitation (340 et 380 nm) et simple émission (510 nm) présentant un  $K_d$  de 145 nM). Les cellules ont ensuite été désestérifiées 15 min à température ambiante à l'aide d'une solution de KREBS-HEPES (cf. Tableau 4) toujours à l'abri de la lumière.

Les lamelles ont été placées sur une chambre cellulaire (Attofluor A7816) en présence de KREBS-HEPES et les cellules observées avec un microscope Nikon Eclipse Ti2-U à l'aide d'un objectif à immersion à huile X40. Lors des enregistrements, les cellules ont été excitées avec des LED (CoolLED pE-340fura) à 340 nm pendant 200 ms puis 380 nm pendant 100 ms et la fluorescence à 510 nm a été détectée avec une caméra (C11440 Hamamatsu). Les acquisitions ont été réalisées toutes les 2 s pendant 5 à 10 min. Les antagonistes ont été incubés pendant 30 min avant l'enregistrement et les agonistes ont été ajoutés après 30 s

d'enregistrement. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel NIS Elements Advanced Research (version 5.30.02, Nikon). Le bruit de fond a été soustrait et les résultats exprimés en ratio R(340/380).

### 8.3. Analyses

Le pourcentage de cellules répondantes est déterminé dans chaque condition. Une cellule est considérée répondante quand la variation d'amplitude est supérieure à 10 % par rapport au ratio basal. Le ratio initial ( $R_0(340/380)$ ) reflète la  $[Ca^{2+}]_i$  des cellules avant stimulation. L'amplitude de la réponse ( $\Delta R(340/380)$ ) est la différence entre le ratio au maximum de la réponse et celui mesuré juste avant stimulation et traduit l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à un stimulus [Figure 26].



**Figure 26 : Paramètres de la réponse calcique.**

*Le ratio initial  $R_0(340/380)$  reflète la  $[Ca^{2+}]_i$  des cellules avant stimulation par l'agoniste. L'amplitude de la réponse  $\Delta R(340/380)$  est la différence entre le ratio au maximum de la réponse et celui mesuré juste avant stimulation traduisant de l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à la stimulation par l'agoniste.*

## 9. Mesure calcique avec la sonde Fluo-4 AM

### 9.1. Principe

Le Fluo-4 AM est également une sonde calcique dérivée d'un chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$ , le BAPTA [Figure 27]. C'est une sonde non ratiométrique présentant un  $K_d$  de 335 nM. Suite à une excitation à 485 nm, la sonde émet de la fluorescence vers 520 nm lorsqu'elle est liée au  $\text{Ca}^{2+}$ . La sonde entre dans les cellules grâce à sa fonction AM et le clivage de ce groupement par des estérases endogènes permet de piéger la sonde calcique à l'intérieur des cellules.

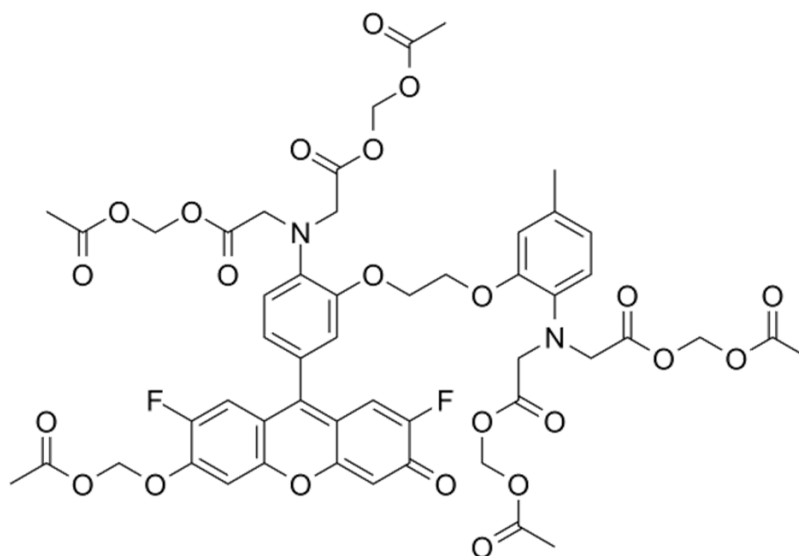


Figure 27 : Structure de la sonde Fluo-4 AM.

### 9.2. Procédure expérimentale

Les cellules ont été transfectées selon le protocole décrit précédemment etensemencées en plaques 96 puits 24 h après transfection. Les cellules ont été cultivées 48 h en normoxie (21 %  $\text{O}_2$ ) ou hypoxie (1 %  $\text{O}_2$ ) avant d'effectuer les enregistrements.

Les cellules ont été incubées 30 min à 37°C dans leur incubateur respectif (selon % en  $\text{O}_2$ ) avec 2  $\mu\text{M}$  de Fluo-4 AM (Invitrogen) en présence de l'antagoniste pour les puits concernés (HC067047). Le milieu a ensuite été remplacé puis 3 mesures ont été réalisées avant ajout de l'agoniste (F0). L'agoniste (GSK1016790A) a été ajouté en concentrations croissantes afin de réaliser une courbe concentration-réponse. Trois nouvelles mesures de fluorescence (F) ont été réalisées après ajout de l'agoniste. Pour les cinétiques, les mesures de fluorescence ont été faites toutes les 5 s pendant 6 min. La mesure de fluorescence a été effectuée grâce au lecteur de plaques FLUOstar Omega de BMG Labtech après excitation à 485 nm pour une émission à 520 nm.



### 9.3. Analyses

Le rapport  $F/F_0$  a ensuite été calculé à partir des moyennes des 3 mesures respectives (celles-ci étant obtenues par une lecture de la fluorescence d'un puits à un temps précis par le lecteur de plaque) et les résultats exprimés en  $\Delta(F/F_0)$ , la différence entre  $F/F_0$  et le  $F/F_0$  « basal » mesuré sans GSK. Les mesures de Fluo-4 ont été réalisées en complément des mesures de Fura-2 afin de pouvoir mesurer les variations de réponses calciques avec un lecteur de plaques, et ainsi se mettre dans les mêmes conditions que pour les mesures de BRET.

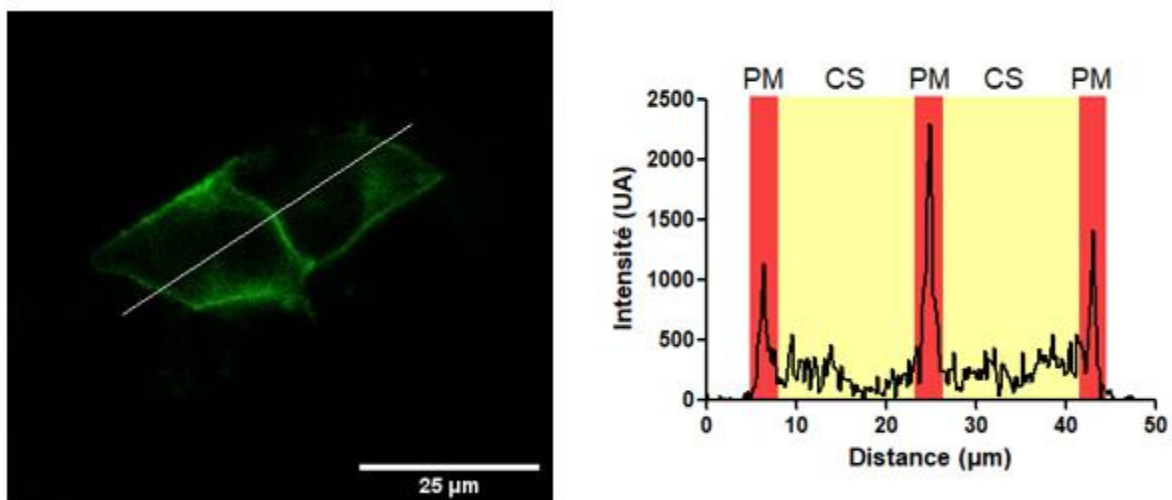
## 10. Microscopie confocale

### 10.1. Acquisition des images

Les cellules HEK293T transfectées avec TRPV4-YFP ou mNeonG-CAAX et cultivées en plaques 96 puits ont été observées vivantes par microscopie confocale (*Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning microscope*) avec un objectif à immersion à huile Nikon Apo Plan x60/1.4 NA. Les cellules ont été excitées à 488 nm par laser et la fluorescence émise a été enregistrée à  $515 \pm 15$  nm. L'acquisition des images a été effectuée par le logiciel NIS-Elements avec une résolution de 16 bits.

### 10.2. Analyse de l'expression membranaire de TRPV4

Toutes les analyses des images acquises par microscopie confocale ont été effectuées à l'aide du logiciel Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*, NIH). Pour chaque champ, une ligne a été tracée de façon à traverser une à deux cellules adjacentes afin de tracer un profil d'intensité de fluorescence de TRPV4-YFP. Des régions ont été déterminées correspondant soit à la région proche de la membrane plasmique (PM), soit au cytosol (CS) et le ratio PM/CS a été calculé reflétant la répartition membranaire ou cytosolique de TRPV4 [Figure 28].



**Figure 28 : Profil d'intensité de fluorescence pour déterminer l'expression membranaire de TRPV4.**

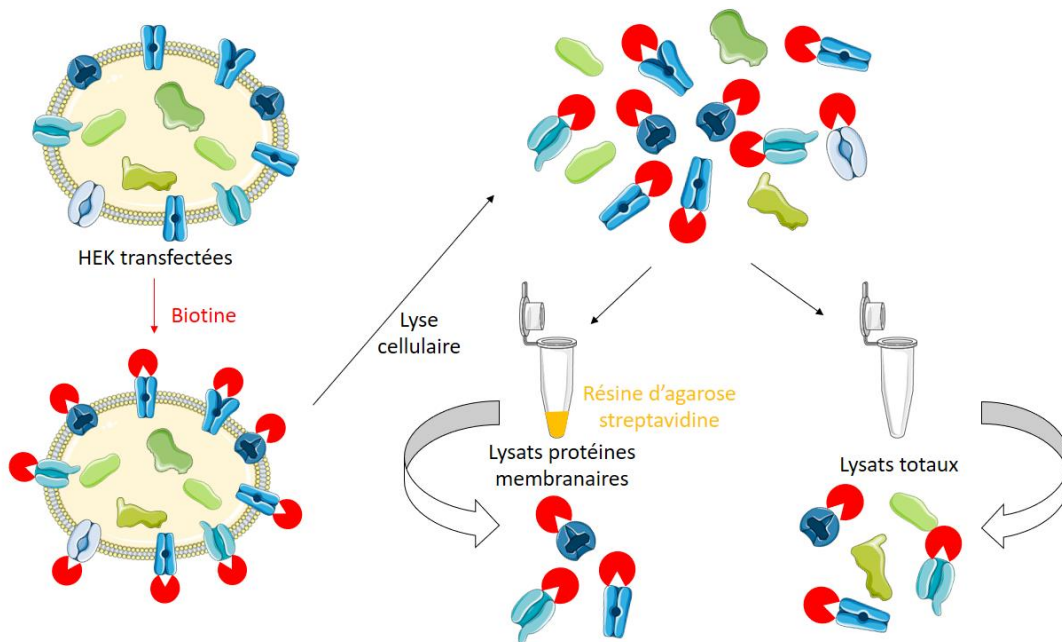
Le profil d'intensité (à droite) correspond à la section blanche tracée sur l'image (à gauche). Les zones correspondant au cytosol (CS) sont colorées en jaune et les zones au niveau de la membrane plasmique (PM) sont colorées en rouge.

# 11. Biotinylation des protéines de surface

## 11.1. Principe

La biotinylation des protéines de surface est basée sur un réactif de biotinylation Sulfo-NHS-SS-biotine composé d'un groupement sulfonate, d'un groupement N-hydroxy succinimide ester, d'un pont disulfure et de la biotine. La suite de la procédure repose sur la forte affinité entre la biotine et la streptavidine.

Le réactif de biotinylation est hydrosoluble grâce au groupement sulfonate, et réagit avec des amines primaires (-NH<sub>2</sub>), comme les chaînes latérales de la lysine ou avec les amines N-terminales des polypeptides pour former des liaisons amides stables. La charge négative du réactif l'empêche de traverser les membranes cellulaires, ce qui permet la biotinylation des protéines de surface uniquement. Après lyse des cellules, les protéines totales extraites sont incubées avec de la streptavidine qui a une affinité très importante pour la biotine. Ainsi, les protéines biotinylées vont se lier aux billes de streptavidine, et après lavages et élution, les protéines membranaires vont pouvoir être libérées [Figure 29]. En effet, le bras espaceur contient une liaison de disulfure clivable pour le marquage réversible des protéines et des amines primaires de surface cellulaire et ainsi libérer les protéines initialement biotinylées des billes de streptavidine.



**Figure 29 : Schéma du principe de biotinylation des protéines de surface.**

Les HEK293T expriment TRPV4 et plusieurs autres protéines membranaires et intracellulaires. L'incubation avec de la biotine permet sa liaison aux protéines membranaires. Après lyse cellulaire, une partie des protéines est incubée dans une résine d'agarose streptavidine se liant à la biotine et permettant de récupérer les protéines membranaires seules. Une autre partie est conservée contenant à la fois les protéines membranaires et cytosoliques constituant alors les lysats totaux.

## 11.2. Procédure expérimentale

Les cellules HEK293T ont étéensemencées et transfectées dans des plaques 6 puits poly-lysines. Après 24 h, les plaques ont été placées soit en condition d'hypoxie 1 % O<sub>2</sub>, soit laissées en normoxie pour 48 h supplémentaires. Les cellules ont ensuite été détachées en accutase (400-600 unités/mL) et resuspendues après centrifugation dans une solution de PBS froid supplémentée avec 2 mM de CaCl<sub>2</sub> et 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (« PBS complet »). Des centrifugations ont été réalisées entre chaque étape pour culoter les cellules. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 min à 4°C sous agitation dans la solution de PBS complet contenant 0.5 mg/mL de biotine (*EZ-link sulfo-NHS-SS-biotin*) qui se lie aux protéines membranaires. Un échantillon est conservé sans biotine afin de servir de contrôle négatif. Pour inactiver les molécules de biotine libres, les cellules ont été rincées et incubées dans une solution de Tris-HCl 50 mM pendant 20 min à 4°C sous agitation. Après rinçages, les cellules ont été lysées dans un tampon de RIPA supplémenté avec 1 % d'inhibiteurs de protéases, 1 % d'Orthovanadate et 1 % de PMSF (Phénylméthylsulfonyl Fluoride) (« RIPA complet ») et les lysats conservés pendant 30 min dans la glace. Les débris cellulaires ont été éliminés après centrifugation à 15 000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et les protéines dosées par la méthode de Lowry (Bio-Rad 5000111). Des fractions de concentrations égales ont été préparées (350 µg pour les protéines biotinylées et 30 µg pour les protéines totales). Les protéines totales ont été dénaturées dans un tampon de Laemmli (1/3 du volume) contenant 1/10<sup>e</sup> de β-mercaptoéthanol et chauffées à 95°C pendant 10 min. En parallèle, de la streptavidine contenue dans une résine d'agarose a été placée dans des Eppendorf et lavée 3 fois avec du PBS complet puis avec la solution de RIPA complet (centrifugations de 5 min à 3 000 g à 4°C). Les protéines biotinylées ont été ajoutées dans du RIPA complet sur la résine préalablement séchée à l'aide d'une seringue Hamilton, et ont été laissées une nuit à 4°C sous agitation. La biotine se lie alors à la streptavidine, ce qui permettra ensuite de récupérer uniquement les protéines de la membrane plasmique associées à la biotine. L'ensemble de ces protéines biotinylées retenues dans la résine d'agarose streptavidine a été lavé avec du RIPA complet et via 4 centrifugations successives (5 min à 3 000 g à 4°C) puis la résine a été séchée avant l'ajout du tampon de Laemmli. Les protéines ont ensuite été chauffées 10 min à 95°C. Un Western blot a ensuite été réalisé avec un gel gradient 4-20 % acrylamide *stain free* (Biorad).

## 11.3. Western blot

Les protéines ont été séparées par électrophorèse pendant 1 h 30. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (*TransBlot Turbo Midi size nitrocellulose* BioRad – 7 min).

Les sites non spécifiques ont ensuite été saturés par incubation au TBS-T (*Tris Buffer Saline-Tween*, TBS 10X (Tris Base NaCl, Tween 0.1 %, H<sub>2</sub>O MilliQ) contenant 5 % de lait écrémé en poudre. Puis les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre TRPV4 produit chez le lapin au 1/500<sup>e</sup> (Abcam ab191580) à 4°C pendant une nuit. Après 3 rinçages de 10 min avec du TBS-T, les membranes ont été incubées 2 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire produit chez la chèvre anti-Ig de lapin couplé à la HRP au 1/5000<sup>e</sup> (*Horse radish peroxidase* Vector Labs PI1000). Enfin, la révélation a été réalisée en présence du réactif chimio-luminescent ECL (*Enhanced Chemiluminescence* BioRad) grâce à un système de révélation ChemiDoc (BioRad). L'analyse et la quantification ont été réalisées avec le logiciel Image Lab et la normalisation a été faite par rapport au *stain free* dont le composé photo-activable aux UV permet de visualiser l'ensemble des protéines présentes sur le gel.

## 11.4. Analyses

La quantification a été réalisée sur le logiciel Image Lab de Bio-Rad. Le ratio TRPV4 membranaire / TRPV4 total a été évalué pour chaque condition avec normalisation par rapport au *stain free*.

## 12. Statistiques

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  déviation standard (SD). Pour comparer les moyennes d'un nombre d'échantillon faible ou ne suivant pas une distribution Gaussienne, des tests non paramétriques ont été utilisés. La comparaison de 2 groupes a été faite avec des tests Mann-Whitney, et pour plus de 2 groupes, des tests Kruskal-Wallis ont été utilisés, suivis de tests post-hoc de comparaison multiple de Dunn. Pour comparer des effectifs, des tests de  $\chi^2$  ont été réalisés. Les différences sont considérées comme significatives quand  $P < 0.05$  et indiquées par une astérisque \*, \*\* pour  $P < 0.01$  et \*\*\* pour  $P < 0.001$ . Les différences non significatives sont notées ns.



## **RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

# **1. Effet de l'hypoxie sur TRPV4 selon la confluence cellulaire**

## **1.1. Contexte**

TRPV4 est un canal polymodal pouvant être activé par différents stimuli, dont des stimuli mécaniques. Son activité est augmentée suite à une hypoxie chronique dans des CMLAP de rats [18, 68] entraînant une dérégulation de l'homéostasie calcique pouvant mener à une prolifération et migration des cellules, des phénomènes impliqués dans l'HTP. Or, des études suggèrent que la confluence cellulaire modifie la rigidité membranaire [116, 123]. Une modification de cette rigidité membranaire pourrait donc affecter l'activité de canaux mécanosensibles comme TRPV4. Ainsi, la densité cellulaire à laquelle sont cultivées les cellules, pourrait être cruciale dans la modulation des SAC. Nous avons donc étudié l'influence de la confluence cellulaire sur la modulation de l'activité de TRPV4 en réponse à l'hypoxie. Pour cela, les réponses calciques et les courants activés par l'agoniste de TRPV4, le GSK1016790A (GSK), ont été mesurés sur des cellules HEK293T cultivées soit à faible confluence, soit à forte confluence en conditions de normoxie et d'hypoxie chronique. La localisation de TRPV4 a ensuite été évaluée dans ces différentes conditions afin de mettre en évidence une éventuelle relocalisation du canal. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication parue dans *Biomolecules* en juillet 2022 et intitulée *Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia* [137]. Ils sont présentés ci-dessous sous forme d'article.

## **1.2. La confluence cellulaire module l'activité de TRPV4 en réponse à l'hypoxie**

Article

# Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia

Solène Barbeau<sup>1,2</sup>, Alexandre Joushomme<sup>3,4,†</sup>, Yann Chappe<sup>3,4,†</sup>, Guillaume Cardouat<sup>1,2</sup>, Isabelle Baudrimont<sup>1,2</sup>, Véronique Freund-Michel<sup>1,2</sup>, Christelle Guibert<sup>1,2</sup>, Roger Marthan<sup>1,2,5</sup>, Patrick Berger<sup>1,2,5</sup>, Pierre Vacher<sup>1,2</sup>, Yann Percherancier<sup>3,4</sup>, Jean-François Quignard<sup>1,2</sup> and Thomas Ducret<sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Univ. Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France; solene.barbeau@u-bordeaux.fr (S.B.); guillaume.cardouat@u-bordeaux.fr (G.C.); isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr (I.B.); veronique.michel@u-bordeaux.fr (V.F.-M.); christelle.guibert@u-bordeaux.fr (C.G.); roger.marthan@u-bordeaux.fr (R.M.); patrick.berger@u-bordeaux.fr (P.B.); pierre.vacher@inserm.fr (P.V.); jean-francois.quignard@u-bordeaux.fr (J.-F.Q.)
  - <sup>2</sup> INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France
  - <sup>3</sup> Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, UMR5518, Univ. Bordeaux, F-33400 Talence, France; alexandre.joushomme@u-bordeaux.fr (A.J.); yann.chappe@u-bordeaux.fr (Y.C.); yann.percherancier@u-bordeaux.fr (Y.P.)
  - <sup>4</sup> CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), Laboratoire de L'integration du Matériau au Système, UMR5518, F-33400 Talence, France
  - <sup>5</sup> CHU (Centre Hospitalier Universitaire) Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, F-33600 Pessac, France
- \* Correspondence: thomas.ducret@u-bordeaux.fr  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Barbeau, S.; Joushomme, A.; Chappe, Y.; Cardouat, G.; Baudrimont, I.; Freund-Michel, V.; Guibert, C.; Marthan, R.; Berger, P.; Vacher, P.; et al. Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia. *Biomolecules* **2022**, *12*, 954. <https://doi.org/10.3390/biom12070954>

Academic Editors: Jeffrey Stuart and Fereshteh Moradi

Received: 13 May 2022

Accepted: 14 June 2022

Published: 7 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is a polymodal Ca<sup>2+</sup>-permeable channel involved in various hypoxia-sensitive pathophysiological phenomena. Different tools are available to study channel activity, requiring cells to be cultured at specific optimal densities. In the present study, we examined if cell density may influence the effect of hypoxia on TRPV4 activity. Transiently TRPV4-transfected HEK293T cells were seeded at low or high densities corresponding to non-confluent or confluent cells, respectively, on the day of experiments, and cultured under in vitro normoxia or hypoxia. TRPV4-mediated cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses, single-channel currents, and Ca<sup>2+</sup> influx through the channel were measured using Ca<sup>2+</sup> imaging/microspectrofluorimetric assay, patch-clamp, and Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET), respectively. TRPV4 plasma membrane translocation was studied using confocal microscopy, biotinylation of cell surface proteins, and BRET. Our results show that hypoxia exposure has a differential effect on TRPV4 activation depending on cell confluence. At low confluence levels, TRPV4 response is increased in hypoxia, whereas at high confluence levels, TRPV4 response is strongly inhibited, due to channel internalization. Thus, cell density appears to be a crucial parameter for TRPV4 channel activity.

**Keywords:** BRET; calcium; cell culture conditions; cell density; patch-clamp; stretch-activated channel; TRP channel

## 1. Introduction

Transient receptor potential (TRP) channels constitute a superfamily of non-selective cationic channels that exhibit a common structure. They are composed of N- and C-terminal regions containing protein interaction motifs and six transmembrane domains (TM1-TM6). The putative ion conducting pore is located between the fifth and sixth TM domains. According to their activation stimuli and the presence of regulatory domains on the cytosolic

N- and C-termini, the TRP superfamily is subdivided into seven main subfamilies: TRPC1-7 (Canonical), TRPV1-6 (Vanilloid), TRPM1-8 (Melastatin), TRPP1-4 (Polycystin), TRPML1-3 (Mucolipin), TRPA1 (Ankyrin), and TRPN (no mechanoreceptor potential C, also named NOMPC). Functional TRPs are composed of four homo- or heteromultimeric subunits.

Among TRPV channels, TRPV4 is a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel whose expression in mammals is widespread throughout the body: ear, eye, skin, cardiovascular, digestive, immune, musculoskeletal, nervous, reproductive, and respiratory systems (for review see [1]). Due to its  $\text{Ca}^{2+}$  permeability ( $\text{PCa}/\text{PNa} \approx 7$  in HEK293 cells transiently transfected with wild type TRPV4, [2]), activation of TRPV4 induces an increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) which plays a key role in fundamental cellular processes such as apoptosis, contraction, migration, and proliferation in many cell types. Thus, owing to its ubiquitous expression and its role in mediating  $\text{Ca}^{2+}$  influx, it is now recognized that TRPV4 supports a great number of roles in various physiological and disease states [3].

A wide variety of stimuli, including physical (cell swelling and shear stress), thermal (moderate heat), and chemical (endogenous and exogenous ligands) stimuli such as the arachidonic acid metabolite epoxyeicosatrienoic acid and the synthetic agonist GSK-1016790A, in particular [4], activate TRPV4. In addition, other modulatory intermediates affect the channel function. Indeed, a range of phosphorylations or protein-protein interactions affect the sensitivity to gating stimuli or channel trafficking. For example, in TRPV4 transfected HEK293 cells, the serine/threonine protein kinases A and C (PKA and PKC) modulate the gating of the channel by cell swelling [5]. In the same cellular model (neurons), plasma membrane localization of TRPV4 is also modulated by the cytoskeletal protein kinase C and casein kinase substrate (PACSIN 3) [6], the ubiquitin ligase AIP4 [7], the ubiquitously expressed endoplasmic reticulum-associated protein OS-9 [8], the stromal interaction molecule 1 (STIM1) [9], or the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [10]. Moreover, several studies show a modulatory role of hypoxia on TRPV4 channel function, which occurs, not only in a variety of chronic lung diseases [11], but also in other organ systems and related diseases [12]. Indeed, TRPV4 activity is increased by hypoxic stimuli in rat pulmonary arterial smooth muscle cells [13–15], human umbilical vascular endothelial cells [16], rat hippocampal astrocytes [17], human SH-SY5Y neuroblastoma cell line [18], rat heart tissue-derived H9C2 cardiac myoblast cell line, and neonatal rat ventricle myocytes [19].

Whereas TRPV4 is obviously mechanosensitive [20], there is additional evidence that parameters such as confluence for adherent cells affect whole-cell mechanical behaviour, e.g., confluent fibroblastic cells were 50% stiffer than non-confluent ones [21]. Therefore, culture conditions under which the cell seeding is performed may modulate the functionality of the channel. Thus, in the present study, we investigated the influence of cell density on the effect of hypoxia on TRPV4 activity. We sought to compare TRPV4-induced cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  responses ( $\text{Ca}^{2+}$  imaging and microspectrofluorimetric assay) and single channel activity (patch-clamp technique in cell-attached configuration) in transiently TRPV4-transfected HEK293T cells seeded at low (non-confluent cells) and high (confluent cells) densities, and cultured under in vitro normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) or hypoxia (1%  $\text{O}_2$ ) for 48 h. Note that in this study, the terms “normoxia” and “hypoxia” are used to distinguish between the various levels of oxygenation in the incubator. Thus, “normoxia” corresponds to atmospheric oxygen pressure, the commonly used oxygen pressure for cell cultures, but not to “tissue normoxia” also called “physioxia” which is characteristic of each tissue [22].

Direct  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the channel was measured using an intramolecular Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) probe in which the TRPV4 channel was fused to a BRET sensor with high affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  (Calflux-VTN) [23]. TRPV4 plasma membrane translocation was studied using confocal microscopy, cell surface biotinylation of proteins, and bystander BRET in which TRPV4 channel membrane density was monitored [24]. Our results show that hypoxia exposure has a differential effect on TRPV4 activation depending on cell confluence. At low confluence levels, hypoxia increases TRPV4 response, whereas at

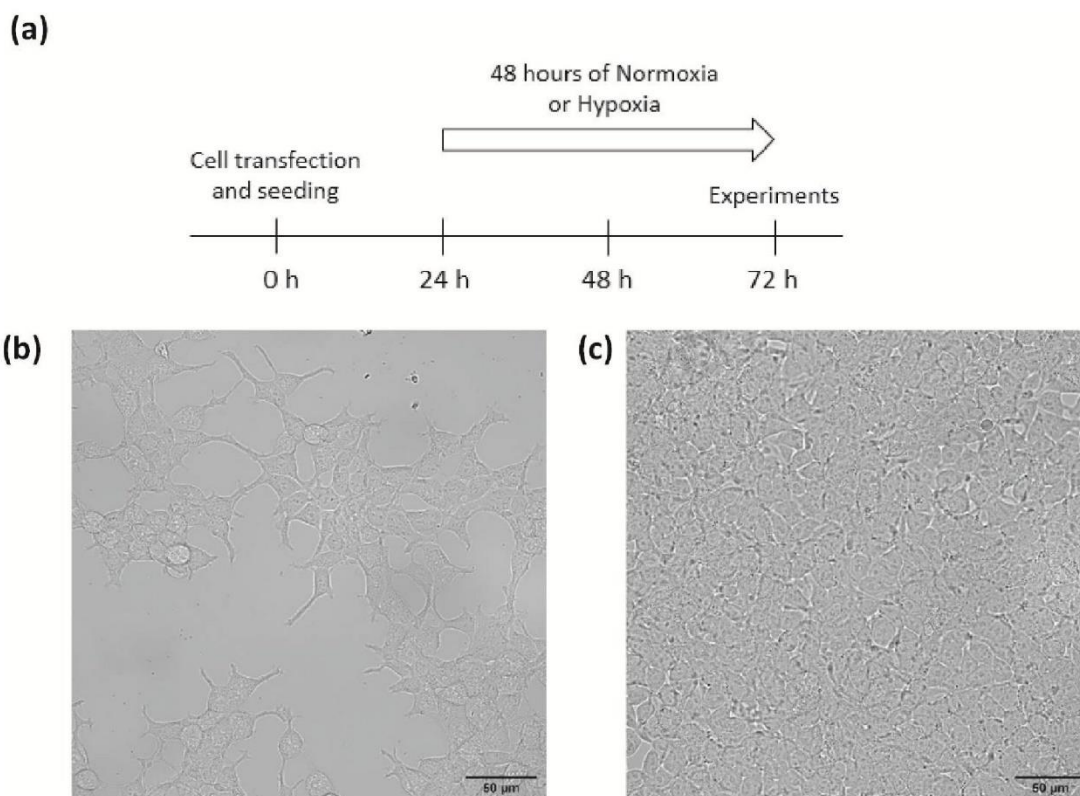


high confluence levels, TRPV4 response is strongly inhibited, due to channel internalization. Thus, cell density appears to be a crucial parameter for TRPV4 channel activity.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Culture

Transiently transfected HEK293T were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 1% nonessential amino acids, and 10% foetal bovine serum (FBS). In order to test the influence of cell density, cells were seeded on adequate support, either at a density of  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, referred to as the low-density (LD) condition, or at a density of  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>, referred to as the high-density (HD) condition, corresponding to non-confluent or confluent cells, respectively, on the day of experiments, after 72 h of culture: 24 h of transfection plus 48 h of normoxia or hypoxia (Figure 1). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere gassed with 5% CO<sub>2</sub>. HEK293T from control group ("normoxia") were exposed to a gas mixture containing 21% O<sub>2</sub>, 74% N<sub>2</sub>, and 5% CO<sub>2</sub>. Cells from the hypoxia group were exposed to a gas mixture containing 1% O<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>, and 5% CO<sub>2</sub> ("hypoxia") for 48 h in a tri-gas incubator (Heracell 150i, ThermoScientific, Saint Herblain, France).



**Figure 1.** Cell culture conditions (a) timeline protocol for cell experiments, (b,c) representative phase-contrast fields of HEK293T cells seeded at (b) low ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) or (c) high ( $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) densities after 72 h of culture. Scale bar = 50 μm (magnification 40×).

### 2.2. Plasmids and Transfection

To generate the BRET constructs, mNeonGreen (mNeonG) and nanoluciferase (nLuc) were mainly used to improve the brightness of the assay and are referred to as mNeonG and nLuc in the rest of this paper. For confocal microscopy, TRPV4-YFP and non-tagged TRPV4



were used in biotinylation and calcium assays, respectively in order to keep native structure and avoid signal interference of the fluorophore with the Fura emitting wavelength during the calcium test.

Mammalian expression vectors for the mNeonG-TRPV4-nLuc has been previously described in [25]. The mammalian expression vector encoding the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 fusion protein was constructed using cDNA “bricks”, obtained by gene synthesis (Genescript, Leiden, The Netherlands), that contains the cDNA sequences for mNeonG (bricks 1.1), the calflux calcium ion sensor (Calflux, brick 1.2), nLuc (brick 1.3) and TRPV4 ion channel (brick 2 and 3) as indicated in Supplementary Figure S1. The corresponding sequences are given in Supplementary Table S1.

A similar strategy was used to construct TRPV4-YFP, TRPV4-nLuc, and non-tagged TRPV4 with cDNA bricks that encode empty cDNA bricks (brick 1), to rebuild the Kozak sequence before ATG and TRPV4 ion channel (bricks 2 and 3) and YFP, nLuc, or Stop (brick 4) (Supplementary Figure S1 and Supplementary Table S1).

To construct vectors encoding mNeonG-CAAX fusion proteins, in order to evaluate TRPV4 endocytosis by measuring the decrease in the non-specific BRET (bystander BRET), we used cDNA bricks containing mNeonGreen (brick 1), and CAAX (brick 2). All brick sequences are given in Supplementary Table S1 and were provided as cDNA cloned into a pUC-Kana vector devoid of BsmBI restriction sites (Genescript).

Using the BsmBI type IIS enzyme and T4 DNA ligase, the cDNA bricks were assembled in frame and in the right order into pcDNA3.1(+)-Lac Z vector, which allowed direct visualization of the assembly efficiency using a colorimetric test based on alpha complementation. Briefly, a ligation mix containing 2  $\mu$ L of T4 DNA ligase buffer 10X, 1 U of BsmBI enzyme, 1 U of T4 DNA ligase, 0.4 mM ATP, 4 mM dithiothreitol, 200 ng of pcDNA3.1(+)-Lac Z vector, and 100 ng of each brick needed to obtain the cited final construct. Then the mix was subjected to 35–40 cycles alternating two steps (step 1: 37 °C for 1 min, step 2: 16 °C for 1 min) before the enzymes were inactivated for 5 min at 55 °C. The ligation mix was then used to transform *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  by thermal shock to amplify the plasmids.

The day of transfection, cells were trypsinized and transient transfections were performed on suspended cells using polyethylenimine (PEI, linear, Mr 25,000; Polysciences, Warrington, PA, USA) with a PEI/DNA ratio of 4:1, as already described in [26]. For patch-clamp and Ca<sup>2+</sup> assays, TRPV4 WT or other BRET probes were transfected with 0.1  $\mu$ g of the corresponding expression vector and 1.9  $\mu$ g of empty pcDNA3.1(+) vector for a 6-well plate equivalent. For confocal imaging, TRPV4-YFP was transfected with 0.25  $\mu$ g of the corresponding expression vector and 1.75  $\mu$ g of empty pcDNA3.1(+) vector for a 6-well plate equivalent. When intramolecular BRET assays were performed using Calflux BRET sensor N-terminally fused to TRPV4, HEK293T cells were transfected with 0.01  $\mu$ g of the corresponding expression vector and 2  $\mu$ g of empty pcDNA3.1(+) vector. Alternatively, HEK293T cells were transfected with 0.01  $\mu$ g of TRPV4-nLuc expression vector and 2  $\mu$ g of mNeonG-CAAX expression vector for intermolecular BRET assays. Resuspended cells were seeded on adequate support (glass coverslips, Petri dishes, or 96-well plates) at low or high densities.

### 2.3. Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Measurements

Variations in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> were determined using the Fura-2-LR/AM and Fluo-4/AM dyes. Briefly, for single cell measurements, cells seeded on glass coverslips were incubated with 5  $\mu$ M Fura-2-LR/AM in Krebs-HEPES solution (see composition below) at 37 °C for 30 min, then washed and maintained in the same saline solution before fluorescence measurements. Cells were placed in a chamber of an inverted epifluorescence microscope (Nikon, Eclipse Ti2-U) equipped with a Nikon Apo Plan x40/1.3 NA oil immersion objective. Digital images were sampled at 16-bit resolution by a fast-scan digital camera (Hamamatsu, ORCA-Flash4.0 LT+). Fura-2-LR was alternately excited at 340 and 380 nm using a pE-340 Fura illuminator (CoolLED). The ratio R<sub>340/380</sub> of the fluorescence intensity emitted at

510 nm at the two excitation wavelengths was calculated. Regions of interest were drawn around each cell to detect cellular ratio variations. The amplitude of the calcium rise was determined as the maximum  $\Delta R_{340/380}$  reached during the recording time, i.e., between 30 and 420 s (corresponding to time after GSK1016790A application), depending on the cells. Imaging was controlled by NIS-Elements AR 5.3 imaging software (Nikon, Champigny sur Marne, France). All the images were background subtracted. These measurements allowed determining the percentage of responding cells, and then, their selection for analyses.

For cell population measurements, cells seeded in 96-well plates were incubated with 2  $\mu$ M Fluo-4/AM in Krebs-HEPES solution at 37 °C for 30 min, then washed and maintained in the same saline solution before the fluorescence measurements. The Fluo-4/AM fluorescence intensity was measured at 485/520 nm (excitation/emission) using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France), in the same conditions as BRET measurements.  $\Delta(F/F_0)$  represents the difference between F/F<sub>0</sub> and the basal F/F<sub>0</sub> measured without GSK.

When mentioned, the TRPV4 inhibitor, HC067047, was added at 1  $\mu$ M final concentration to the extracellular solution 30 min before the ejection of TRPV4 agonist, GSK1016790A, in the bathing solution at concentrations mentioned in the text.

#### 2.4. Electrophysiological Recordings

Single-channel activity was recorded from cell-attached patches using the technique described by Hamill et al. [27]. The electrodes were pulled on a DMZ-Universal puller (Zeitz Instruments) in two stages from borosilicate glass capillaries (1.5 mm OD, 1.16 mm ID, Harvard Apparatus). The pipettes had a mean resistance of 5–7 M $\Omega$  when measured in standard recording conditions. Cells seeded on Petri dishes were viewed under phase contrast with a Nikon Diaphot inverted microscope. A RK 400 patch amplifier (Biologic) was used for cell-attached recordings. Channel activity was recorded over 60 s (one series of 60 sweeps of 1 s). Stimulus control, data acquisition, and processing were carried out on a computer fitted with a Digidata 1550 interface, using Clampex v11 software (Molecular Devices, Foster City, CA, USA). Current records were filtered with a HumSilencer noise eliminator (Molecular Devices). Data were analysed using Clampfit v11 software (Molecular Devices). GSK1016790A was applied to the recorded cell via the recording pipette in absence or presence of HC067047 in the pipette solution and bathing solution.

#### 2.5. Confocal Imaging

TRPV4-YFP and mNeonG-CAAX transfected HEK293T seeded in 96-well plates were observed as “living cells” under a Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning microscope using a Nikon Apo Plan x60/1.4 NA oil immersion objective (excitation wavelength 488 nm; emitted fluorescence recorded at 500–530 nm).

#### 2.6. Cell Surface Biotinylation

Cells, seeded on 6-well plates coated with polylysine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), were detached with accutase (400–600 units/mL from Sigma) and resuspended after centrifugation in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Centrifugations were performed between each step to pellet cells. They were labelled for 30 min at 4 °C with membrane-impermeable EZ-link NHS-SS-biotin (0.5 mg/mL, Pierce, 21331) to biotinylate surface proteins. Afterward, the unconjugated biotin was quenched for 20 min at 4 °C with 50 mM Tris-HCl in PBS, and the cells were lysed in RIPA lysis buffer system supplemented with protease inhibitor cocktail (1:100), sodium orthovanadate (1:100), and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Sc-24948) for 30 min at 4 °C. Insoluble materials were then removed by centrifugation at 15,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C, and the amount of protein was assessed by the Lowry method (Bio-Rad, 5000111, Marnes-la-Coquette, France). Equal amounts of proteins were incubated with streptavidin-agarose beads (Pierce, 20353, Rockford, IL, USA) at 4 °C overnight. The biotinylated proteins were then eluted by boiling for 10 min at 95 °C



in Laemmli sample buffer (Bio-Rad, 1610747) supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol. Cell lysates of 30  $\mu$ g total or of 350  $\mu$ g biotinylated proteins were used for Western blot analysis.

Proteins were loaded onto a 4–20% acrylamide gel and resolved by electrophoresis. The proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes using the Trans-Blot Turbo Transfer System. After saturation for 1 h using 0.1% TBS-Tween and 5% nonfat milk, membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody anti-TRPV4, (AB191580, 1:1000, Abcam, Paris, France). The membranes were then treated with the corresponding horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (P11000, 1:10,000, Vector) for 1 h at room temperature. Membranes were processed for chemiluminescent detection using horseradish peroxidase substrate (Millipore, Molsheim, France) according to the manufacturer's instructions. Immunoblots were then revealed and acquired using a Bio-Rad ChemiDoc XRS+ System. Images were quantified using Image Laboratory software (Bio-Rad). Equal protein loading was verified using the stain-free method.

## 2.7. BRET Measurements

### 2.7.1. Filter-Based BRET Assays

BRET signals emitted by the total cell population in each well of 96-well plates were measured using a multidetector TriStar2 LB942 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) with emission filters centred at  $460 \pm 20$  nm for nLuc (energy donor) and  $510 \pm 40$  nm for mNeonG (energy acceptor). The BRET signal was determined by calculating the ratio of the emission intensity measured in the acceptor window ( $I_{\text{acceptor}}$ ) over the emission intensity measured in the donor window ( $I_{\text{donor}}$ ), according to "BRET" =  $I_{\text{acceptor}}/I_{\text{donor}}$ .

Due to the overlapping emission spectra of nLuc and mNeonG, a fraction of the light detected in the mNeonG filter originates from the nLuc emission, resulting in a contaminating signal [28]. In that configuration, the net BRET was therefore defined as the BRET ratio of cells co-expressing nLuc and mNeonG constructs minus the BRET ratio of cells expressing only the nLuc construct in the same experiment.

To assess the functionality of TRPV4 channel BRET-based probes, Furimazine, the substrate for BRET reaction, was added (diluted at 1/500 in the well) and incubated for 30 min before TRPV4 agonist was injected in the presence or absence of TRPV4 inhibitor. BRET signals were measured in DMEM w/o red phenol, 5 min after the addition of GSK1016790A, a TRPV4 agonist.

### 2.7.2. Spectral BRET Assays

Full BRET spectra were acquired using an optical fibre linked to a spectrometer (Iso-Plane SCT320, TELEDYNE, Lisse, France) equipped with a liquid-nitrogen-cooled charge-coupled device camera for recording the full visible spectrum (BLAZE 400, TELEDYNE). The bioluminescent signal was recorded from transfected cells seeded on glass coverslips and placed into an opaque home-made measurement chamber. Using the LabView programming language (National Instruments), an interface was developed to acquire the bioluminescent spectra and perform real-time spectral decomposition of the BRET signal into its various components, as described in [29].

## 2.8. Recording Solutions

The standard Krebs-HEPES extracellular solution contained (in mM): 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 D-glucose, and 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES). The osmolality (measured with a cryosmometer type 15 Löser/Fisher Scientific, Illkirch, France) of the external salt solution was adjusted to 310 mosm/kg with mannitol, and pH adjusted to 7.4 with NaOH.

For the cell-attached patch clamp recording, the bathing solution had the following composition (in mM): 140 KCl, 2.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 14 D-glucose, and 10 HEPES (osmolality: 310 mosm/kg; pH = 7.4, adjusted with KOH). The recording pipette was filled with a

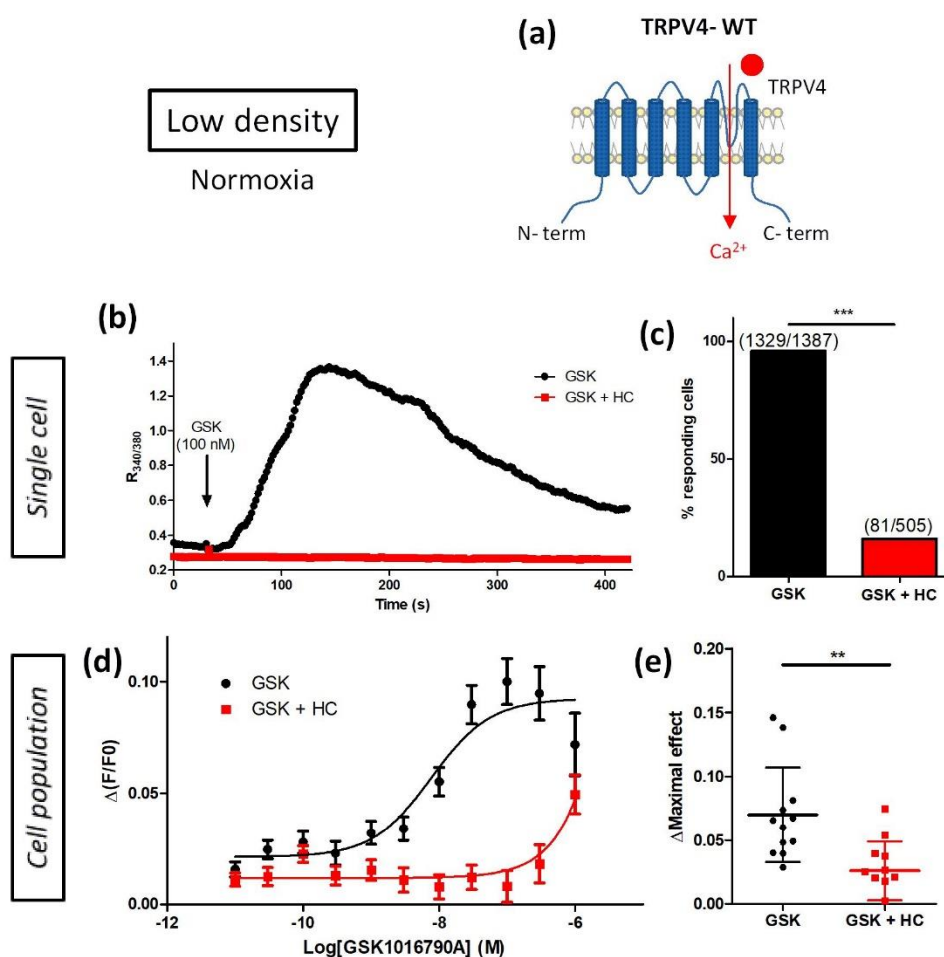
solution containing (in mM): 140 NaCl, 2.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 14 D-glucose, 10 HEPES, and 10 tetraethylammonium chloride (TEA), (osmolality: 310 mosm/kg; pH = 7.4).

### 2.9. Reagents

General salts were from VWR. All other chemicals were purchased from Sigma, except FBS (Eurobio, Les Ulis, France), and flurimazine which was obtained from Promega. GSK1016790A and HC067047 were dissolved in DMSO and diluted 1:2000 in the bath to the final mentioned concentrations. At this dilution, the solvent (DMSO) alone had no effect on channel activity.

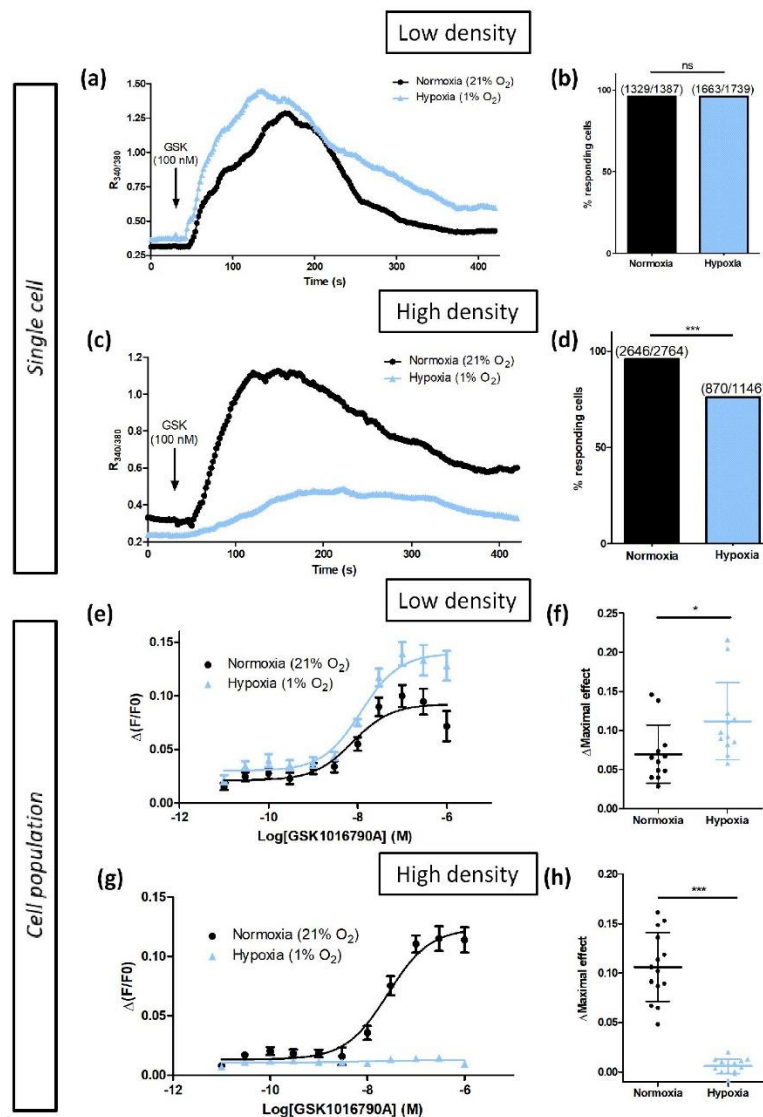
### 2.10. Data and Statistical Analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The n number of responsive cells (Figures 2 and 3) is indicated in each bar graph figure. A Mann–Whitney test was used to determine statistical significance between two groups. A Kruskal–Wallis followed by Dunn test was used to compare multiple groups. Comparison of cell response proportions was performed with a chi-squared test. Differences with  $p < 0.05$  were considered significant. Statistical analysis was performed with the Prism 5 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).



**Figure 2.** Characterization of TRPV4 Ca<sup>2+</sup> response in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells cultured under normoxia at low density ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>). (a) Schematic representation

of TRPV4-WT. (b,c) Variations of relative cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration (Ratio  $R_{340/380}$ ) were monitored by single-cell fluorescence videomicroscopy in Fura-2-LR/AM loaded cells. HEK-TRPV4 were bathed in physiological saline solution in absence or presence of the specific TRPV4 inhibitor HC067047 (HC, 1  $\mu$ M). (b) Typical recordings of single cells when GSK1016790A (GSK, 100 nM), a selective TRPV4 agonist, was added at 30 s (as indicated by the arrow), and (c) percentage of responding cells in response to GSK. (d,e) Variations in relative cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration (F/F<sub>0</sub>) were monitored using a microplate spectrophotometer reader in Fluo-4/AM loaded cells. (d)  $\Delta$ (F/F<sub>0</sub>) concentration–response curves to GSK1016790A in presence or absence of HC067047 (1  $\mu$ M) and (e) maximal concentration–response curve amplitude ( $\Delta$ Maximal effect). Data are expressed as mean value  $\pm$  SD. The number of cells (c) is indicated in brackets. Significant difference is indicated by two asterisks when  $p < 0.01$  and three asterisks when  $p < 0.001$ , Mann–Whitney or chi-squared test.



**Figure 3.** Hypoxia only potentiates TRPV4-induced  $Ca^{2+}$  responses in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells cultured at low density ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>). (a–d) Variations of relative



cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Ratio  $R_{340/380}$ ) were monitored by single-cell fluorescence videomicroscopy in Fura-2-LR/AM loaded cells grown under normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) or hypoxia (1%  $\text{O}_2$ ) for 48 h. (a) Typical recordings of single cells when HEK-TRPV4 were bathed in physiological saline solution and GSK1016790A (GSK, 100 nM), a selective TRPV4 agonist, was added at 30 s (as indicated by the arrow), and (b) percentage of responding cells in response to GSK at low density. (c) Typical recordings of single cells when HEK-TRPV4 were bathed in physiological saline solution and GSK1016790A (GSK, 100 nM), a selective TRPV4 agonist, was added at 30 s (as indicated by the arrow), and (d) percentage of responding cells in response to GSK at high density. (e–h) Variations of relative cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (F/F0) were monitored using a microplate spectrophotometer reader in Fluo-4/AM loaded cells grown in normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) or hypoxia (1%  $\text{O}_2$ ) for 48 h.  $\Delta(F/F0)$  concentration–response curves to GSK1016790A at (e) low and (g) high densities, and maximal concentration–response curve amplitude ( $\Delta\text{Maximal effect}$ ) at (f) low and (h) high densities. Data are expressed as mean value  $\pm$  SD. The number of cells (b–d) is indicated in brackets. Significant difference is indicated by one asterisk when  $p < 0.05$ , three asterisks when  $p < 0.001$ , and ns indicates a non-significant difference, Mann–Whitney or chi-squared test.

### 3. Results

#### 3.1. Modulation of Hypoxia-Sensitive TRPV4-Induced $\text{Ca}^{2+}$ Response by Cell Density

##### 3.1.1. Characterization of TRPV4 $\text{Ca}^{2+}$ Response

First, to characterize TRPV4-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells (Figure 2a), experiments were performed using its specific agonist GSK1016790A (GSK) and inhibitor HC067047 (HC) (Figure 2). When cells were cultured at low density (LD), under normoxia, in response to GSK (100 nM), the ratio  $R_{340/380}$  of the emitted fluorescence intensity, measured in single-cell  $\text{Ca}^{2+}$  imaging with Fura-2-LR/AM ratiometric probe, rapidly increased in 96% of stimulated cells (Figure 2b,c). This response was strongly inhibited in the presence of HC (1  $\mu\text{M}$ ) where only 16% of cells responded (Figure 2b,c) with an amplitude ( $\Delta R_{340/380}$ ) of  $0.094 \pm 0.043$  ( $n = 81$  cells) instead of  $1.030 \pm 0.861$  ( $n = 1329$  cells) in the absence of inhibitor, respectively. In  $\text{Ca}^{2+}$  measurements with Fluo-4/AM non-ratiometric probe (cell population), TRPV4-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response was also increased with the agonist in a concentration-dependant manner ( $\text{EC}_{50} = 8.7 \pm 5.5$  nM,  $n = 12$  independent experiments). As expected, pre-treatment with 1  $\mu\text{M}$  HC dramatically right-shifted the apparent potency of GSK to trigger a  $\text{Ca}^{2+}$ -influx (Figure 2d,e). As already described [18], these results confirmed that GSK-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses were TRPV4 specific in HEK-TRPV4.

##### 3.1.2. Hypoxia Potentiates TRPV4-Induced $\text{Ca}^{2+}$ Responses in Low-Density Cultured Cells

Previous studies have shown that prolonged hypoxia exposure occurring particularly, but not exclusively, in a variety of chronic lung diseases, increases TRPV4 activity in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) [13,14]. Moreover, a similar response was observed when PASMC were cultured under in vitro hypoxia (1%  $\text{O}_2$  for 48 h) [15]. We therefore tested whether this potentiating effect of hypoxia could be measured on the ectopically-expressed TRPV4 channel. For this purpose, TRPV4-transfected HEK293T cells were cultured under hypoxia (1%  $\text{O}_2$  for 48 h) at LD, a density commonly used for single-cell  $\text{Ca}^{2+}$  imaging studies. As expected, in hypoxic cells, the basal intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level was increased in single-cell  $\text{Ca}^{2+}$  imaging with a Fura-2-LR/AM ratiometric probe (Figure 3a,b). The amplitude of TRPV4-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  response was also greater:  $\Delta R_{340/380} = 1.053 \pm 1.169$  ( $n = 1663$  cells) and  $\Delta R_{340/380} = 1.030 \pm 0.861$  ( $n = 1329$  cells) in hypoxic and normoxic cells, respectively. Accordingly, in the concentration–response curve to GSK with Fluo-4/AM non-ratiometric probe (cell population), the amplitude of TRPV4  $\text{Ca}^{2+}$  response was increased by 61% in hypoxia without modification of  $\text{EC}_{50}$  (Figure 3e,f). These results show that hypoxia potentiates TRPV4  $\text{Ca}^{2+}$  responses in HEK-TRPV4 cells cultured at LD.

### 3.1.3. Cell Confluence Alters Hypoxia-Induced TRPV4 Ca<sup>2+</sup> Response Potentiation

Although being mechanosensitive, TRPV4 modulation by cell-to-cell contact has not been investigated in previous studies. Thus, the effect of hypoxia exposure on TRPV4 Ca<sup>2+</sup> response was evaluated in HEK293T cells cultured at high density (HD) to determine whether cell confluence is a determining parameter. Surprisingly, in TRPV4-transfected HEK293T cultured under hypoxia at HD, basal intracellular Ca<sup>2+</sup> level was decreased in single-cell Ca<sup>2+</sup> imaging with Fura-2-LR/AM ratiometric probe (Figure 3c,d). The amplitude of TRPV4 response to GSK was also smaller:  $\Delta R_{340/380} = 0.327 \pm 0.245$  (n = 870 cells) and  $\Delta R_{340/380} = 0.827 \pm 0.800$  (n = 2646 cells) in hypoxic and normoxic cells, respectively, as well as the percentage of responding cells. Accordingly, in concentration–response to GSK with Fluo-4/AM non-ratiometric probe (cell population), the amplitude of TRPV4 Ca<sup>2+</sup> response was drastically diminished under hypoxia (Figure 3g,h). Unexpectedly, these results show that hypoxia inhibits TRPV4 Ca<sup>2+</sup> responses to GSK in TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at HD. Thus, these data draw attention to the importance of cell confluence during in vitro experiments, being a cause of altered TRPV4 Ca<sup>2+</sup> response.

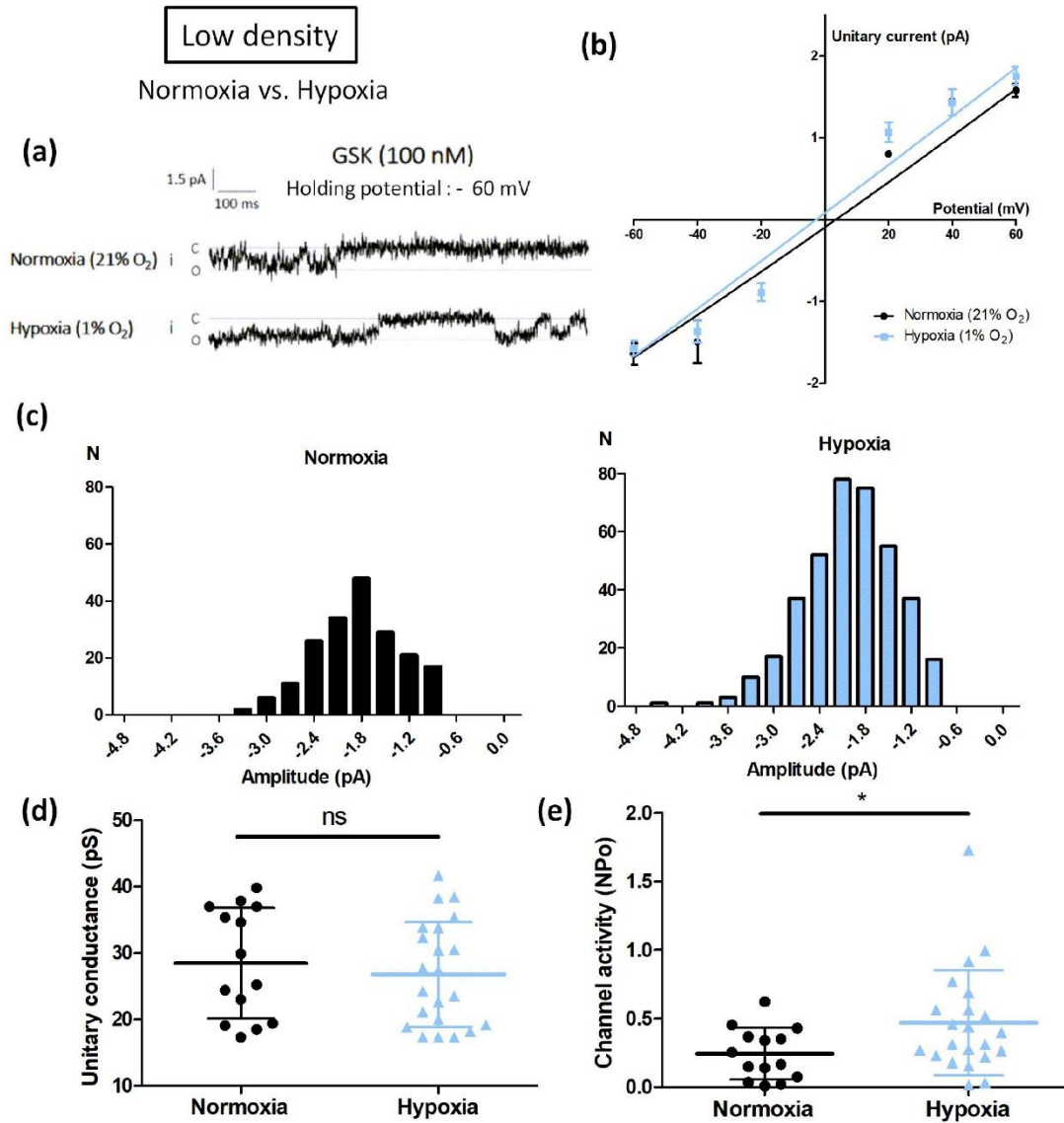
## 3.2. Modulation of Hypoxia-Sensitive TRPV4 Currents by Cell Density

### 3.2.1. Hypoxia Potentiates TRPV4 Currents in Low-Density Cultured Cells

We then sought to confirm this first set of results by using a second technique to study the activity of the TRPV4 channel. We thus investigated the effect of in vitro exposure to hypoxia (1% O<sub>2</sub> for 48 h) on single TRPV4 current using cell-attached patch-clamp recording in TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at LD. Holding potentials were applied from null resting membrane potential obtained using high potassium (140 mM) containing bath solution. Single channel activity was evaluated in presence of GSK (100 nM) inside the patch pipette and unitary current/voltage curves were drawn for normoxic and hypoxic cells (Figure 4a,b). Unitary TRPV4 currents were then analysed at -60 mV holding potential. Conductance and open probability were determined. Whereas hypoxia did not alter TRPV4 unitary conductance ( $28.5 \pm 8.3$  pS (n = 14 cells) and  $26.8 \pm 7.9$  pS (n = 22 cells) for normoxic and hypoxic cells, respectively (Figure 4c,d)), channel activity was increased 1.9-fold (Figure 4e). Thus, as expected, in cells cultured at LD under hypoxia, TRPV4 channel activity was potentiated by these culture conditions.

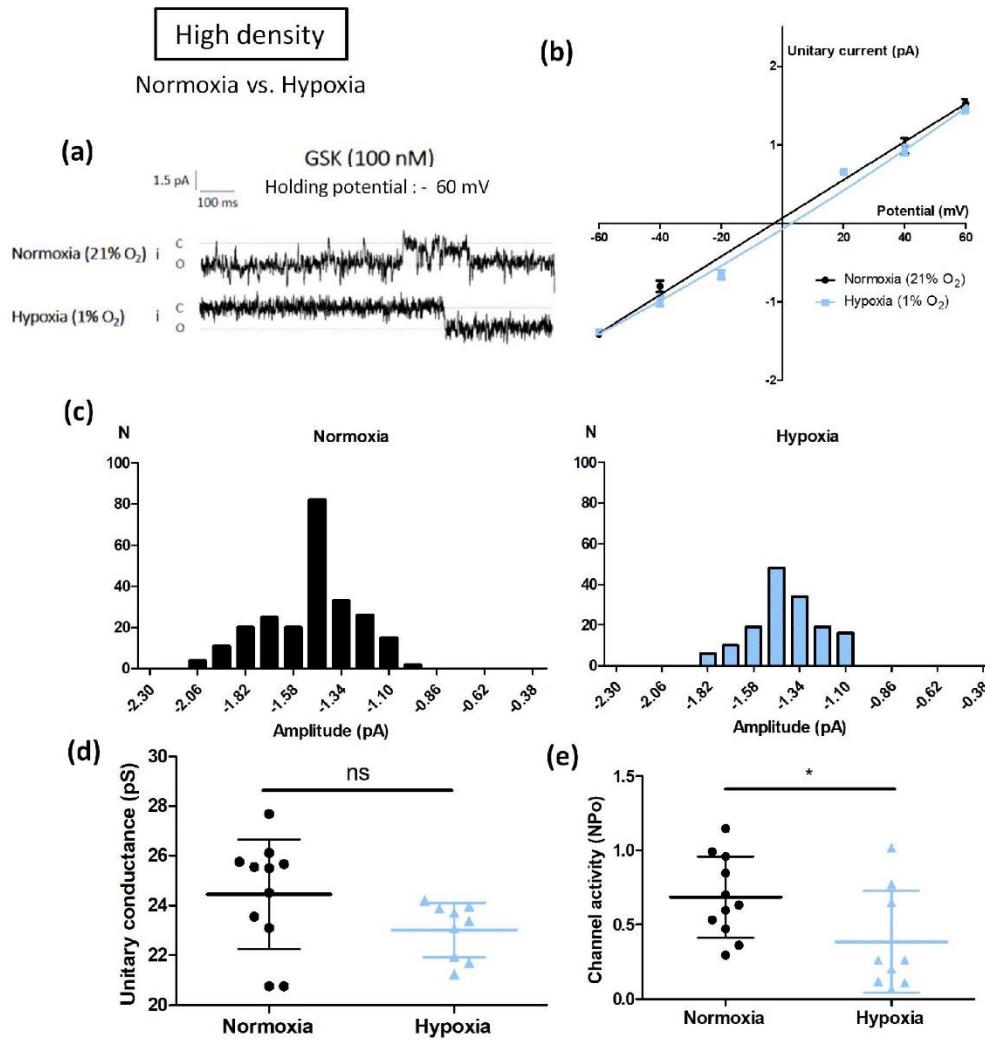
### 3.2.2. Cell Confluence Alters Hypoxia-Induced TRPV4 Current Potentiation

The influence of cell density on TRPV4 single channel activity was then evaluated using the same protocol with cells cultured at HD under hypoxia. Unitary current/voltage curves were drawn for normoxic and hypoxic cells (Figure 5a–c). As for cells grown at LD, TRPV4 unitary conductance was unaffected by hypoxia:  $24.4 \pm 2.2$  pS (n = 7 cells) and  $23.0 \pm 1.1$  pS (n = 9 cells) for normoxic and hypoxic cells, respectively (Figure 5d). Nevertheless, channel activity was decreased 0.6-fold in hypoxic cells (Figure 5e). Thus, as expected, in cells cultured at HD under hypoxia, TRPV4 channel activity was reduced by these culture conditions. These electrophysiological data corroborate those obtained for Ca<sup>2+</sup> responses, confirming that cell confluence is a crucial parameter to consider.



**Figure 4.** Hypoxia potentiates TRPV4 currents in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells cultured at low density ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>). (a) Representative records of current traces (patch clamp; cell-attached configuration at  $-60$  mV holding potential, assuming a resting potential of  $0$  mV) recorded in HEK-TRPV4 cells cultured under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48h at low cell confluence ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>). The letters c and o indicate the closed and open channel states, respectively. (b) Unitary current (i)/potential (V) curves, (c) corresponding amplitude histograms shown at  $-60$  mV, (d) unitary conductance, and (e) channel activity (NPo), determined at a holding potential of  $-60$  mV in presence of the TRPV4 agonist GSK1016790A (100 nM). Data are expressed as mean value  $\pm$  SD. Significant difference is indicated by one asterisk when  $p < 0.05$ , and ns indicates a non-significant difference, Mann-Whitney test.





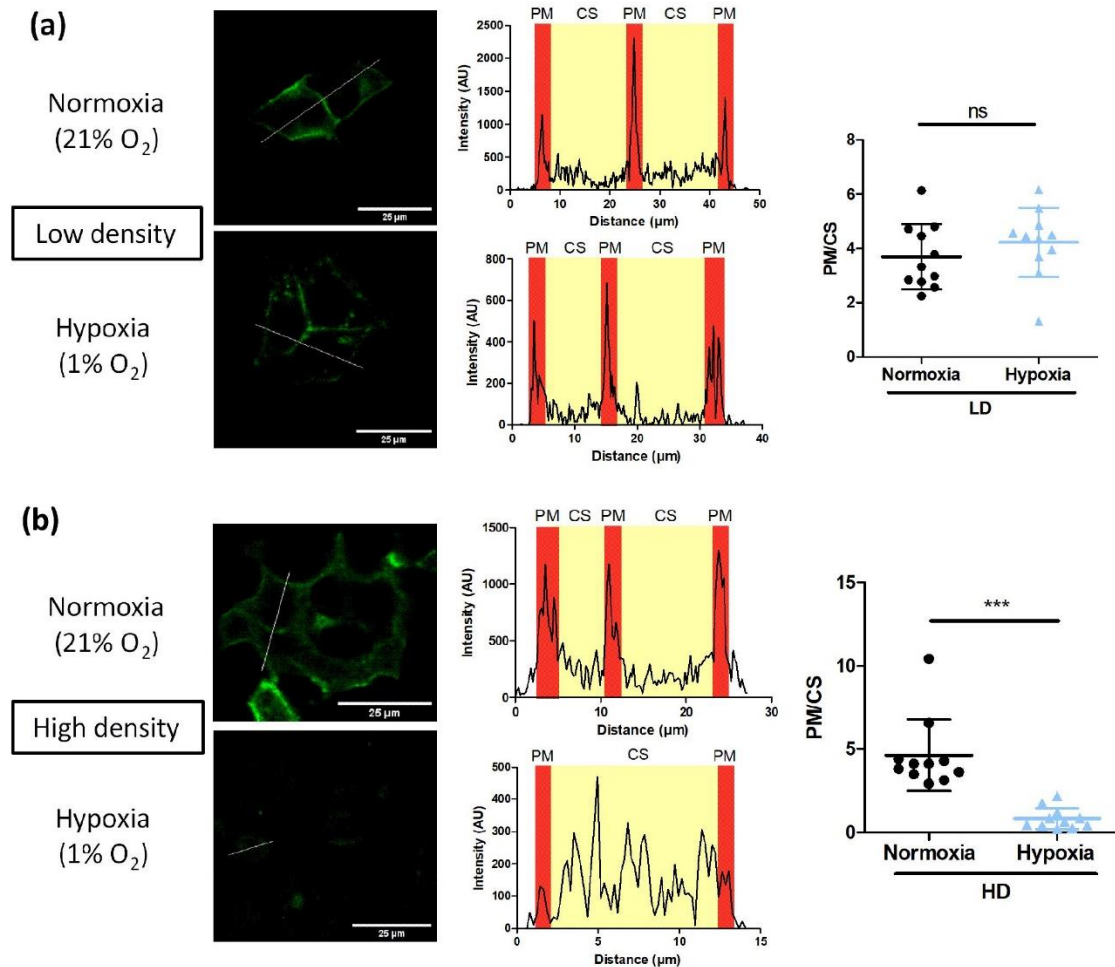
**Figure 5.** Cell confluence alters hypoxia-induced TRPV4 current potentiation in transiently TRPV4-transfected HEK293T (HEK-TRPV4) cells. (a) Representative records of current traces (patch clamp; cell-attached configuration at  $-60$  mV holding potential, assuming a resting potential of  $0$  mV) recorded in HEK-TRPV4 cells cultured under normoxia ( $21\% \text{ O}_2$ ) or hypoxia ( $1\% \text{ O}_2$ ) for  $48$  h at high cell confluence ( $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>). The letters c and o indicate the closed and open channel states, respectively. (b) Unitary current (i)/potential (V) curves, (c) corresponding amplitude histograms shown at  $-60$  mV, (d) unitary conductance, and (e) channel activity (NPo), determined at a holding potential of  $-60$  mV in presence of the TRPV4 agonist GSK1016790A ( $100$  nM). Data are expressed as mean value  $\pm$  SD. Significant difference is indicated by one asterisk when  $p < 0.05$  and ns indicates a non-significant difference, Mann-Whitney test.

### 3.3. Cell Density Induces TRPV4 Relocation under Hypoxia

#### 3.3.1. Cell Confluence Reduces Plasma Membrane Density of TRPV4 Channels

A possible explanation for this lack of response to hypoxia at HD could be a relocation of TRPV4. Thus, membrane expression of TRPV4 was evaluated using confocal imaging on living HEK293T cells expressing TRPV4 tagged with YFP, cultured at LD and HD under normoxia or hypoxia. At LD, TRPV4 channels were mainly expressed in the vicinity of

the plasma membrane in both normoxic and hypoxic cells (Figure 6a). At HD, whereas TRPV4 were localized close to the plasma membrane in normoxic cells, TRPV4 channels' locations were more diffuse in the cytoplasm of hypoxic cells (Figure 6b). Indeed, at HD, hypoxia decreased the average ratio (PM/CS) of the fluorescence signal of the plasma membrane (PM) to the fluorescence signal of the cytosol (CS) from  $4.63 \pm 2.15$  ( $n = 11$  fields) to  $0.84 \pm 0.63$  ( $n = 11$  fields) in normoxic and hypoxic cells, respectively (Figure 6b).

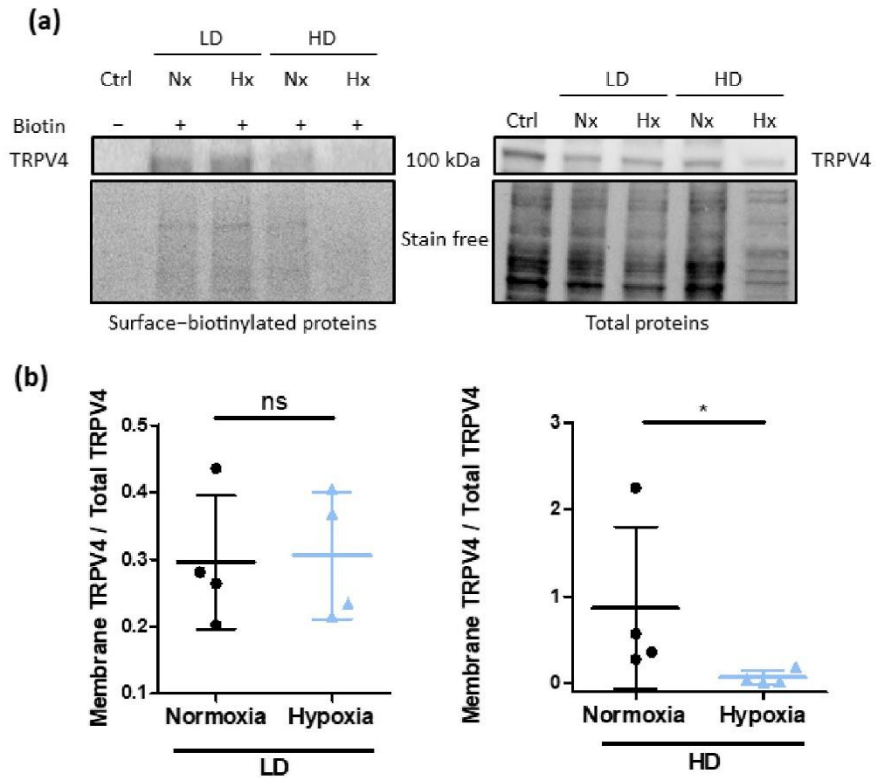


**Figure 6.** Cell confluence reduces plasma membrane density of TRPV4 channels in TRPV4-transfected HEK293T cells under hypoxia. Representative confocal fields of living HEK293T cells transfected with TRPV4 tagged with YFP and cultured at (a) low ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and (b) high density ( $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h (scale bar = 25  $\mu$ m); and corresponding evaluation of TRPV4 membrane localization by the fluorescence intensity profile in arbitrary units (AU) of a typical line scan indicated by the dotted line in cell. The average ratios (PM/CS) of the fluorescence signals of the plasma membrane (PM) to the fluorescence signals of the cytosol (CS) of representative cells are indicated as mean value  $\pm$  SD. Significant difference is indicated by three asterisks when  $p < 0.001$  and ns indicates a non-significant difference, Mann–Whitney test.

We confirmed these observations with cell surface biotinylation of TRPV4 (Figure 7). Indeed, TRPV4 was expressed at plasma membrane in cells cultured at low density under both normoxia and hypoxia. However, less TRPV4 was detected in surface-biotinylated



proteins from cells cultured at HD under hypoxia. Membrane TRPV4/Total TRPV4 ratio with stain free normalization decreased from  $0.86 \pm 0.93$  under normoxia to  $0.07 \pm 0.08$  under hypoxia ( $n = 4$  independent experiments). These results confirm that cell confluence induces TRPV4 internalization in hypoxia.



**Figure 7.** Cell confluence reduces plasma membrane expression of TRPV4 channels in TRPV4-transfected HEK293T cells under hypoxia. (a) Representative Western blots showing the presence of TRPV4 surface-biotinylated and total proteins from HEK293T cells transfected with TRPV4 WT and cultured at low ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and high density ( $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h. Samples without biotin were used as negative control. (b) Membrane TRPV4/Total TRPV4 ratio was evaluated for each condition with stain free normalization. Data are expressed as mean value  $\pm$  SD. Significant difference is indicated by one asterisk when  $p < 0.05$  and ns indicates a non-significant difference, Mann–Whitney test.

### 3.3.2. Cell Confluence Induces TRPV4 Internalization under Hypoxia

Then, membrane expression of TRPV4 was evaluated using a highly dynamic BRET-endocytosis sensor adapted from the study by Namkung et al. [24]. Briefly, the assay relies on the non-specific BRET measurement (bystander BRET) between TRPV4 C-terminally fused to the nLuc (TRPV4-nLuc) and the mNeonG fluorescent acceptor that was anchored to the plasma membrane thanks to its C-terminus fusion to the polybasic sequence and prenylation CAAX box of KRas (mNeonG-CAAX) [24,30] (Supplementary Figure S2). In this assay, the decrease in the bystander BRET between TRPV4-nLuc and mNeonG-CAAX is a direct measure of TRPV4 internalisation and loss of TRPV4 plasma membrane expression.

Since nLuc is an enzyme that consumes O<sub>2</sub> in presence of furimazine, its substrate, to produce visible photons according to the reaction: Furimazine + O<sub>2</sub>  $\rightarrow$  Furimamide + CO<sub>2</sub> + light, we first verified that the diminution of the concentration of O<sub>2</sub> did not affect BRET reaction.

As reported in Figure 2, no modification of the emission spectra was observed, validating the use of these BRET probes in hypoxic conditions.

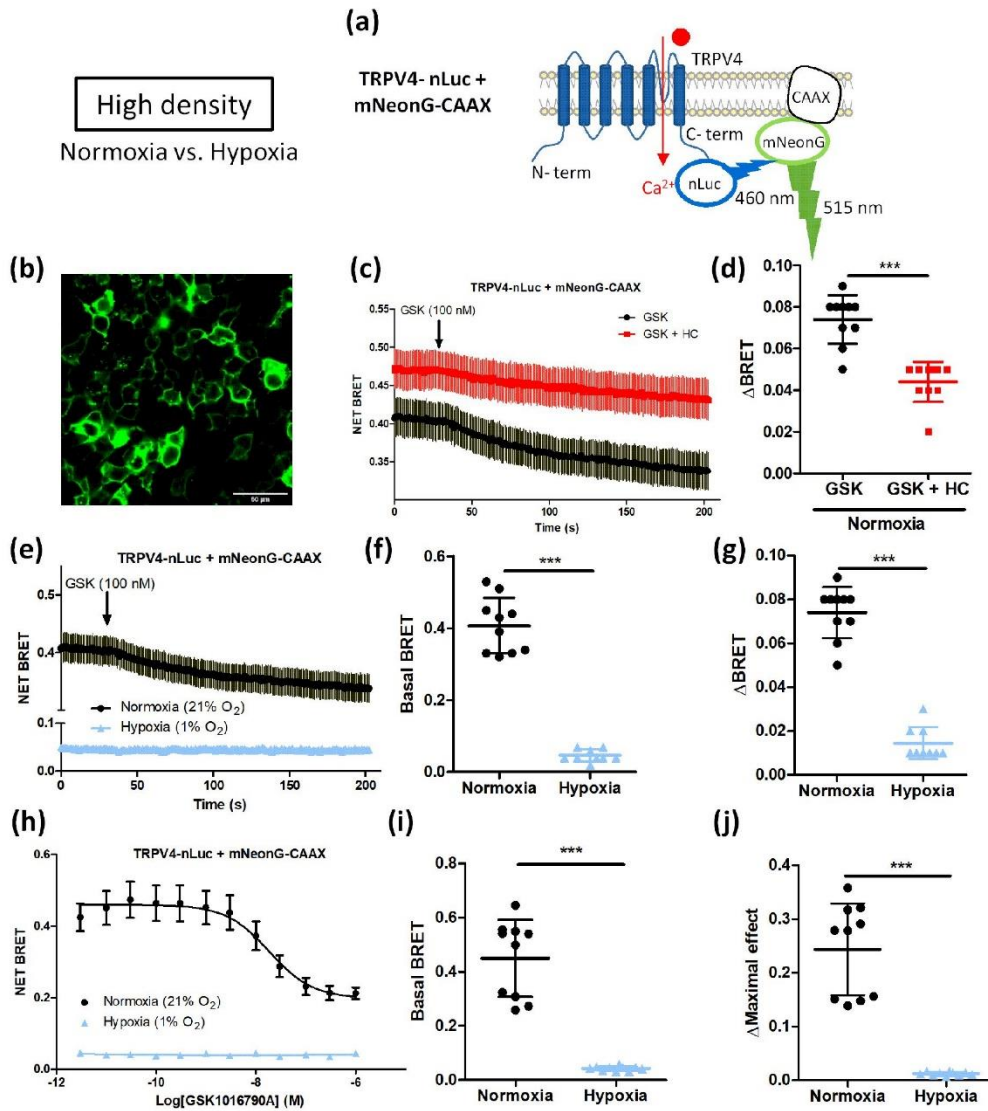
Moreover, electrophysiological characterization of the BRET probes was performed to verify that TRPV4 channel properties were not modified in the presence of the nLuc. Single channel activity was recorded, and unitary current/voltage curves were drawn for normoxic cells cultured at LD (Supplementary Figure S3). No significant difference in unitary conductance and channel activity were observed between TRPV4-WT and TRPV4-nLuc (Supplementary Figure S3c,d). These results confirmed that the fusion of the nLuc to TRPV4 did not alter TRPV4 channel activity. Thus, TRPV4-nLuc probe can be used to investigate the modification of TRPV4 signalling observed in hypoxia at HD.

BRET measurements with TRPV4-nLuc and mNeonG-CAAX (Figure 8a) showed that TRPV4 expression at the plasma membrane decreased after GSK stimulation (100 nM), with a maximal absolute BRET amplitude of  $0.074 \pm 0.012$  ( $n = 10$  independent experiments) (Figure 8c,d). These results confirm findings from Baratchi et al. showing that TRPV4 is internalized and translocates to the recycling endosomes after GSK stimulation [10]. In presence of the TRPV4 inhibitor (HC067047), the absolute amplitude of BRET decrease was reduced to  $0.044 \pm 0.010$  ( $n = 10$  independent experiments) (Figure 8c,d), suggesting less TRPV4 internalization after GSK stimulation.

When cells were cultured under hypoxia at HD, basal BRET in kinetics was highly reduced from  $0.407 \pm 0.077$  ( $n = 10$  independent experiments) in normoxic cells to  $0.047 \pm 0.017$  ( $n = 9$  independent experiments) in hypoxic cells (Figure 8e,f). Accordingly, maximal absolute BRET amplitude was 81% lower in hypoxic cells suggesting TRPV4 was already internalized before GSK stimulation (Figure 8e,g). Consistent with these findings, the concentration–response curve to GSK confirmed that basal BRET and BRET decrease in response to GSK were reduced by 91% and 95% respectively in hypoxia (Figure 8h–j). Thus, TRPV4 internalization in response to GSK stimulation was lower in hypoxia at HD due to a loss of membrane expression. This suggests that cell confluence can modulate TRPV4 addressing.

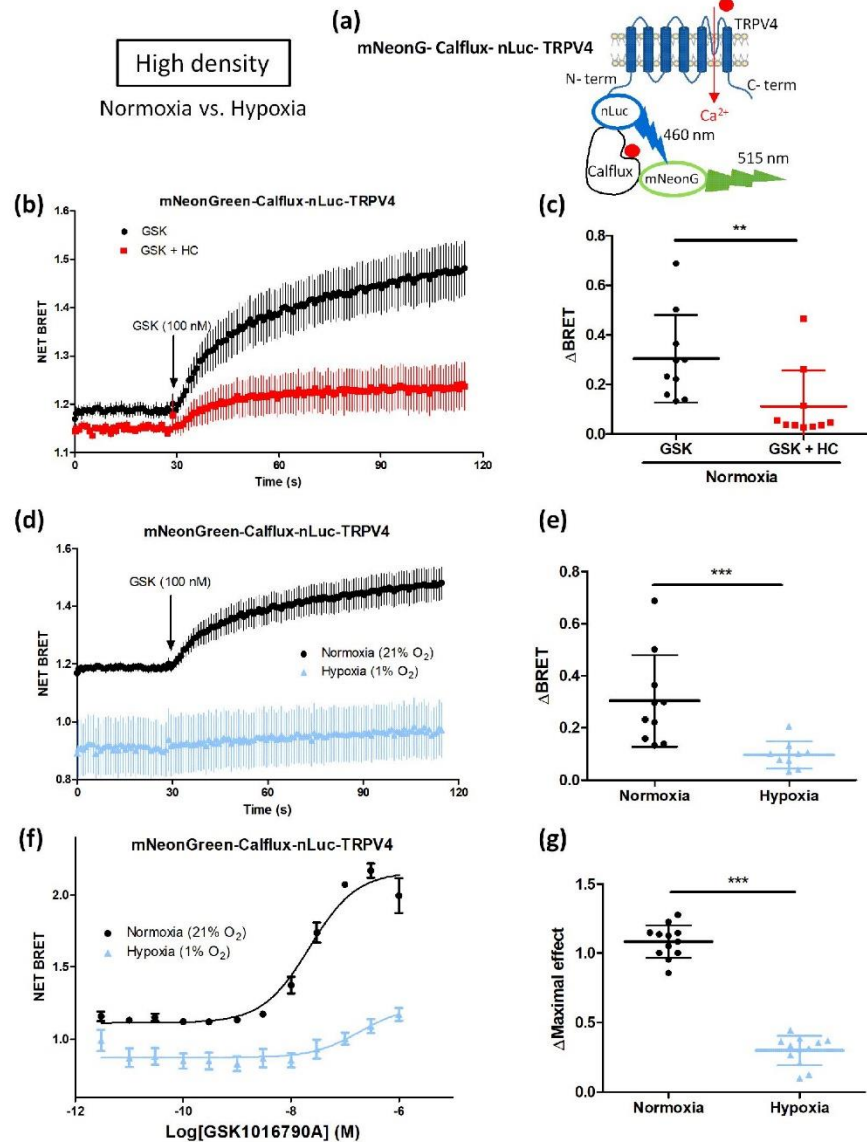
To confirm that hypoxia impairs agonist-induced TRPV4 response because of TRPV4 internalization when HEK-TRPV4 were cultured at HD,  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the TRPV4 pore nanoenvironment was directly monitored using the mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 BRET  $\text{Ca}^{2+}$  sensor (Figure 9). Briefly, as already described for the mNeonG-Calflux-nLuc TRPV1 BRET  $\text{Ca}^{2+}$  sensor [23], the TRPV4 channel was fused to the recently described BRET sensor with high affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  (Calflux-VTN) [31]. The troponin C domain of the Calflux-VTN BRET sensor was first sandwiched between the mNeonG fluorescent protein and the nLuc bioluminescent protein. The resulting BRET-based  $\text{Ca}^{2+}$  sensor (mNeonG-Calflux-nLuc) was then genetically fused to the N-terminal extremity of the channel.

First, electrophysiological characterization of the BRET probe was performed to verify that TRPV4 channel properties were not modified in presence of the mNeonG-Calflux-nLuc BRET probe (Supplementary Figure S3a–d). Then, HD-grown HEK293T cells expressing mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 BRET probe (Figure 9a) were processed for BRET analysis to monitor  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the TRPV4 pore nanoenvironment in both normoxic and hypoxic conditions. In absence of the TRPV4 inhibitor HC, 100 nM GSK induced a rapid and sustained BRET increase, reflecting  $\text{Ca}^{2+}$  influx through TRPV4 channel (Figure 9b,c). As expected, a diminution of 63% of BRET maximal amplitude was measured in the presence of HC (Figure 9b,c) confirming that  $\text{Ca}^{2+}$  transiting through TRPV4 channel is dependent on its activation.



**Figure 8.** Hypoxia impairs agonist-induced TRPV4 internalization in transiently TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at high density. (a) Schematic representation of TRPV4-nLuc and mNeonG-CAAX. (b) Representative confocal fields of mNeonG-CAAX transfected HEK293T cells (scale bar = 50 μm). (c) Kinetic BRET measurement of the effect of GSK1016790A (100 nM) on cells transfected with mNeonG-CAAX and TRPV4-nLuc BRET probes in presence or absence of HC067047 (1 μM) and cultured at high cell confluence (3 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) under normoxia, and (d) maximal absolute amplitude (ΔBRET). (e) Kinetic BRET measurement of the effect of GSK1016790A (100 nM) on HEK293T cells transfected with mNeonG-CAAX and TRPV4-nLuc BRET probes and cultured under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h, (f) basal BRET, and (g) maximal absolute amplitude (ΔBRET). (h) Concentration–response curves of the effect of GSK1016790A on HEK293T cells transfected with mNeonG-CAAX and TRPV4-nLuc BRET probes and cultured under normoxia or hypoxia, (i) basal BRET, and (j) maximal concentration–response curve amplitude (ΔMaximal effect). Data are expressed as mean value ± SD. Significant difference is indicated by three asterisks when *p* < 0.001, Mann–Whitney.





**Figure 9.** Cell confluence alters Ca<sup>2+</sup> influx through TRPV4 in transiently mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4-transfected HEK293T cells cultured under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h at high cell confluence (3 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>). (a) Schematic representation of mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4. (b) Kinetic BRET measurement of the effect of GSK1016790A (100 nM), applied as indicated by the arrow on cells transfected with mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4 in presence or absence of HC067047 (1 μM) and cultured at high cell confluence (3 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) under normoxia (21% O<sub>2</sub>), and (c) maximal amplitude (ΔBRET). (d) Kinetic BRET measurement of the effect of GSK1016790A (100 nM) on cells transfected with mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4 cultured at high cell confluence under normoxia or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h, and (e) maximal amplitude (ΔBRET). (f) Concentration–response curves of the effect of GSK1016790A on HEK293T cells transfected with mNeonG-Calflex-nLuc-TRPV4 BRET probe and cultured under normoxia or hypoxia at HD, and (g) maximal concentration–response curve amplitude (ΔMaximal effect). Data are expressed as mean value ± SD. The number of independent experiments is indicated in brackets. Significant difference is indicated by two asterisks when *p* < 0.01 and three asterisks when *p* < 0.001, Mann–Whitney test.

When cells were cultured under hypoxia, the magnitude of the maximal response to GSK was also inhibited by 68% in response to GSK (Figure 9d,e) and the maximal efficacy of GSK was decreased by 73% in the concentration–response curve with a right-shift of the apparent potency of GSK (Figure 9f,g). These results suggest that less  $\text{Ca}^{2+}$  transits through TRPV4 in hypoxic cells grown at HD, in accordance with our previous results (Figures 3 and 5). Altogether, these data show that at HD, hypoxia induces TRPV4 internalisation and thereby alters agonist-induced TRPV4 activation. These results therefore suggest that, at high cell confluence, hypoxia can influence TRPV4 activity by modulating the density of TRPV4 at the plasma membrane.

#### 4. Discussion

In previous studies, in PASMC from chronically hypoxic rats naturally expressing TRPV4, we and others have already described that *in vivo* chronic hypoxia increases TRPV4 channel activity [13,14]. We have also shown that culturing PASMC from normoxic rats under *in vitro* hypoxia (1%  $\text{O}_2$  for 48 h) produces the same effects on TRPV4, increasing its  $\text{Ca}^{2+}$  response and channel activity [15]. In another article, the effect of hypoxia on TRPV4 was also assessed on cells without native expression of the channel [18]. In that study, TRPV4-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx was reported to be increased in TRPV4-transfected HEK293T cells (cultured at  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, corresponding to LD in our study) treated with cobalt chloride, an experimental condition known to mimic hypoxia [18]. In the present study, we have shown that TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at LD under hypoxia (1%  $\text{O}_2$  for 48 h) display higher TRPV4 responses to GSK stimulation.

Indeed, both  $\text{Ca}^{2+}$  responses and TRPV4 channel activity were increased in the hypoxic condition, confirming the effect of hypoxia on TRPV4 *in vitro*. How TRPV4 is modulated by hypoxia is still unclear, but there is evidence suggesting a specific effect of hypoxia on binding sites of the TRPV1 channel, affecting its conformation [32]. Thus, since TRPV channel members share high sequence identity (for example TRPV1 and TRPV4 share 45% sequence identity) [33], TRPV4 may also be modulated by hypoxia through conformational changes via a specific effect of hypoxia on amino acid residues. These changes could arise from post-translational modifications such as hydroxylation. Indeed, it was previously shown that TRPV3, another member of the TRPV family, was hydroxylated by FIH (factor inhibiting hypoxia inducible factors) on asparagine 242 in intracellular ankyrin repeat domains [34]. Hypoxia, inhibitors of FIH or mutation on asparagine 242 resulted in potentiation of TRPV3-mediated currents suggesting that oxygen-dependent hydroxylation can modulate ion channel activity [34].

In addition, our study reveals an impact of cell density on TRPV4 channel activity and  $\text{Ca}^{2+}$  response modulation by hypoxia. Our results show that hypoxia had a differential effect in TRPV4-transfected HEK293T cells cultured at either LD or HD. Surprisingly, agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses and channel activity were decreased in hypoxic cells at HD. Several studies previously reported that cell density affects various physiological processes. Accordingly, it was found that confluent osteoblastic cells had a higher basal  $\text{Ca}^{2+}$  level than non-confluent ones and that  $\text{Ca}^{2+}$  responses to ionomycin, thapsigargin, ATP, and caffeine were reduced at high density [35]. This decrease was dependent on the formation of cell junctions, diminution of the inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) receptor and smooth-surfaced endoplasmic reticulum expression [35]. Additionally, in rat aortic smooth muscle cells, there is evidence that cell confluence affects  $\beta$ -adrenergic receptor signalling. Indeed, at HD, isoprenaline response involved both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors, whereas at LD, the response only involved  $\beta_2$ -adrenergic receptor and the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) rise was reduced in comparison with cells grown at HD [36]. In smooth muscle cells, the modification of this signalling pathway could alter various physiological responses such as contraction, migration or proliferation. Modulation of  $\beta$ -adrenergic receptor signalling by cell confluence was reported in HEK293 cells stably overexpressing  $\beta_2$ -adrenergic receptor. According to cell density, the transduction signalling pathway selectivity of cells'  $\beta_2$ -adrenergic receptor ligands was different. As a



consequence, some ligands induced an increase in intracellular cAMP without activating extracellular signal-regulated kinase (ERK) only in the HD condition, whereas at LD, ERK was phosphorylated following cAMP increase [37].

An important feature of cell density that can explain the modulation of cell responses is the modification of the tension in the plasma membrane with confluence inducing a change in cell mechanical behaviour. Indeed, it was shown that the rigidity of osteoblastic and fibroblastic cells was altered with culture conditions [21]. Confluent cells were stiffer than non-confluent ones and formed aligned stress fibres in response to mechanical stress, affecting cytoskeleton microstructure. Moreover, the increased formation of cell–cell junctions in confluent cells also increased the rigidity of the cytoskeleton [21]. Moreover, hypoxia was shown to induce cytoskeleton reorganization in PASMNC where actin filament and intermediate filament networks were more abundant [15]. Since TRPV4 directly interacts with the cytoskeleton [38], cell contacts can impair cytoskeleton organization and reorganization in response to hypoxia, and consequently TRPV4 trafficking or conformational change. Indeed, as reported, confluence increased claudin-2 expression, a component of tight junctions, controlled by zonula occludens-1 and -2 and Rac [39]. These cell contacts also inhibited proliferation through the reduction of the formation of F-stress fibres induced by inhibition of YAP/TAZ (co-transcriptional regulators) signalling that impaired autophagosome formation [40]. This study suggests that modifications of cell confluence and matrix stiffness regulate YAP/TAZ activity, actin dynamics, and autophagy that are involved especially in proliferation and sensitivity to hypoxia via altered Hippo signalling. This pathway is regulated by AMP-activated protein kinase and mechanistic target of rapamycin (mTOR), determining cell proliferation [40,41]. The Hippo pathway is also known to be affected by hypoxia since reactive oxygen species (ROS) production induces transcriptional changes through the MST/YAP/FoxO pathway and leads to the activation of pro-apoptotic genes [41]. The fact that both cell density and matrix stiffness, as well as hypoxia, can affect cell signalling corroborates the previous assumption that TRPV4, as a mechanosensitive channel, may be particularly affected by these parameters.

Thus, the loss of TRPV4 response under hypoxia at HD could be explained by a relocation of the channel. Indeed, our present results suggest TRPV4 internalization in these conditions. First, in confocal imaging, TRPV4 was expressed in the vicinity of the plasma membrane at LD under both normoxia and hypoxia but only in normoxia for cells grown at HD. However, at HD under hypoxia, TRPV4 staining was diffuse in the cells suggesting a cytosolic expression. Moreover, cell surface biotinylation showed that TRPV4 was expressed at the plasma membrane at LD under both normoxia and hypoxia and in normoxia for cells grown at HD. But at HD under hypoxia, TRPV4 membrane addressing was reduced. To further analyse TRPV4 membrane expression, we built on a bystander BRET assay initially described to quantitatively monitor G protein-coupled receptors (GPCRs) and  $\beta$ -arrestin trafficking [24]. We anticipated that such an assay could specifically assess TRPV4 endocytosis by measuring the decrease in the non-specific BRET (bystander BRET) occurring in the plasma membrane plane between TRPV4 fused to the bioluminescent donor nLuc (TRPV4-nLuc) and a fluorescent acceptor fused to a plasma membrane-anchoring peptide such as the CAAX peptide [24]. As shown in Figure 9, this assay confirmed the observation of a former study [10] indicating that GSK triggers a rapid endocytosis of TRPV4, as shown by the progressive decrease in the BRET value between TRPV4-nLuc and mNeonG-CAAX following GSK challenging. Moreover, we could confirm that, in hypoxic cells grown at HD, TRPV4 expression at the plasma membrane was highly reduced and TRPV4 did not respond anymore to a further activation by GSK. This indicates that TRPV4 activation was impaired in hypoxia at HD due to an already internalized channel in this condition. The study from Baratchi et al. reported that TRPV4 translocated to the recycling endosomes after GSK stimulation and that the density of TRPV4 at the plasma membrane was controlled through both complete and partial vesicular fusion [10]. It is noteworthy that shear stress stimulation can also modify TRPV4 trafficking in endothelial cells where TRPV4 co-localized with  $\beta$ -catenin, an adapter protein of the adherens junctions

at the point of cell–cell contact, and relocalised after shear stress, losing their interaction with  $\beta$ -catenin [42].

The endocytosis process is known to be mechanosensitive and can thus be regulated by membrane tension and rigidity in association with changes in membrane composition. It was shown that increased membrane tension and rigidity decrease global endocytosis [43,44] whereas hypoxia promotes endocytosis (e.g., of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and alveolar epithelial sodium channel (ENaC) [44].

Overall, the combination of high cell density and hypoxia might change cell rigidity and lipid membrane composition, modulating TRPV4 activation. Such modifications could affect TRPV4 localisation through impairment of TRPV4 addressing to membrane or internalization following desensitisation of the channel. Even though our data show that TRPV4 is clearly sensitive to cell density, it is highly probable that many other channels can also be affected by cell density. Indeed, mechanosensitivity is very important in many physiological processes. A wide range of channels (SAC, stretch-activated channels) act as mechanotransducers by converting physical forces into biological signals [20]. Thus, the loss of TRPV4 expression to the membrane could be compensated by the action of other SAC. Indeed, such a compensatory mechanism was demonstrated for filamins in cultured podocytes exposed to mechanical stress where the knock-out of filamin A was compensated by the expression of filamin B [45]. A similar effect was reported in smooth muscle cells in which an increase in TRPC3 expression was observed when TRPC6 was invalidated [46].

Indeed, the present study shows how experimental conditions can be important parameters when evaluating the effect of hypoxia on TRPV4 channel, and more widely on ionic channels, considering the modification of their expression, trafficking and activity. This also raises awareness of the choice of models used in experimentation. Here, we compared cell confluence in a two dimensional (2D) cell culture model, but it would be interesting to study how TRPV4 responds to hypoxia in a three dimensional (3D) cell culture model, more relevant to physiological conditions, where cells undergo important mechanical tension since they have more cell-to-cell interactions and interact with the extracellular matrix [47,48]. Interestingly, in a 3D model, TRPV4 displayed a diffuse cytoplasmic localization in three types of cancer cells [49], suggesting that TRPV4 localisation is very sensitive to mechanical forces. In addition, another study demonstrated that osteogenic differentiation is regulated by reciprocal feedback between cell volume expansion and TRPV4 activation in mesenchymal stem cells cultured in 3D matrices [50]. These data support the idea that TRPV4 is not only sensitive to cell density in conventional 2D models but can also be affected by mechanical stress occurring in 3D models.

In conclusion, our data highlight the importance of a specific culture condition, namely cell confluence, which can influence many cellular processes. We show that HD alters TRPV4 addressing to the plasma membrane and, thus, GSK-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses in cells exposed to hypoxia. Accordingly, cell confluence should be taken into account when using cell culture to study various pathophysiological pathways, especially considering the differential impact of hypoxia on TRPV4 channel signalling. These results also raise awareness of the impact of techniques and methods of investigation on physiological cell responses.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12070954/s1>, Figure S1: Schematic representation of the golden-gate strategies used to tag TRPV4 and construct the different BRET probes; Figure S2: Characterization of emission spectra of TRPV4 BRET probes in transiently transfected HEK293T cells cultured under normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) or hypoxia (1%  $\text{O}_2$ ) at high cell confluence ( $3 \times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$ ); Figure S3: Electrophysiological characterization of TRPV4 BRET probes in transiently TRPV4-transfected HEK293T cells cultured under normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) at low cell confluence ( $1 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$ ); Table S1: Sequences of cDNA “bricks” used.



**Author Contributions:** Conceptualization, S.B., Y.P., J.-F.Q. and T.D.; methodology, S.B., A.J., Y.C., Y.P., J.-F.Q. and T.D.; validation, S.B. and T.D.; formal analysis, S.B.; investigation, S.B.; resources, A.J., Y.C. and Y.P.; writing—original draft preparation, S.B. and T.D.; writing—review and editing, S.B., A.J., Y.C., G.C., I.B., V.F.-M., C.G., R.M., P.B., P.V., Y.P., J.-F.Q. and T.D.; visualization, S.B. and T.D.; supervision, Y.P. and T.D.; project administration, T.D.; funding acquisition, Y.P. and T.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the French National Research Agency (ANR), grant number ANR-19-CE44-0010-02 (the CANALBRET project) and the New Aquitaine regional council (Région Nouvelle-Aquitaine), grant number AAPR2020I-2019-8151810 (the PHYSTRIG project).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- White, J.P.; Cibelli, M.; Urban, L.; Nilius, B.; McGeown, J.G.; Nagy, I. Trpv4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 911–973. [\[CrossRef\]](#)
- Voets, T.; Prenen, J.; Vriens, J.; Watanabe, H.; Janssens, A.; Wissenbach, U.; Bodding, M.; Droogmans, G.; Nilius, B. Molecular Determinants of Permeation through the Cation Channel Trpv4. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33704–33710. [\[CrossRef\]](#)
- Rosenbaum, T.; Benítez-Angeles, M.; Sanchez-Hernandez, R.; Morales-Lazaro, S.L.; Hiriart, M.; Morales-Buenrostro, L.E.; Torres-Quiroz, F. Trpv4: A Physio and Pathophysiologically Significant Ion Channel. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3837. [\[CrossRef\]](#)
- Toft-Bertelsen, T.L.; MacAulay, N. Trping to the Point of Clarity: Understanding the Function of the Complex Trpv4 Ion Channel. *Cells* **2021**, *10*, 165. [\[CrossRef\]](#)
- Fan, H.C.; Zhang, X.; McNaughton, P.A. Activation of the Trpv4 Ion Channel Is Enhanced by Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27884–27891. [\[CrossRef\]](#)
- D’Hoedt, D.; Owsianik, G.; Prenen, J.; Cuajungco, M.P.; Grimm, C.; Heller, S.; Voets, T.; Nilius, B. Stimulus-Specific Modulation of the Cation Channel Trpv4 by Pacsin 3. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6272–6280. [\[CrossRef\]](#)
- Wegierski, T.; Hill, K.; Schaefer, M.; Walz, G. The Hect Ubiquitin Ligase Aip4 Regulates the Cell Surface Expression of Select Trp Channels. *EMBO J.* **2006**, *25*, 5659–5669. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, Y.; Fu, X.; Gaiser, S.; Kottgen, M.; Kramer-Zucker, A.; Walz, G.; Wegierski, T. Os-9 Regulates the Transit and Polyubiquitination of Trpv4 in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 36561–36570. [\[CrossRef\]](#)
- Shin, S.H.; Lee, E.J.; Chun, J.; Hyun, S.; Kang, S.S. Phosphorylation on Trpv4 Serine 824 Regulates Interaction with Stim1. *Open Biochem. J.* **2015**, *9*, 24–33. [\[CrossRef\]](#)
- Baratchi, S.; Keov, P.; Darby, W.G.; Lai, A.; Khoshmanesh, K.; Thurgood, P.; Vahidi, P.; Ejendal, K.; McIntyre, P. The Trpv4 Agonist Gsk1016790a Regulates the Membrane Expression of Trpv4 Channels. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 6. [\[CrossRef\]](#)
- Tuder, R.M.; Yun, J.H.; Bhunia, A.; Fijalkowska, I. Hypoxia and Chronic Lung Disease. *J. Mol. Med.* **2007**, *12*, 1317–1324. [\[CrossRef\]](#)
- Lee, J.W.; Ko, J.; Ju, C.; Eltzschig, H.K. Hypoxia Signaling in Human Diseases and Therapeutic Targets. *Exp. Mol. Med.* **2019**, *51*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
- Yang, X.R.; Lin, A.H.; Hughes, J.M.; Flavahan, N.A.; Cao, Y.N.; Liedtke, W.; Sham, J.S. Upregulation of Osmo-Mechanosensitive Trpv4 Channel Facilitates Chronic Hypoxia-Induced Myogenic Tone and Pulmonary Hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2012**, *6*, L555–L568. [\[CrossRef\]](#)
- Dahan, D.; Ducret, T.; Quignard, J.F.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Esteve, E. Implication of the Ryanodine Receptor in Trpv4-Induced Calcium Response in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from Normoxic and Chronically Hypoxic Rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2012**, *9*, L824–L833. [\[CrossRef\]](#)
- Parpaite, T.; Cardouat, G.; Mauroux, M.; Gillibert-Duplantier, J.; Robillard, P.; Quignard, J.F.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Ducret, T. Effect of Hypoxia on Trpv1 and Trpv4 Channels in Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Pflug. Arch.* **2016**, *1*, 111–130. [\[CrossRef\]](#)
- Rath, G.; Saliez, J.; Behets, G.; Romero-Perez, M.; Leon-Gomez, E.; Bouzin, C.; Vriens, J.; Nilius, B.; Feron, O.; Dessy, C. Vascular Hypoxic Preconditioning Relies on Trpv4-Dependent Calcium Influx and Proper Intercellular Gap Junctions Communication. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2241–2249. [\[CrossRef\]](#)
- Butenko, O.; Dzamba, D.; Benesova, J.; Honsa, P.; Benfenati, V.; Rusnakova, V.; Ferroni, S.; Anderova, M. The Increased Activity of Trpv4 Channel in the Astrocytes of the Adult Rat Hippocampus after Cerebral Hypoxia/Ischemia. *PLoS ONE* **2012**, *6*, e39959. [\[CrossRef\]](#)
- Ozsimek, A.; Naziroglu, M. The Involvement of Trpv4 on the Hypoxia-Induced Oxidative Neurotoxicity and Apoptosis in a Neuronal Cell Line: Protective Role of Melatonin. *Neurotoxicology* **2021**, *87*, 136–148. [\[CrossRef\]](#)

19. Wu, Q.F.; Qian, C.; Zhao, N.; Dong, Q.; Li, J.; Wang, B.B.; Chen, L.; Yu, L.; Han, B.; Du, Y.M.; et al. Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Involves in Hypoxia/Reoxygenation Injury in Cardiomyocytes. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2828. [[CrossRef](#)]
20. 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. [[CrossRef](#)]
21. Jaasma, M.J.; Jackson, W.M.; Keaveny, T.M. The Effects of Morphology, Confluency, and Phenotype on Whole-Cell Mechanical Behavior. *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, *34*, 759–768. [[CrossRef](#)]
22. Carreau, A.; el Hafny-Rahbi, B.; Matejuk, A.; Grillon, C.; Kieda, C. Why Is the Partial Oxygen Pressure of Human Tissues a Crucial Parameter? Small Molecules and Hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 1239–1253. [[CrossRef](#)]
23. Chappe, Y.; Pierredon, S.; Joushomme, A.; Molle, P.; Garenne, A.; Canovi, A.; Barbeau, S.; de Gannes, F.P.; Hurtier, A.; Lagroye, I.; et al. Genetically-Encoded Bret Probes Enlight Ligand Bias-Induced Variable Ion Selectivity in Trpv1 and P2 × 5/7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* submitted. **2022**.
24. Namkung, Y.; le Gouill, C.; Lukashova, V.; Kobayashi, H.; Hogue, M.; Khoury, E.; Song, M.; Bouvier, M.; Laporte, S.A. Monitoring G Protein-Coupled Receptor and Beta-Arrestin Trafficking in Live Cells Using Enhanced Bystander Bret. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12178. [[CrossRef](#)]
25. Chappe, Y.; Michel, P.; Joushomme, A.; Barbeau, S.; Pierredon, S.; Baron, L.; Garenne, A.; de Gannes, F.P.; Hurtier, A.; Mayer, S.; et al. High-Throughput Screening of Transient Receptor Potential Channel 1 Ligands in the Light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer Technique. *Mol. Pharmacol.* **2021**, *100*, 237–257. [[CrossRef](#)]
26. Percherancier, Y.; Berchiche, Y.A.; Slight, I.; Volkmer-Engert, R.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Bouvier, M.; Heveker, N. Bioluminescence Resonance Energy Transfer Reveals Ligand-Induced Conformational Changes in Cxcr4 Homo- and Heterodimers. *J. Biol. Chem.* **2005**, *11*, 9895–9903. [[CrossRef](#)]
27. 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. *Pflug. Arch.* **1981**, *2*, 85–100. [[CrossRef](#)]
28. Hamdan, F.F.; Percherancier, Y.; Breton, B.; Bouvier, M. Monitoring Protein-Protein Interactions in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (Bret). *Curr. Protoc. Neurosci.* **2006**, *5*, 23. [[CrossRef](#)]
29. Ruigrok, H.J.; Shahid, G.; Goudeau, B.; de Gannes, F.P.; Poque-Haro, E.; Hurtier, A.; Lagroye, I.; Vacher, P.; Arbault, S.; Sojic, N.; et al. Full-Spectral Multiplexing of Bioluminescence Resonance Energy Transfer in Three Trpv Channels. *Biophys. J.* **2017**, *1*, 87–98. [[CrossRef](#)]
30. Zacharias, D.A.; Violin, J.D.; Newton, A.C.; Tsien, R.Y. Partitioning of Lipid-Modified Monomeric Gfps into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* **2002**, *296*, 913–916. [[CrossRef](#)]
31. Yang, J.; Cumberbatch, D.; Centanni, S.; Shi, S.Q.; Winder, D.; Webb, D.; Johnson, C.H. Coupling Optogenetic Stimulation with Nanoluc-Based Luminescence (Bret) Ca(++) Sensing. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13268. [[CrossRef](#)]
32. Kim, K.S.; Yoo, H.Y.; Park, K.S.; Kim, J.K.; Zhang, Y.H.; Kim, S.J. Differential Effects of Acute Hypoxia on the Activation of Trpv1 by Capsaicin and Acidic Ph. *J. Physiol. Sci.* **2012**, *2*, 93–103. [[CrossRef](#)]
33. Nilius, B.; Vriens, J.; Prenen, J.; Droogmans, G.; Voets, T. Trpv4 Calcium Entry Channel: A Paradigm for Gating Diversity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *2*, C195–C205. [[CrossRef](#)]
34. Karttunen, S.; Duffield, M.; Scrimgeour, N.R.; Squires, L.; Lim, W.L.; Dallas, M.L.; Scragg, J.L.; Chicher, J.; Dave, K.A.; Whitelaw, M.L.; et al. Oxygen-Dependent Hydroxylation by Fih Regulates the Trpv3 Ion Channel. *J. Cell Sci.* **2015**, *2*, 225–231.
35. Koizumi, T.; Hikiji, H.; Shin, W.S.; Takato, T.; Fukuda, S.; Abe, T.; Koshikiya, N.; Iwasawa, K.; Toyo-oka, T. Cell Density and Growth-Dependent Down-Regulation of Both Intracellular Calcium Responses to Agonist Stimuli and Expression of Smooth-Surfaced Endoplasmic Reticulum in Mc3t3-E1 Osteoblast-Like Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *8*, 6433–6439. [[CrossRef](#)]
36. Belacel-Ouari, M.; Zhang, L.; Hubert, F.; Assaly, R.; Gerbier, R.; Jockers, R.; Dauphin, F.; Lechene, P.; Fischmeister, R.; Manoury, B.; et al. Influence of Cell Confluence on the Camp Signalling Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell Signal* **2017**, *35*, 118–128. [[CrossRef](#)]
37. Kaya, A.I.; Onaran, H.O.; Ozcan, G.; Ambrosio, C.; Costa, T.; Balli, S.; Ugur, O. Cell Contact-Dependent Functional Selectivity of Beta2-Adrenergic Receptor Ligands in Stimulating Camp Accumulation and Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *9*, 6362–6374. [[CrossRef](#)]
38. Goswami, C.; Kuhn, J.; Heppenstall, P.A.; Hucho, T. Importance of Non-Selective Cation Channel Trpv4 Interaction with Cytoskeleton and Their Reciprocal Regulations in Cultured Cells. *PLoS ONE* **2010**, *7*, e11654. [[CrossRef](#)]
39. Amoozadeh, Y.; Anwer, S.; Dan, Q.; Venugopal, S.; Shi, Y.; Branchard, E.; Liedtke, E.; Ailenberg, M.; Rotstein, O.D.; Kapus, A.; et al. Cell Confluence Regulates Claudin-2 Expression: Possible Role for Zo-1 and Rac. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2018**, *3*, C366–C378. [[CrossRef](#)]
40. Pavel, M.; Renna, M.; Park, S.J.; Menzies, F.M.; Ricketts, T.; Fullgrave, J.; Ashkenazi, A.; Frake, R.A.; Lombarte, A.C.; Bento, C.F.; et al. Contact Inhibition Controls Cell Survival and Proliferation Via Yap/Taz-Autophagy Axis. *Nat. Commun.* **2018**, *1*, 2961. [[CrossRef](#)]
41. Zeybek, N.D.; Baysal, E.; Bozdemir, O.; Buber, E. Hippo Signaling: A Stress Response Pathway in Stem Cells. *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* **2021**, *7*, 824–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Baratchi, S.; Knoerzer, M.; Khoshmanesh, K.; Mitchell, A.; McIntyre, P. Shear Stress Regulates Trpv4 Channel Clustering and Translocation from Adherens Junctions to the Basal Membrane. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



43. Joseph, J.G.; Liu, A.P. Mechanical Regulation of Endocytosis: New Insights and Recent Advances. *Adv. Biosyst.* **2020**, *4*, e1900278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lopez-Hernandez, T.; Haucke, V.; Maritzen, T. Endocytosis in the Adaptation to Cellular Stress. *Cell Stress* **2020**, *4*, 230–247. [[CrossRef](#)]
45. Greiten, J.K.; Kliewe, F.; Schnarre, A.; Artelt, N.; Schroder, S.; Rogge, H.; Amann, K.; Daniel, C.; Lindenmeyer, M.T.; Cohen, C.D.; et al. The Role of Filamins in Mechanically Stressed Podocytes. *FASEB J.* **2021**, *35*, e21560. [[CrossRef](#)]
46. Dietrich, A.; Schnitzler, Y.; Mederos, M.; Gollasch, M.; Gross, V.; Storch, U.; Dubrovska, G.; Obst, M.; Yildirim, E.; Salanova, B.; et al. Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in *Trpc6*<sup>-/-</sup> Mice. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 6980–6989. [[CrossRef](#)]
47. Duval, K.; Grover, H.; Han, L.H.; Mou, Y.; Pegoraro, A.F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2d Vs. 3d Cell Culture. *Physiology* **2017**, *32*, 266–277. [[CrossRef](#)]
48. Hameed, P.; Manivasagam, G. An Overview of Bio-Actuation in Collagen Hydrogels: A Mechanobiological Phenomenon. *Biophys. Rev.* **2021**, *13*, 387–403. [[CrossRef](#)]
49. Miermont, A.; Lee, S.W.L.; Adriani, G.; Kamm, R.D. Quantitative Screening of the Effects of Hyper-Osmotic Stress on Cancer Cells Cultured in 2- or 3-Dimensional Settings. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13782. [[CrossRef](#)]
50. Lee, H.P.; Stowers, R.; Chaudhuri, O. Volume Expansion and *Trpv4* Activation Regulate Stem Cell Fate in Three-Dimensional Microenvironments. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 529. [[CrossRef](#)]



## *Online Supplement*

# Cell confluence modulates TRPV4 channel activity in response to hypoxia

Solène Barbeau <sup>1,2</sup>, Alexandre Joushomme <sup>4,5,¶</sup>, Yann Chappe <sup>4,5,¶</sup>, Guillaume Cardouat <sup>1,2</sup>, Isabelle Baudrimont <sup>1,2</sup>, Véronique Freund-Michel <sup>1,2</sup>, Christelle Guibert <sup>1,2</sup>, Roger Marthan <sup>1,2,3</sup>, Patrick Berger <sup>1,2,3</sup>, Pierre Vacher <sup>1,2</sup>, Yann Percherancier <sup>4,5</sup>, Jean-François Quignard <sup>1,2</sup> and Thomas Ducret <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France; solene.barbeau@u-bordeaux.fr, guillaume.cardouat@u-bordeaux.fr, isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr, veronique.michel@u-bordeaux.fr, christelle.guibert@u-bordeaux.fr, roger.marthan@u-bordeaux.fr, patrick.berger@u-bordeaux.fr, pierre.vacher@inserm.fr, jean-francois.quignard@u-bordeaux.fr, thomas.ducret@u-bordeaux.fr

<sup>2</sup> INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France; solene.barbeau@u-bordeaux.fr, guillaume.cardouat@u-bordeaux.fr, isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr, veronique.michel@u-bordeaux.fr, christelle.guibert@u-bordeaux.fr, roger.marthan@u-bordeaux.fr, patrick.berger@u-bordeaux.fr, pierre.vacher@inserm.fr, jean-francois.quignard@u-bordeaux.fr, thomas.ducret@u-bordeaux.fr

<sup>3</sup> CHU Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, F-33600 Pessac, France; roger.marthan@u-bordeaux.fr, patrick.berger@u-bordeaux.fr

<sup>4</sup> Univ. Bordeaux, Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, UMR5518, F-33400 Talence, France; alexandre.joushomme@u-bordeaux.fr, yann.chappe@u-bordeaux.fr, yann.percherancier@u-bordeaux.fr

<sup>5</sup> CNRS, Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, UMR5518, F-33400 Talence, France; alexandre.joushomme@u-bordeaux.fr, yann.chappe@u-bordeaux.fr, yann.percherancier@u-bordeaux.fr

\* Correspondence: Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, INSERM U1045, Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale, Hôpital Xavier Arnoz, Avenue du Haut Lévêque, F-33604 Pessac Cedex, France; thomas.ducret@u-bordeaux.fr

¶ These authors contributed equally to this work.

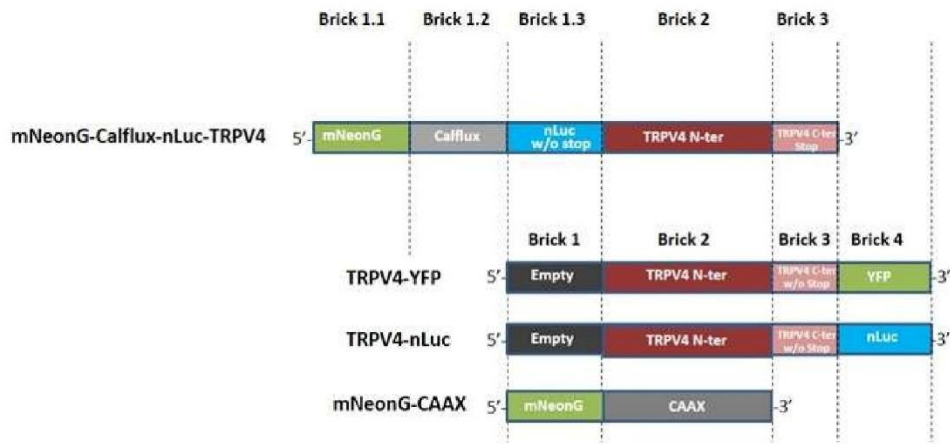


Figure S1. Schematic representation of the golden-gate strategies used to tag TRPV4 and construct the different BRET probes.

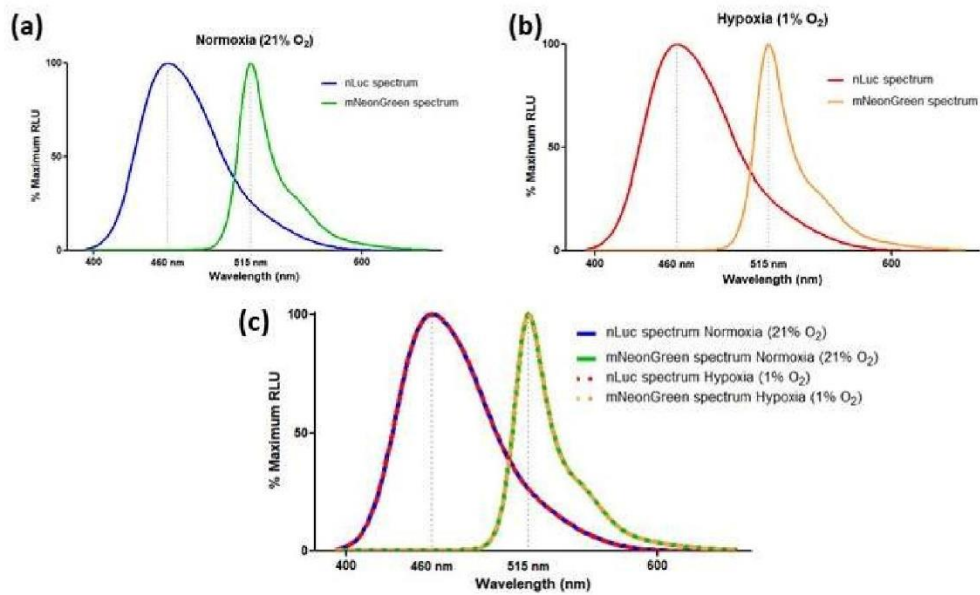
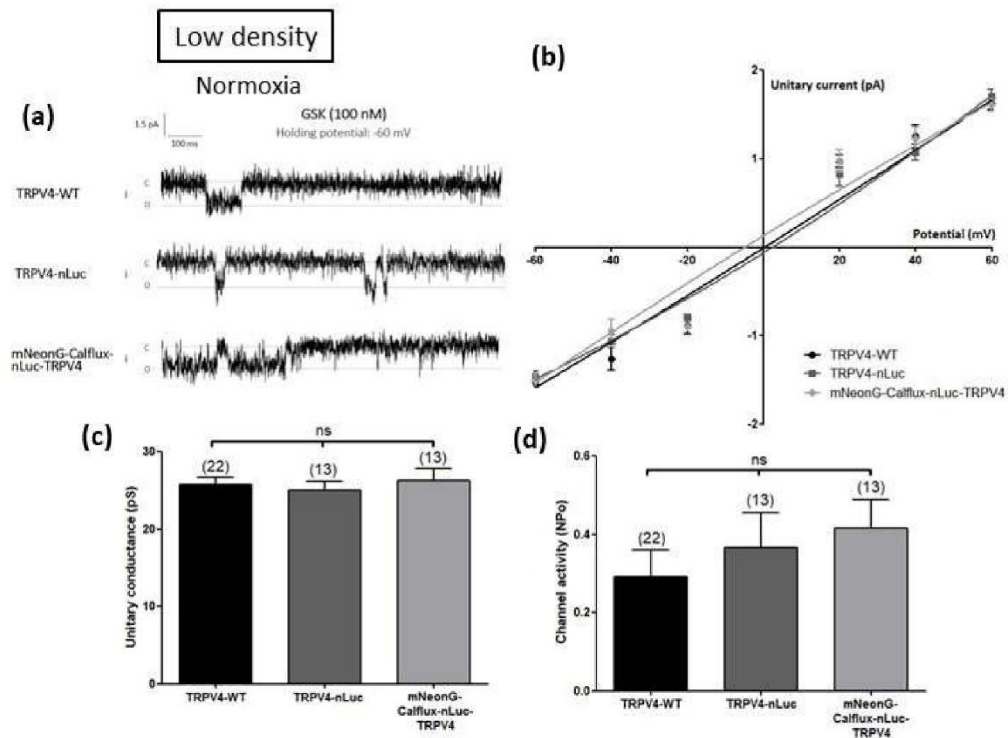


Figure S2. Characterization of emission spectra of TRPV4 BRET probes in transiently transfected HEK293T cells cultured under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) at high cell confluence (3x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>). Representative emission spectra in % of maximal RLU for nLuc and mNeonG measured under (a) normoxia (21% O<sub>2</sub>) and (b) hypoxia (1% O<sub>2</sub>), and (c) merge of these spectra. RLU = Relative Light Unit.



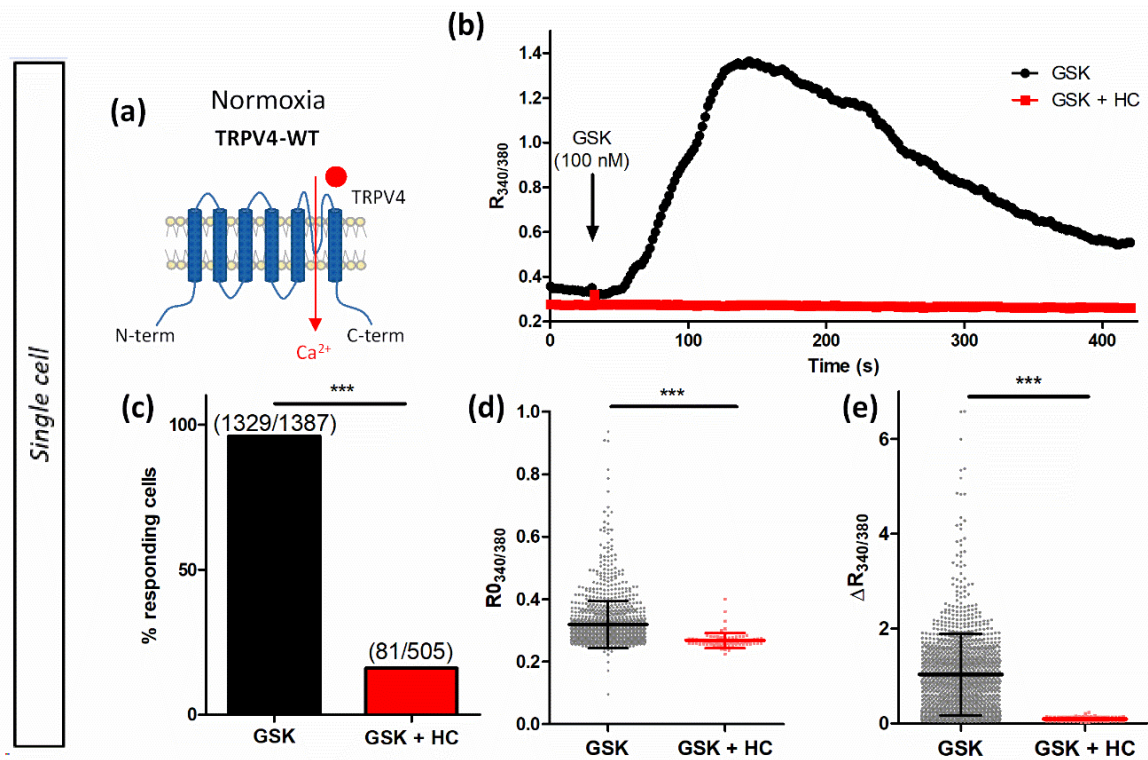
**Figure S3.** Electrophysiological characterization of TRPV4 BRET probes in transiently TRPV4-transfected HEK293T cells cultured under normoxia (21% O<sub>2</sub>) at low cell confluence (1x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>). **(a)** Representative records of current traces (patch clamp; cell-attached configuration at -60 mV holding potential) recorded in HEK cells transfected with TRPV4-WT, TRPV4-nLuc, and mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4. The letters c and o indicate the closed and open channel states, respectively. **(b)** Unitary current (i) / potential (V) curves, **(c)** unitary conductance, and **(d)** channel activity (NPo), determined at a holding potential of -60 mV in presence of the TRPV4 agonist GSK1016790A (100 nM). Data are expressed as mean value ± SEM. The number of cells (c and d) is indicated in brackets. ns indicates a non-significant difference, Kruskal-Wallis test.

**Supplementary Table S1.** Sequences of cDNA “bricks” used.  
 → cf. attached file (online supplement #2)

### 1.3. Résultats complémentaires

#### 1.3.1. Mesures du calcium cytosolique sur cellules uniques avec la sonde Fura-2

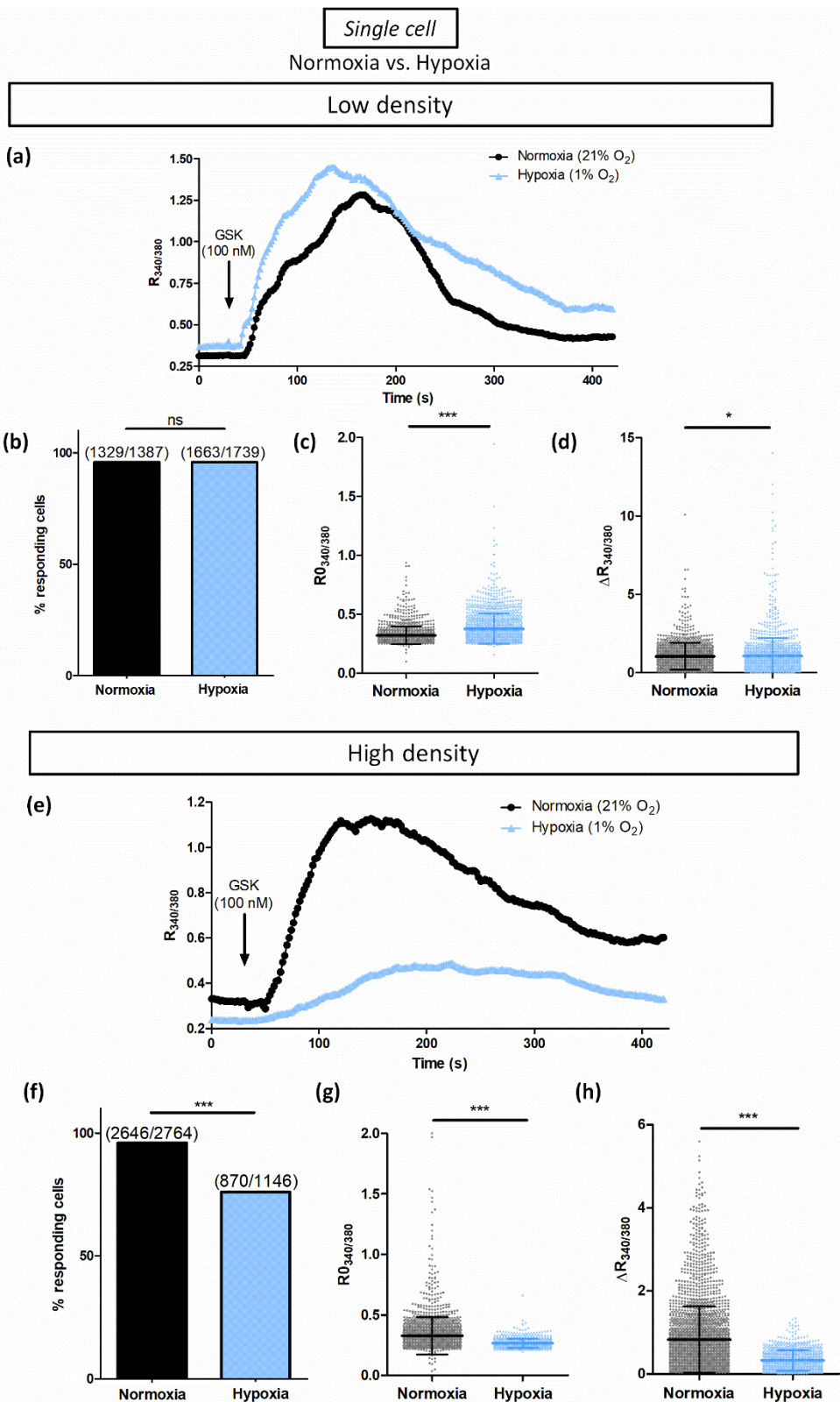
En complément des analyses effectuées sur des populations cellulaires avec la sonde Fluo-4 AM, la  $[Ca^{2+}]_i$  ainsi que l'amplitude des réponses calciques au GSK ont été évaluées grâce à des mesures sur cellules individualisées en imagerie avec la sonde Fura-2 LR AM, nous permettant de déterminer un pourcentage de cellules répondantes. L'utilisation d'une sonde calcique ratiométrique nous a également permis de mettre en évidence des différences de  $[Ca^{2+}]_i$  au niveau basal. La réponse calcique au GSK a tout d'abord été réalisée sur des cellules cultivées en normoxie à faible confluence en présence ou non du HC067047 (HC, inhibiteur de TRPV4). Après incubation avec 1  $\mu$ M de HC, les cellules présentent une  $[Ca^{2+}]_i$  basale moins élevée de  $0.32 \pm 0.08$  (n = 1329) sans HC à  $0.27 \pm 0.02$  (n = 81) en sa présence [Figure 30c]. Les réponses sont également diminuées avec un pourcentage de cellules répondantes plus faible, mais aussi une amplitude de réponse quasiment totalement inhibée passant de  $1.03 \pm 0.86$  (n = 1329) à  $0.09 \pm 0.04$  (n = 81) [Figure 30d].



**Figure 30 : Caractérisation des réponses calciques TRPV4 dans des HEK transfectées avec TRPV4-WT et cultivées en normoxie à faible densité.**

(a) Représentation schématique de TRPV4-WT, (b-e) variation du ratio  $R_{340/380}$  mesuré sur cellule unitaire à faible confluence ( $1 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) par vidéomicroscopie avec la sonde Fura-2 LR AM en présence ou en absence de l'inhibiteur spécifique de TRPV4 HC067047 (HC, 1  $\mu$ M). (b) Tracés illustratifs typiques pour des cellules uniques après ajout de l'agoniste sélectif de TRPV4 GSK1016790A (GSK, 100 nM) en présence ou en absence de HC à 30 s d'enregistrement (indiqué par une flèche), (c) pourcentage de cellules répondantes, (d) ratio  $R_{0,340/380}$  basal, et (e) amplitude de réponse  $\Delta R_{340/380}$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. Le nombre de cellules (c) est indiqué entre parenthèses. Une différence significative est indiquée par \*\*\* quand  $P < 0.001$ , test de Chi-deux (c) ou Mann-Whitney (d-e).





**Figure 31: Modulation des réponses calciques TRPV4 à l'hypoxie à faible et forte densités.**

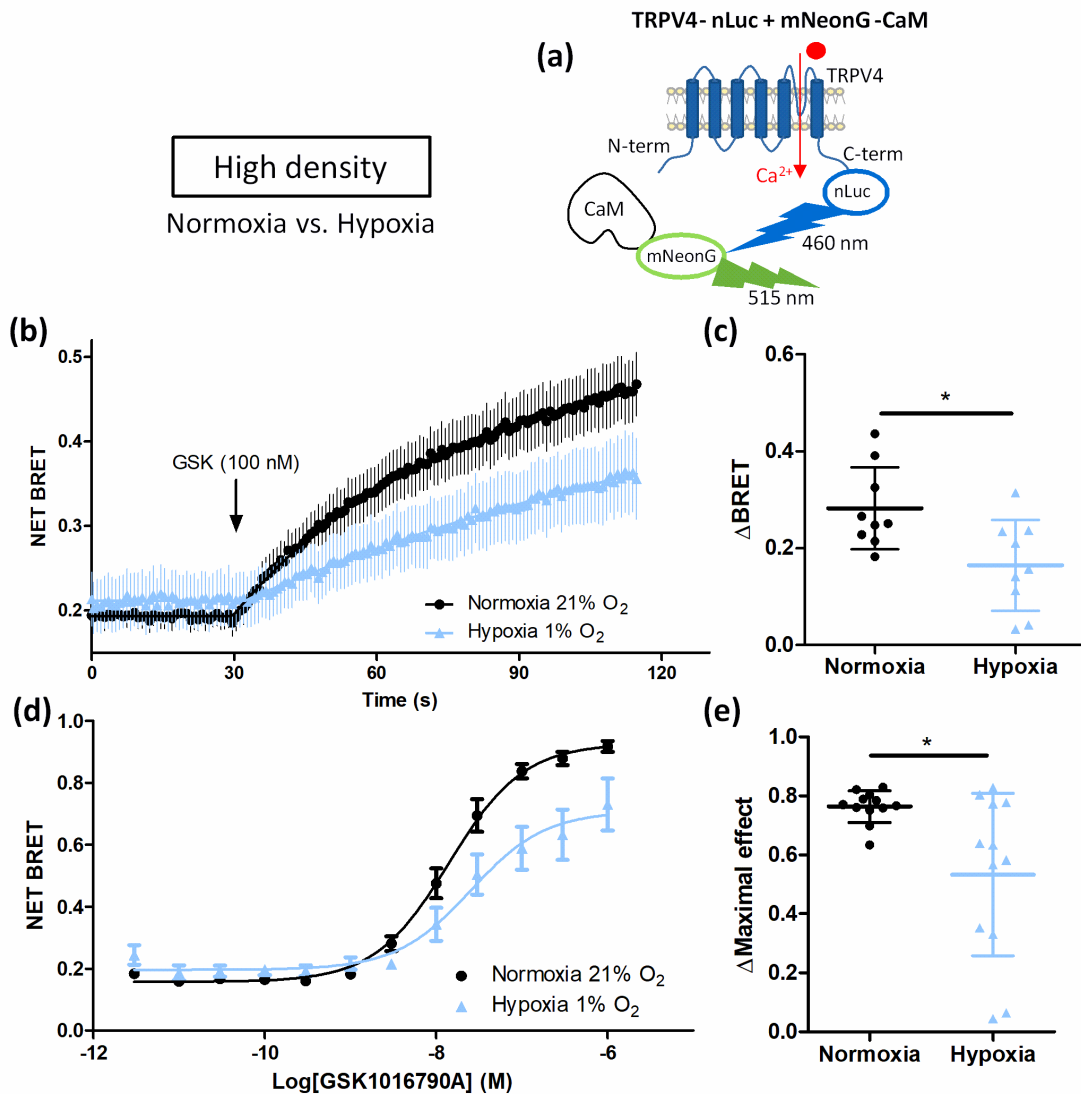
(a-h) Variation du ratio  $R_{340/380}$  mesuré sur cellule unitaire par vidéomicroscopie avec la sonde Fura-2 LR AM sur des HEK293T transfectées avec TRPV4-WT et cultivées en normoxie (21 %  $O_2$ ) ou en hypoxie (1 %  $O_2$ ) à faible ( $1 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>, a-d) et forte ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>, e-h) densités. (a et e) Tracés illustratifs typiques pour des cellules uniques après ajout de l'agoniste sélectif de TRPV4 GSK1016790A (GSK, 100 nM) à 30 s d'enregistrement (indiqué par une flèche), (b et f) pourcentage de cellules répondantes, (c et g) ratio  $R_{0_{340/380}}$  basal, et (d et h) amplitude de réponse  $\Delta R_{340/380}$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. Le nombre de cellules (b et f) est indiqué entre parenthèses. Une différence significative est indiquée par \* quand  $P < 0.05$ , \*\*\* quand  $P < 0.001$  et ns indique une différence non significative, test de Chi-deux (b et f) ou Mann-Whitney (c-d, g-h).



En réponse à l'hypoxie, à faible confluence, les cellules ont un niveau de calcium basal plus élevé ( $0.38 \pm 0.13$ ,  $n = 1663$ ) et une amplitude de réponse au GSK plus importante ( $1.05 \pm 1.169$ ,  $n = 1663$ ) [Figure 31e-f]. En revanche, à forte densité, le niveau de calcium basal est plus faible de 19 % et les réponses au GSK diminuées passant de  $0.83 \pm 0.80$  ( $n = 2646$ ) en normoxie à  $0.33 \pm 0.25$  ( $n = 870$ ) en hypoxie [Figure 31g-h].

### 1.3.2. Interaction entre TRPV4 et la CaM grâce au BRET

L'interaction entre TRPV4 et la CaM a pu être étudiée grâce aux sondes BRET intermoléculaires TRPV4-nLuc et mNeonG-CaM [Figure 32a] sur cellules cultivées à forte densité en normoxie et hypoxie chronique. En effet, comme décrit précédemment, TRPV4 possède des domaines de liaison à la CaM. L'entrée de  $Ca^{2+}$  via TRPV4 pourrait donc entraîner une interaction entre la CaM liée au  $Ca^{2+}$  et TRPV4 pouvant ainsi moduler son activité. En normoxie, l'application de GSK (100 nM) entraîne une augmentation de l'interaction entre TRPV4 et la CaM. Cette interaction est diminuée en condition d'hypoxie chronique avec une amplitude de BRET qui passe de  $0.28 \pm 0.08$  ( $n = 9$ ) en normoxie à  $0.16 \pm 0.09$  ( $n = 9$ ) en hypoxie en cinétique de réponse au GSK [Figure 32b-c] et de  $0.76 \pm 0.05$  ( $n = 12$ ) à  $0.53 \pm 0.28$  ( $n = 12$ ) en courbe de concentration-réponse [Figure 32d-e]. Ceci suggère que la perte d'expression de TRPV4 à la membrane plasmique en hypoxie chronique limite son interaction avec la CaM induite par l'activation au GSK.



**Figure 32 : L'interaction de TRPV4 avec la CaM est diminuée dans les cellules cultivées à forte densité en hypoxie.**

(a) Représentation schématique de TRPV4-nLuc et mNeonG-CaM. (b) Mesure du BRET en cinétique en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées avec TRPV4-nLuc et mNeonG-CaM et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hypoxie (1 % O<sub>2</sub>), et (c) amplitude maximale ( $\Delta$ BRET). Nombre d'expériences indépendantes  $n = 9$ . (d) Courbes de concentration-réponse au GSK sur des HEK293T transfectées avec TRPV4-nLuc et mNeonG-CaM et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hypoxie (1 % O<sub>2</sub>), et (e) amplitude maximale des courbes concentration-réponse. Nombre d'expériences indépendantes  $n = 12$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. Une différence significative est indiquée par \* quand  $P < 0.05$ , test Mann-Whitney.

#### 1.4. Discussion influence de l'hypoxie et de la confluence

Ces travaux ont permis de montrer que l'hypoxie pouvait moduler l'activité de TRPV4 selon la confluence cellulaire *in vitro*. En effet, à faible confluence cellulaire, les réponses calciques en réponse au GSK sont plus importantes et l'activité de TRPV4 est augmentée. À l'inverse, à forte confluence, les réponses calciques au GSK sont inhibées, et cette absence de réponse s'explique par l'internalisation du canal qui n'est plus exprimé à la membrane plasmique.

Ces résultats mettent en évidence un paramètre important dans l'étude de canaux mécanosensibles comme TRPV4 : la confluence cellulaire. Le contrôle de la confluence cellulaire *in vitro* est essentiel et une modification de ce paramètre pourrait entraîner un biais lié à la culture des cellules. En effet, *in vivo*, il a été montré que TRPV4 était impliqué dans le développement de l'HTP et que son activité était augmentée en condition d'hypoxie. Dans notre étude, on retrouve bien cette activité accrue de TRPV4 en hypoxie pour les cellules cultivées à faible densité. De la même façon, le conditionnement en hypoxie *in vitro* de CMLAP à faible densité entraînait une augmentation des réponses médiées par TRPV4. Or, pour des HEK293T cultivées à forte densité, nous avons obtenu des résultats opposés, où TRPV4 était internalisé en condition d'hypoxie et où les réponses au GSK étaient diminuées. Ces résultats à forte confluence peuvent sembler inattendus par rapport à l'augmentation de l'activité de TRPV4 observée en condition d'hypoxie *in vivo*, où les cellules sont confluentes. De telles différences peuvent s'expliquer, d'une part, par l'utilisation de cellules différentes (HEK293T dans notre étude alors que ce sont des CE, CML ou fibroblastes au niveau des artères pulmonaires). D'autre part, ces différences peuvent s'expliquer par la différence au niveau du modèle d'étude par rapport aux conditions physiologiques. Contrairement à la culture cellulaire classique, où les cellules sont cultivées sur un support rigide en monocouche de cellules adhérant sur un fond plat, les cellules au niveau des vaisseaux sont entourées d'autres cellules et de matrice extracellulaire, et subissent des tensions pariétales de toute part, ainsi que les contraintes mécaniques liées à la pression et au flux sanguins. Dans les tissus, les cellules se structurent et interagissent différemment, pouvant former des jonctions sur l'ensemble de leur surface, et non pas seulement sur un plan linéaire. Il est donc difficile de comparer un modèle de culture en deux dimensions avec les conditions physiologiques. De plus en plus d'études utilisent des modèles en trois dimensions afin de s'approcher au mieux des conditions physiologiques. Mais là aussi, les résultats pourraient être biaisés selon les conditions utilisées pouvant modifier les contraintes mécaniques perçues par les cellules et/ou leur organisation structurelle.

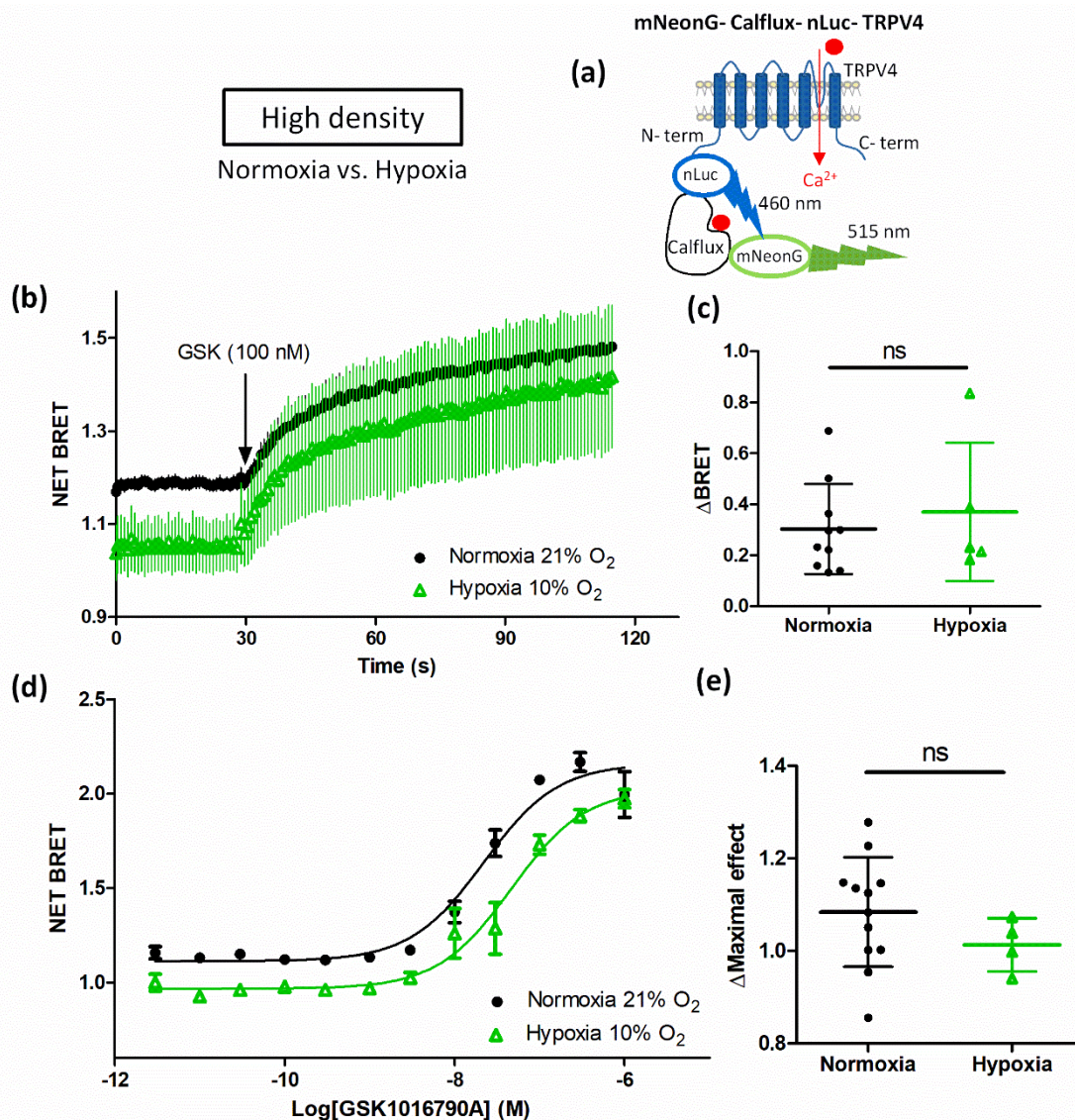
## **2. Effet de la variation du pourcentage en O<sub>2</sub> sur TRPV4**

### **2.1. Hypoxie chronique intermédiaire (10 % O<sub>2</sub>)**

De précédentes études ont montré qu'un conditionnement de CMLAP à l'hypoxie pendant 48 h à 1 % O<sub>2</sub> entraînait un niveau de calcium basal et une augmentation des réponses calciques à l'hypoosmolarité plus importants que pour une hypoxie à 10 % O<sub>2</sub> [65]. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de l'hypoxie chronique intermédiaire (10 % O<sub>2</sub>) sur TRPV4 afin de voir si un niveau d'hypoxie plus modéré induit des modifications de l'activité du canal.

#### **2.1.1. Calcium au niveau de TRPV4 avec la sonde BRET 2G**

Tout d'abord, le niveau de Ca<sup>2+</sup> dans le nanoenvironnement de TRPV4 a été évalué en réponse au GSK grâce à la sonde 2G mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4. Aucune différence significative n'a été observée pour les amplitudes de réponse au GSK entre les conditions de normoxie et d'hypoxie chronique intermédiaire que ce soit en cinétique ou en concentration-réponse [Figure 33]. En condition d'hypoxie à 1 % O<sub>2</sub>, le passage de Ca<sup>2+</sup> au niveau de TRPV4 était diminué à forte confluence ([137] Figure 9). Ainsi, il semblerait que le niveau d'O<sub>2</sub> auquel ont été conditionnées les cellules soit un facteur important dans la modification des réponses TRPV4. En effet, après 48 h d'hypoxie à 10 % O<sub>2</sub>, la réponse calcique suite à l'activation de TRPV4 n'est pas modifiée, alors qu'à 1 % O<sub>2</sub>, la réponse calcique était fortement inhibée.



**Figure 33 : Les variations de  $Ca^{2+}$  au niveau de TRPV4 ne sont pas modifiées en hypoxie intermédiaire (10 %  $O_2$ ).**

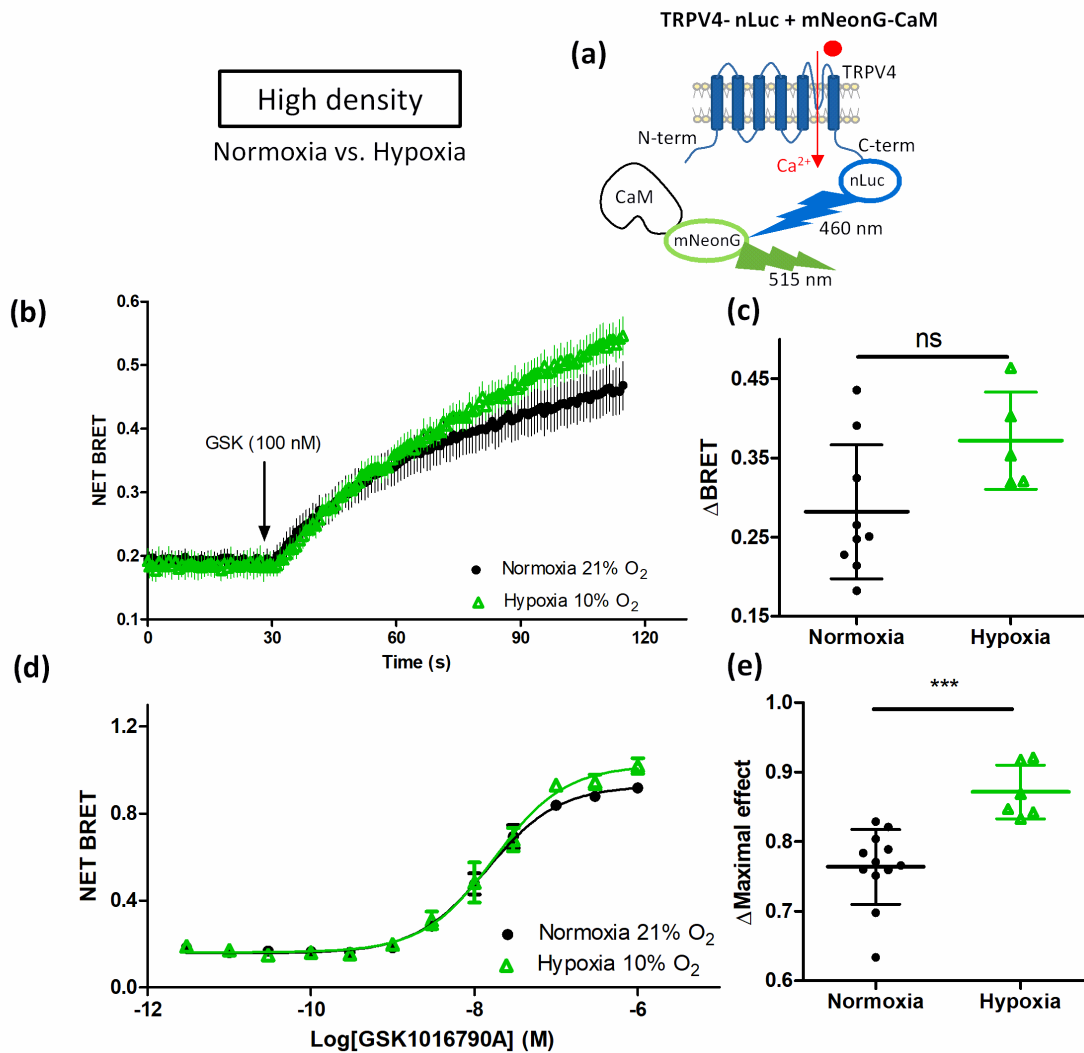
(a) Représentation schématique de mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4. (b) Mesure du BRET en cinétique en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées avec mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 %  $O_2$ ) ou en hypoxie intermédiaire (10 %  $O_2$ ), et (c) amplitude maximale ( $\Delta$ BRET). (d) Courbes de concentration-réponse au GSK sur des HEK293T transfectées avec mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 %  $O_2$ ) ou en hypoxie intermédiaire (10 %  $O_2$ ), et (e) amplitude maximale des courbes concentration-réponse. Nombre d'expériences indépendantes  $4 \leq n \leq 12$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. ns indique une différence non significative, test Mann-Whitney.



### 2.1.2. Interaction entre TRPV4 et la CaM grâce au BRET intermoléculaire

Pour compléter les observations sur les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  en hypoxie chronique intermédiaire, l'interaction entre TRPV4 et la CaM a ensuite été évaluée. En cinétique de réponse, il n'y a pas de différence significative d'amplitude de BRET en réponse au GSK (100 nM) entre les conditions de normoxie et d'hypoxie 10 %  $\text{O}_2$  [Figure 34b-c]. En outre, l'amplitude des courbes de concentration-réponse est augmentée en hypoxie 10 %  $\text{O}_2$  ( $0.87 \pm 0.04$ ,  $n = 6$ ) par rapport à la normoxie ( $0.76 \pm 0.05$ ,  $n = 12$ ) [Figure 34d-e].

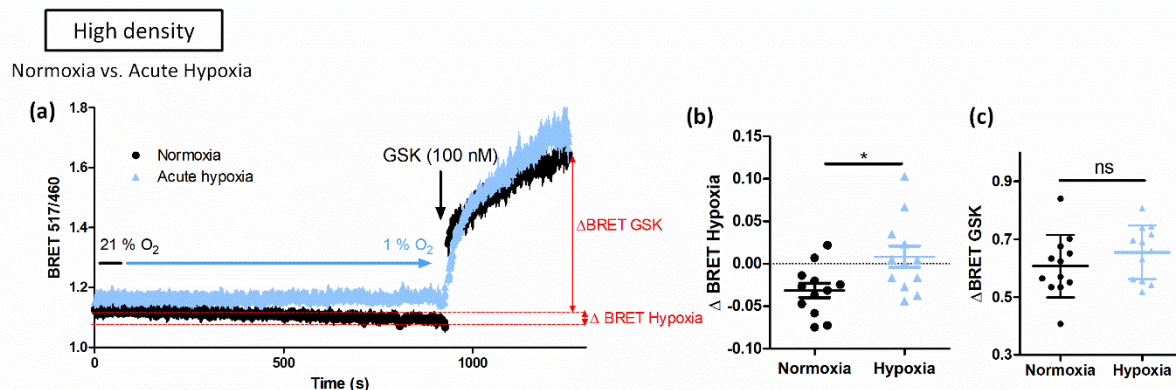
Finalement, l'hypoxie chronique intermédiaire (10 %  $\text{O}_2$ ) à forte confluence ne semble pas modifier l'activité de TRPV4 par rapport à la normoxie. Cependant, l'interaction avec la CaM semble favorisée en réponse au GSK dans ces conditions. À l'inverse, l'interaction de TRPV4 avec la CaM était diminuée en réponse au GSK pour les cellules cultivées en hypoxie à 1 %  $\text{O}_2$  [Figure 32]. Cela suggère l'importance du niveau de  $\text{O}_2$  dans la régulation de l'activité de TRPV4 et de ses interactions avec divers partenaires dont la CaM. En effet, comme décrit précédemment, la CaM peut moduler l'activité de TRPV4, notamment sensibiliser son activation aux stimuli mécaniques ou aux activateurs (comme montré avec les EET) [138]. Si en hypoxie chronique à 1 %  $\text{O}_2$ , l'interaction entre TRPV4 et la CaM est diminuée, cela peut s'expliquer par la relocalisation du canal, qui n'est plus exprimé au niveau membranaire, empêchant ainsi l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via TRPV4. Il est possible qu'en hypoxie chronique à 10 %  $\text{O}_2$ , TRPV4 soit toujours exprimé au niveau membranaire. Il serait intéressant de vérifier la localisation de TRPV4 qui pourrait expliquer que son interaction avec la CaM au niveau basal n'est pas modifiée par rapport à la condition de normoxie. En revanche, lorsque TRPV4 est activé (à de fortes concentrations de GSK), l'interaction avec la CaM est alors favorisée en hypoxie 10 %  $\text{O}_2$ , bien que la réponse calcique induite par le GSK ne soit pas modifiée [Figure 33].



**Figure 34 : Interaction entre TRPV4 et la CaM en hypoxie intermédiaire.**

(a) Représentation schématique de TRPV4-nLuc + mNeonG-CaM. (b) Mesure du BRET en cinétique en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées avec TRPV4-nLuc + mNeonG-CaM et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hypoxie intermédiaire (10 % O<sub>2</sub>), et (c) amplitude maximale ( $\Delta$ BRET). (d) Courbes de concentration-réponse au GSK sur des HEK293T transfectées avec TRPV4-nLuc + mNeonG-CaM et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hypoxie intermédiaire (10 % O<sub>2</sub>), et (e) amplitude maximale des courbes concentration-réponse. Nombre d'expériences indépendantes  $5 \leq n \leq 12$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. Une différence significative est indiquée par \*\*\* quand  $P < 0.001$ . ns indique une différence non significative, test Mann-Whitney.



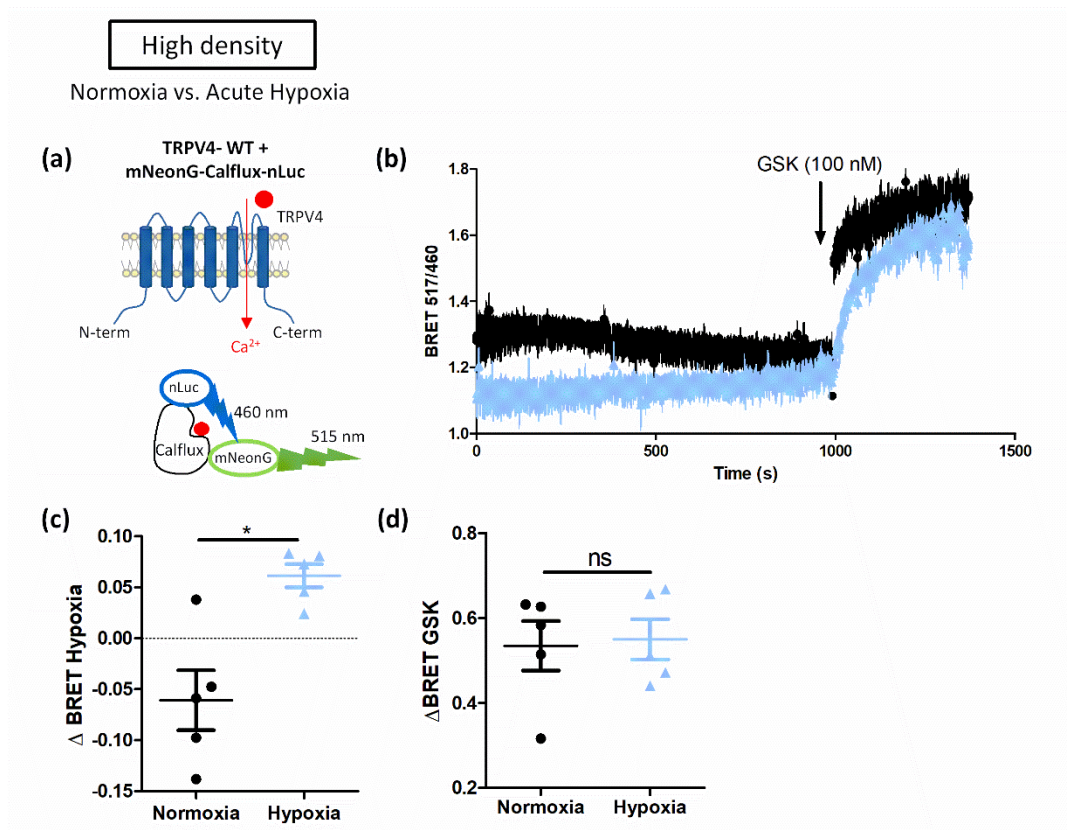


**Figure 36 : Les variations de  $Ca^{2+}$  au niveau de TRPV4 en hypoxie aiguë.**

(a) Cinétique de mesure du BRET en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées avec mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hypoxie aiguë (1 % O<sub>2</sub>). La flèche en bleu indique la descente du niveau de O<sub>2</sub> dans l'incubateur de 21 % O<sub>2</sub> vers 1 % O<sub>2</sub>. Les paramètres quantifiés sont indiqués en rouge. (b) Variation du BRET suite à la descente en hypoxie ( $\Delta$ BRET Hypoxie) et (c) amplitude maximale en réponse au GSK ( $\Delta$ BRET GSK). Nombre d'expériences indépendantes  $n = 12$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. Une différence significative est indiquée par \* quand  $P < 0.05$ . ns indique une différence non significative, test Mann-Whitney.

### 2.2.2. Effet de l'hypoxie aiguë sur le calcium cytosolique

Ensuite, la variation du niveau de calcium cytosolique global a été étudiée avec la construction mNeonG-Calflux-nLuc soluble en présence de TRPV4-WT. Que ce soit en normoxie ( $0.550 \pm 0.106$ ,  $n = 5$ ) ou en hypoxie aiguë ( $0.535 \pm 0.131$ ,  $n = 5$ ), l'amplitude de réponse au GSK n'est pas significativement différente [Figure 37b et d]. Et de la même façon que pour la  $[Ca^{2+}]_i$  au niveau de TRPV4, la  $[Ca^{2+}]_i$  globale est également diminuée en normoxie au cours du temps, alors qu'elle augmente légèrement lors de la descente en hypoxie aiguë [Figure 37b et c].



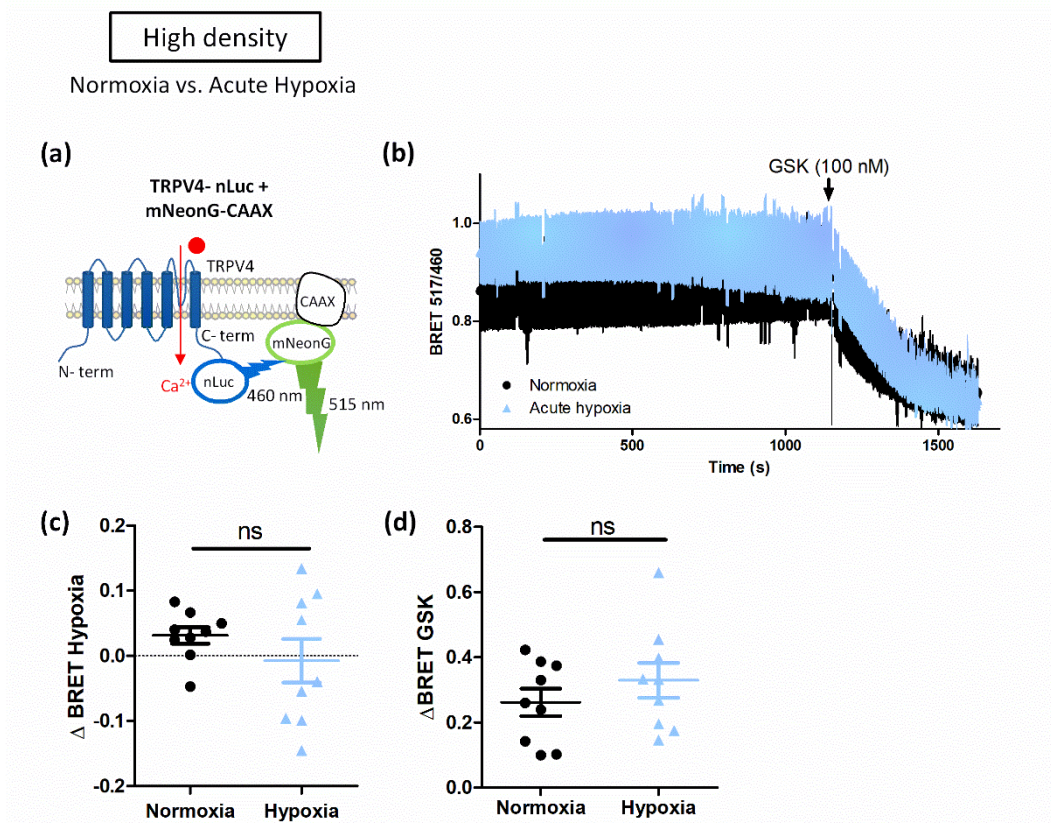
**Figure 37 : Les variations de  $Ca^{2+}$  cytosolique en hypoxie aiguë.**

(a) Représentation schématique de mNeonG-Calflux-nLuc + TRPV4-WT. (b) Cinétique de mesure du BRET en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées avec mNeonG-Calflux-nLuc + TRPV4-WT et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hypoxie aiguë (1 % O<sub>2</sub>). (c) Variation du BRET suite à la descente en hypoxie ( $\Delta$ BRET Hypoxie) et (d) amplitude maximale en réponse au GSK ( $\Delta$ BRET GSK). Nombre d'expériences indépendantes  $n = 5$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. Une différence significative est indiquée par \* quand  $P < 0.05$ . ns indique une différence non significative, test Mann-Whitney.



### 2.2.3. Effet de l'hypoxie aiguë sur la localisation membranaire de TRPV4

Nous avons ensuite vérifié la localisation membranaire de TRPV4 grâce à la construction intermoléculaire mNeonG-CAAX + TRPV4-nLuc. Aucune différence d'amplitude de BRET n'a été observée suite à la mise en hypoxie aiguë confirmant que TRPV4 reste exprimé à la membrane. De plus, en réponse au GSK, le BRET diminue de façon similaire entre les conditions normoxie et hypoxie aiguë suggérant que l'hypoxie aiguë n'affecte pas l'internalisation du canal suite à son activation par le GSK [Figure 38].

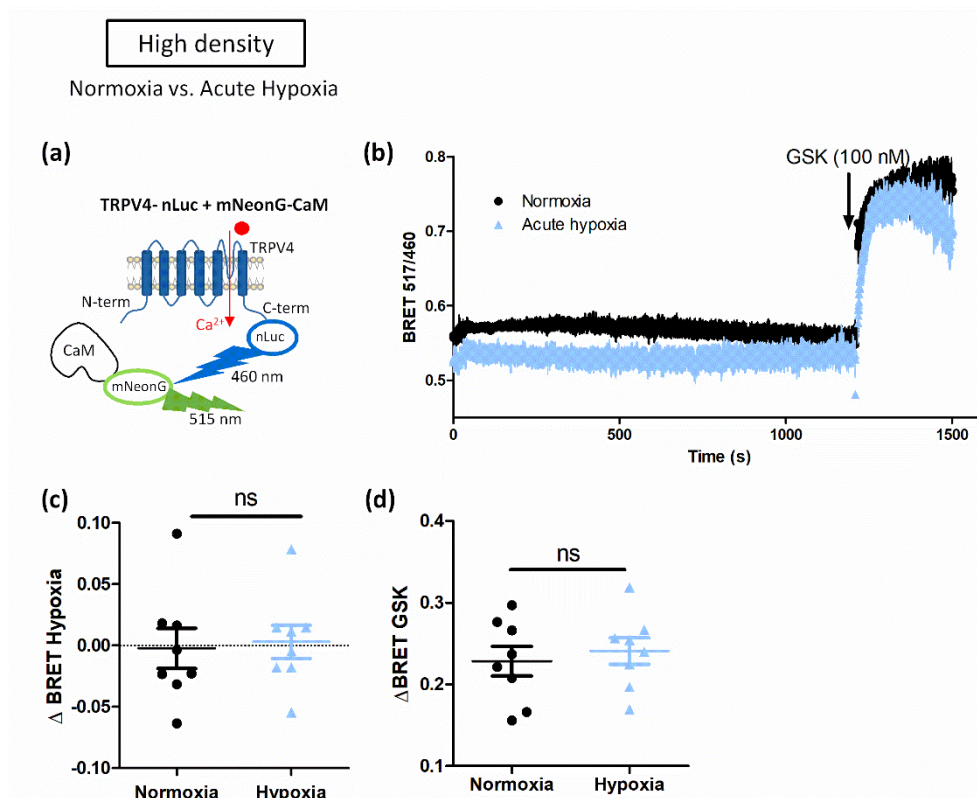


**Figure 38 : La localisation membranaire de TRPV4 n'est pas modifiée en hypoxie aiguë.**

(a) Représentation schématique de TRPV4-nLuc + mNeonG-CAAX. (b) Cinétique de mesure du BRET en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées TRPV4-nLuc + mNeonG-CAAX et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hypoxie aiguë (1 % O<sub>2</sub>). (c) Variation du BRET suite à la descente en hypoxie ( $\Delta$ BRET Hypoxie) et (d) amplitude maximale absolue en réponse au GSK ( $\Delta$ BRET GSK). Nombre d'expériences indépendantes n = 9. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. ns indique une différence non significative, test Mann-Whitney.

### 2.2.4. Effet de l'hypoxie aiguë sur l'interaction entre TRPV4 et la CaM

Comme la CaM peut se fixer au niveau de domaines intracellulaires de TRPV4 et ainsi moduler son activité, nous avons regardé si l'hypoxie aiguë pouvait modifier cette interaction. Aucune différence de BRET n'a été mesurée lors de la descente en hypoxie [Figure 39b et c], et l'interaction de TRPV4 avec la CaM n'est pas non plus modifiée en réponse au GSK en hypoxie aiguë par rapport à la normoxie avec une amplitude de BRET de  $0.241 \pm 0.045$  ( $n = 8$ ) et  $0.228 \pm 0.057$  ( $n = 8$ ) respectivement [Figure 39b et d].



**Figure 39 : L'interaction entre TRPV4 et la CaM n'est pas modifiée en hypoxie aiguë.**

(a) Représentation schématique de TRPV4-nLuc + mNeonG-CaM. (b) Cinétique de mesure du BRET en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées TRPV4-nLuc + mNeonG-CaM et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hypoxie aiguë (1 % O<sub>2</sub>). (c) Variation du BRET suite à la descente en hypoxie ( $\Delta$ BRET Hypoxie) et (d) amplitude maximale en réponse au GSK ( $\Delta$ BRET GSK). Nombre d'expériences indépendantes  $n = 8$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. ns indique une différence non significative, test Mann-Whitney.

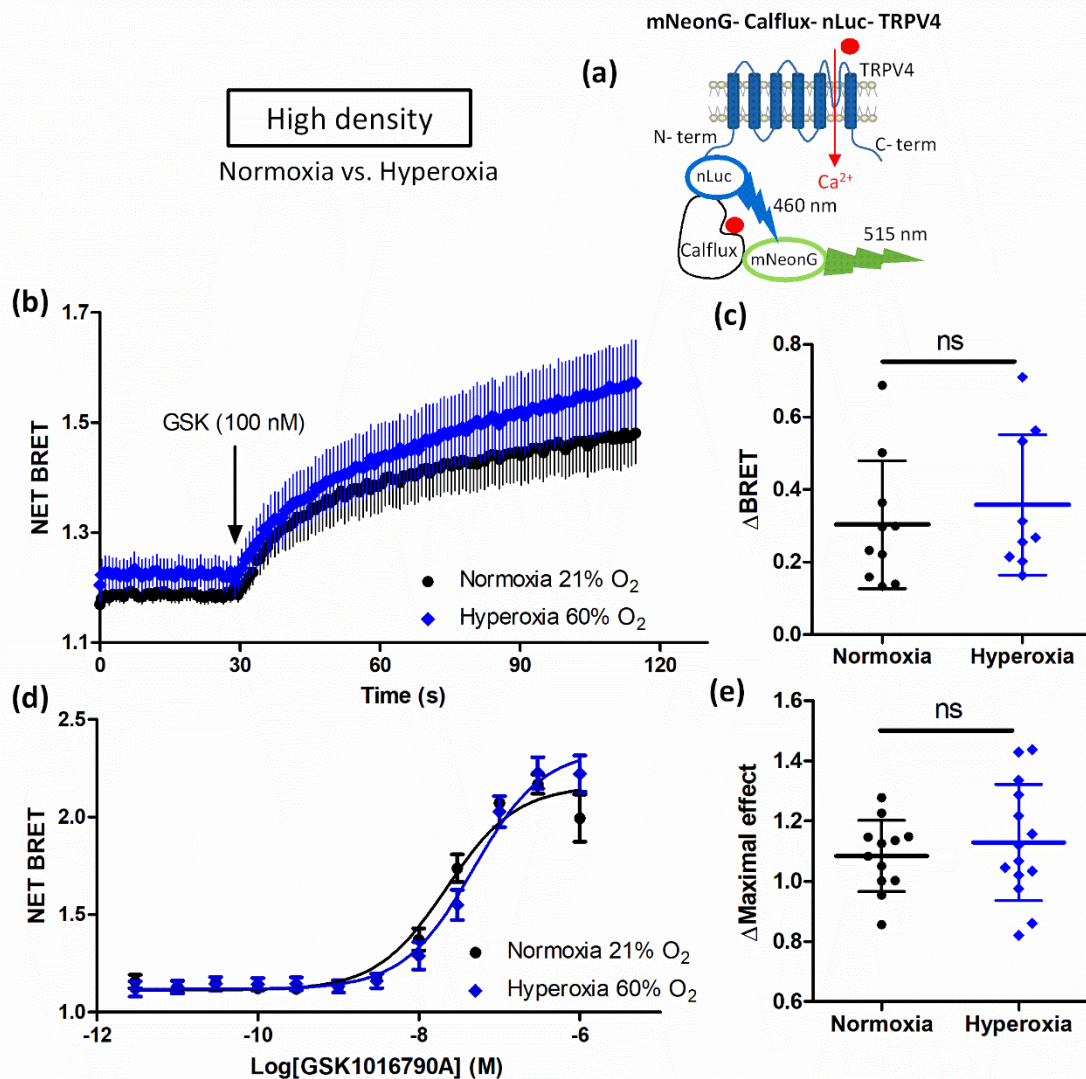
### 2.3. Hyperoxie chronique (60 % O<sub>2</sub>)

Après s'être intéressés à différents niveaux d'hypoxie (1 % et 10 % d'O<sub>2</sub>), nous avons voulu évaluer l'effet de l'hyperoxie sur TRPV4. En effet, de nombreuses études ont permis l'étude de l'effet de l'hypoxie sur TRPV4, et notamment son implication dans l'HTP, mais les effets de l'hyperoxie sur TRPV4 n'ont jamais été décrits, ni son éventuelle implication dans la dysplasie broncho-pulmonaire. Pour cela, des mesures de BRET ont été réalisées avec différentes constructions sur des cellules cultivées à forte densité pendant 48 h de normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou d'hyperoxie (60 % O<sub>2</sub>).



### 2.3.1. Calcium au niveau de TRPV4 avec la sonde BRET 2G

Le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'environnement proche du canal a été évalué en réponse au GSK grâce à la sonde 2G mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4. Aucune différence significative n'a été observée pour les amplitudes de réponse au GSK entre les conditions de normoxie et d'hyperoxie chronique que ce soit en cinétique ou en concentration-réponse [Figure 40].

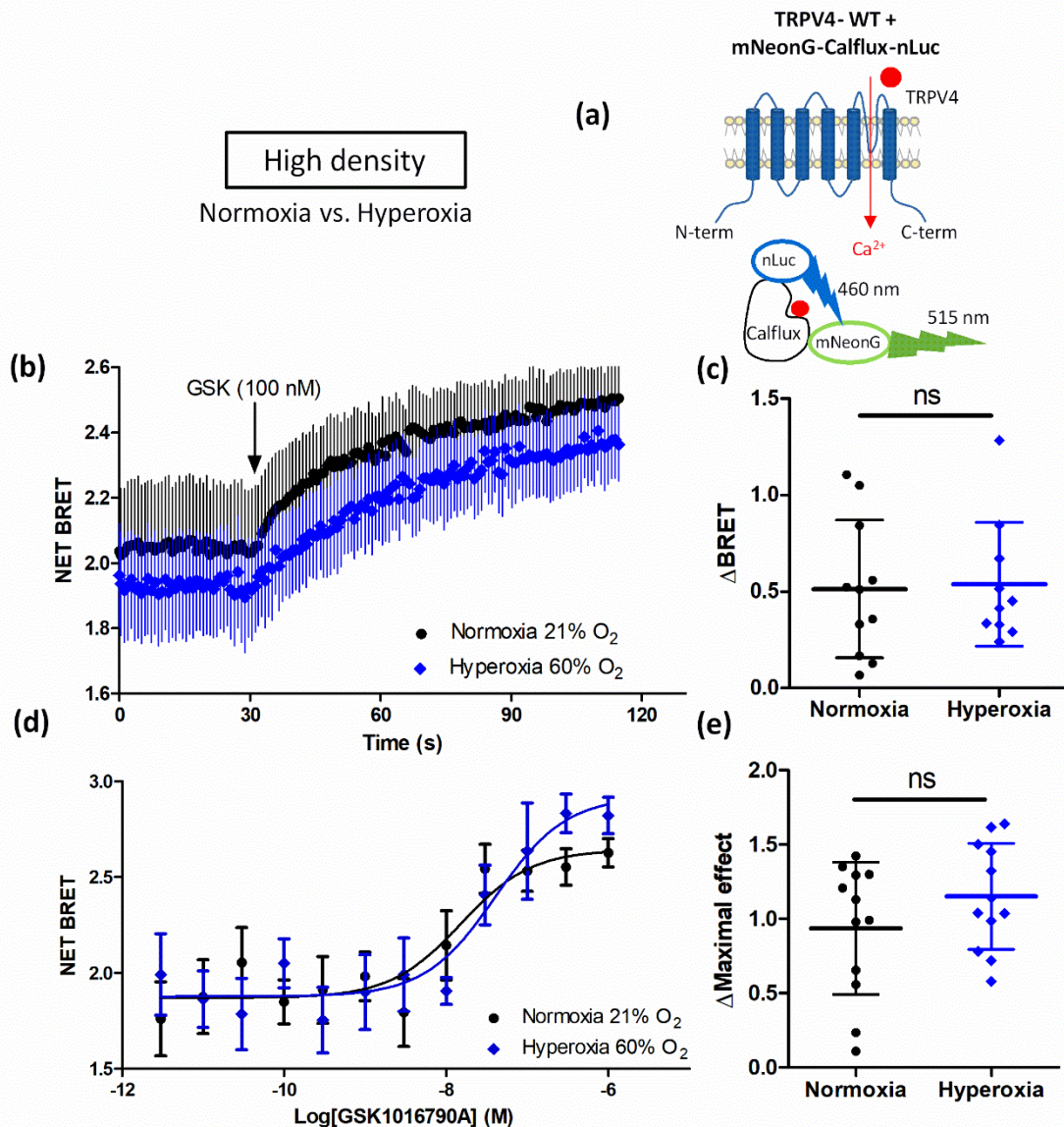


**Figure 40 : Les variations de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de TRPV4 ne sont pas modifiées en hyperoxie.**

(a) Représentation schématique de mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4. (b) Mesure du BRET en cinétique en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées avec mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hyperoxie (60 % O<sub>2</sub>), et (c) amplitude maximale ( $\Delta\text{BRET}$ ). (d) Courbes de concentration-réponse au GSK sur des HEK293T transfectées avec mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4 et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hyperoxie (60 % O<sub>2</sub>), et (e) amplitude maximale des courbes concentration-réponse. Nombre d'expériences indépendantes  $9 \leq n \leq 14$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. ns indique une différence non significative, test Mann-Whitney.

### 2.3.2. Calcium cytosolique avec la sonde BRET Calflux soluble

Le niveau de calcium cytosolique global a ensuite été étudié avec la sonde mNeonG-Calflux-nLuc soluble dans des cellules co-transfectées avec TRPV4-WT. De la même façon, aucune différence significative n'a été observée pour les amplitudes de réponse au GSK entre les conditions de normoxie et d'hyperoxie chronique que ce soit en cinétique ou en concentration-réponse [Figure 41].



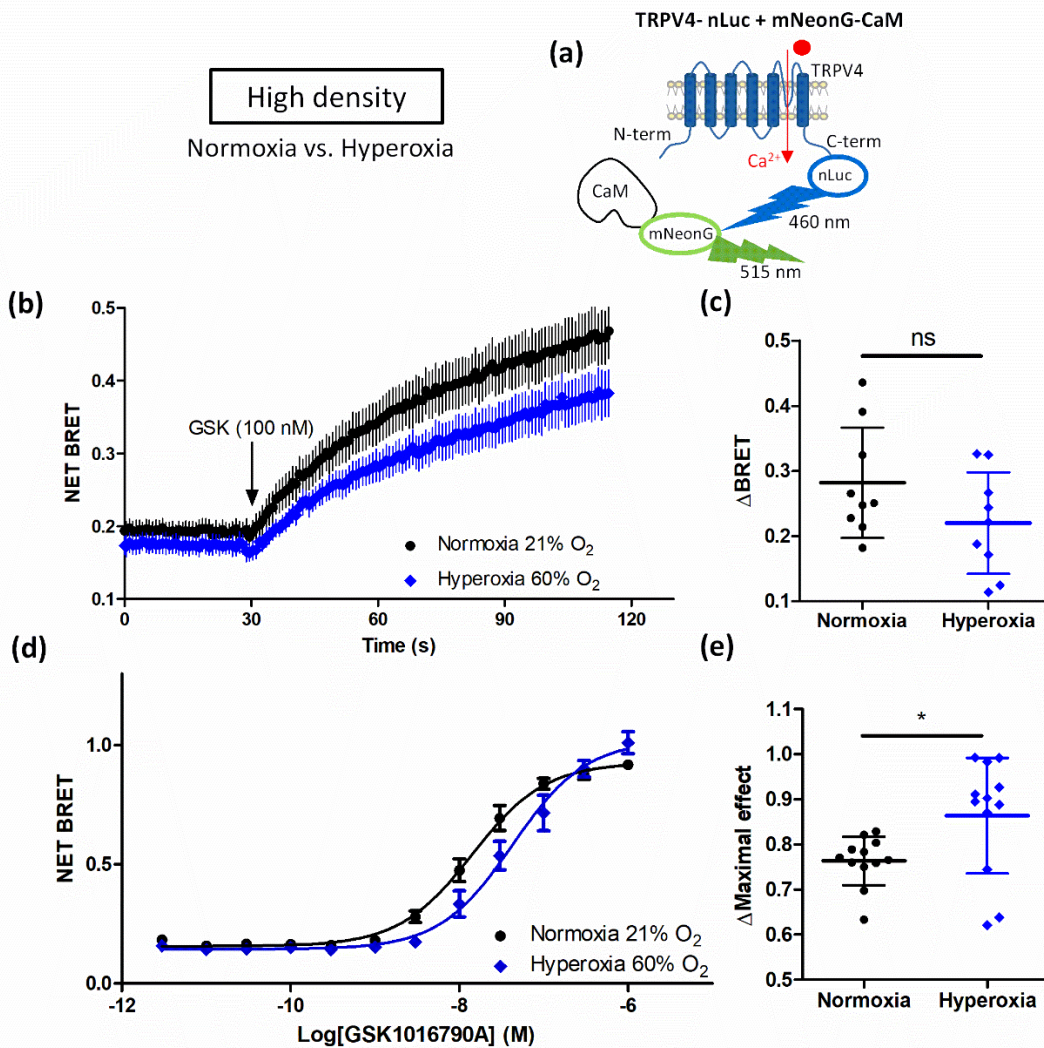
**Figure 41 : Les variations de  $Ca^{2+}$  cytosolique suite à l'activation de TRPV4 ne sont pas modifiées en hyperoxie.**

(a) Représentation schématique de mNeonG-Calflux-nLuc + TRPV4-WT. (b) Mesure du BRET en cinétique en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées avec mNeonG-Calflux-nLuc + TRPV4-WT et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hyperoxie (60 % O<sub>2</sub>), et (c) amplitude maximale ( $\Delta$ BRET). (d) Courbes de concentration-réponse au GSK sur des HEK293T transfectées avec mNeonG-Calflux-nLuc + TRPV4-WT et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 % O<sub>2</sub>) ou en hyperoxie (60 % O<sub>2</sub>), et (e) amplitude maximale des courbes concentration-réponse. Nombre d'expériences indépendantes  $10 \leq n \leq 12$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. ns indique une différence non significative, test Mann-Whitney.



### 2.3.3. Interaction entre TRPV4 et la CaM grâce au BRET intermoléculaire

Pour compléter les observations sur les niveaux de  $Ca^{2+}$  en hyperoxie chronique, l'interaction entre TRPV4 et la CaM a ensuite été évaluée. En effet, bien que l'hyperoxie n'affecte pas les réponses calciques TRPV4 au GSK, son interaction avec des protéines partenaires pouvant moduler son activité comme la CaM pourrait être altérée. En cinétique de réponse, il n'y a pas de différence significative d'amplitude de BRET en réponse au GSK entre les conditions de normoxie et d'hyperoxie 60 %  $O_2$  suite à l'ajout de GSK à 100 nM [Figure 42b-c]. Cependant, l'amplitude des courbes de concentration-réponse est augmentée en hyperoxie ( $0.86 \pm 0.13$ ,  $n = 12$ ) par rapport à la normoxie ( $0.76 \pm 0.05$ ,  $n = 12$ ) [Figure 42d-e]. On remarque d'ailleurs un décalage de l' $EC_{50}$  en hyperoxie  $8.46 \times 10^{-8}$  M pour  $2.00 \times 10^{-8}$  M en normoxie [Figure 42d] qui explique la réponse calcique observée à 100 nM de GSK.



**Figure 42 : Interaction entre TRPV4 et la CaM en hyperoxie.**

(a) Représentation schématique de TRPV4-nLuc + mNeonG-CaM. (b) Mesure du BRET en cinétique en réponse au GSK1016790A (GSK, 100 nM) sur des HEK293T transfectées avec TRPV4-nLuc + mNeonG-CaM et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 %  $O_2$ ) ou en hyperoxie (60 %  $O_2$ ), et (c) amplitude maximale ( $\Delta$ BRET). (d) Courbes de concentration-réponse au GSK sur des HEK293T transfectées avec TRPV4-nLuc + mNeonG-CaM et cultivées à forte densité ( $3 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) en normoxie (21 %  $O_2$ ) ou en hyperoxie (60 %  $O_2$ ), et (e) amplitude maximale des courbes de concentration-réponse. Nombre d'expériences indépendantes  $9 \leq n \leq 12$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. Une différence significative est indiquée par \* quand  $P < 0.05$ . ns indique une différence non significative, test Mann-Whitney.



## 2.4. Discussion effet du pourcentage en O<sub>2</sub>

Les différentes expérimentations réalisées grâce aux constructions BRET nous ont permis d'évaluer l'effet de la variation du pourcentage en O<sub>2</sub> sur les réponses calciques TRPV4, son interaction avec la CaM et son expression à la membrane pour des cellules cultivées à forte confluence.

Comme présenté dans l'article *Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia*, les effets de l'hypoxie chronique 1 % O<sub>2</sub> ont été étudiés à faible et forte confluences. À forte confluence, TRPV4 était internalisé et son activité inhibée. Les réponses calciques au GSK étaient diminuées et l'interaction entre TRPV4 et la CaM également [Figure 32]. Des expériences complémentaires ont été réalisées pour des cellules cultivées en hypoxie chronique à 10 % O<sub>2</sub> qualifiée d'hypoxie « intermédiaire ». Dans cette condition, les réponses calciques médiées par TRPV4 ne sont pas significativement modifiées par rapport à la normoxie. C'est pourquoi, pour l'étude des effets de l'hypoxie sur TRPV4, nous avons par la suite utilisé 1 % d'O<sub>2</sub>.

Dans ces travaux, nous nous sommes également intéressés aux effets de l'hypoxie 1 % O<sub>2</sub> en aigu. En effet, il est possible que l'activité de TRPV4 soit modifiée transitoirement lors d'une hypoxie aiguë avant que les mécanismes d'internalisation ne se mettent en place lors de l'hypoxie chronique. Lorsque les cellules sont soumises à l'hypoxie aiguë, la localisation de TRPV4 à la membrane et son interaction avec la CaM ne sont pas modifiées. En revanche, la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> semble légèrement plus importante pour les cellules exposées à l'hypoxie aiguë par rapport aux cellules maintenues en normoxie mais les réponses au GSK ne sont pas modifiées. Ces résultats suggèrent que TRPV4 peut être sensibilisé à l'hypoxie transitoirement à l'état basal sans impacter les réponses calciques à son agoniste. En effet, TRPV4 est sensible aux ROS [139], et son exposition à une hypoxie aiguë peut entraîner son ouverture et ainsi l'entrée d'ions Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol indépendamment d'une activation via son agoniste.

Nous avons également regardé les effets de l'hypoxie chronique 10 % O<sub>2</sub> et de l'hyperoxie chronique 60 % O<sub>2</sub> sur TRPV4 afin de voir si une variation du niveau de O<sub>2</sub> entraîne des réponses différentes. L'interaction entre la CaM et TRPV4 est favorisée en hypoxie chronique 10 % O<sub>2</sub> et en hyperoxie chronique 60 % O<sub>2</sub> uniquement pour des concentrations très élevées en GSK. Cette interaction avec la CaM pourrait permettre de sensibiliser TRPV4 et d'induire un influx calcique plus important. En revanche, la variation de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> au niveau de TRPV4 n'est pas modifiée dans ces conditions en réponse au GSK (100 nM). Ces résultats suggèrent que l'hypoxie chronique 10 % O<sub>2</sub> et l'hyperoxie chronique 60 % O<sub>2</sub> peuvent potentialiser l'interaction entre TRPV4 et la CaM lors d'un important influx calcique. Il serait intéressant de vérifier si cette potentialisation fonctionne également pour d'autres stimuli, comme des stimuli mécaniques par exemple.

## 3. Travaux complémentaires

### 3.1. Projet CANALBRET

#### 3.1.1. Contexte

Dans le cadre du projet CANALBRET, le but était de générer et valider les différentes constructions BRET dans l'étude des canaux ioniques. Le BRET, par rapport aux techniques classiques de fluorescence couramment utilisées en criblage, permet de mesurer des interactions protéine-protéines, des changements conformationnels, ou des espèces ioniques directement dans le nanoenvironnement du canal d'intérêt en temps réel dans les cellules vivantes. Cette technique étant basée sur un transfert d'énergie non radiatif entre un donneur et un accepteur d'énergie situés à une distance inférieure à 10 nm, les risques de faux positifs liés à la mesure indirecte de l'activité des canaux d'intérêt sont diminués. De plus, le BRET repose sur une réaction enzymatique pour produire de la bioluminescence, et ne nécessite donc pas d'excitation laser, évitant ainsi les dommages aux cellules et les phénomènes de photoblanchiment, autofluorescence ou l'excitation directe de l'accepteur.

Dans un premier article du consortium, le but était de montrer l'efficacité du BRET pour le criblage à haut débit de composés sur les canaux ioniques. Pour cela, deux types de constructions ont été utilisés : les **sondes intramoléculaires 1G** permettant d'étudier les changements conformationnels, et les **sondes intermoléculaires** mettant en évidence les interactions protéine-protéine. Le criblage de la banque Prestwick a été réalisé sur TRPV1 avec les sondes BRET, en calcium automatisé et en patch-clamp automatisé afin de comparer les résultats obtenus avec chaque technique. Enfin, une exemplification du concept des sondes BRET 1G a été faite pour d'autres canaux dont TRPV4, TRPM8,  $K_{Ca2.3}$ , Kir6.1, TREK1, mais aussi le récepteur P2X2. Ces résultats ont été publiés dans le journal *Molecular Pharmacology* en septembre 2021 sous le titre *High-Throughput Screening of Transient Receptor Potential Channel 1 Ligands in the Light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer Technique* [140], et sont présentés ci-dessous sous forme d'article.

Dans le second article du consortium, l'utilisation des **sondes intramoléculaires 2G** a permis la mesure de concentrations en  $Ca^{2+}$  et  $K^+$  ainsi que de la force ionique dans le nanoenvironnement des canaux TRPV1 et P2X5/7 en temps réel après l'application de différents agonistes et antagonistes. Ces mesures, complétées par des enregistrements de courants en patch-clamp, ont mis en évidence un phénomène de biais de sélectivité ionique par le ligand pour TRPV1. Ces résultats font l'objet d'une publication sous presse chez PNAS intitulée *Genetically-encoded BRET probes enlight ligand bias induced variable ion selectivity in TRPV1 and P2X5/7*.

J'ai notamment participé à la validation des sondes BRET pour TRPV4 et TRPV1 en patch-clamp, permettant de confirmer que les propriétés électrophysiologiques des canaux n'étaient pas modifiées en présence des différentes constructions. Toutes les caractérisations électrophysiologiques ont été réalisées au CRCTB U1045.

#### 3.1.2. Criblage à haut débit des ligands de TRPV1 à la lumière de la technique de BRET

## High-Throughput Screening of Transient Receptor Potential Channel 1 Ligands in the Light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer Technique<sup>S</sup>

Yann Chappe, Pauline Michel, Alexandre Joushomme, Solène Barbeau, Sandra Pierredon, Luc Baron, André Garenne, Florence Poullétier De Gannes, Annabelle Hurtier, Stanislas Mayer, Isabelle Lagroye, Jean-François Quignard, Thomas Ducret, Vincent Compan, Christelle Franchet, Yann Percherancier

Bordeaux University, CNRS, IMS Laboratory, UMR5218, F-33400 Talence, France (Y.C., A.J., A.G., F.P.D.G., A.H., I.L., Y.P.); Domain Therapeutics, BIOPARC 1, 850 Boulevard Sébastien Brant, F-67400 Illkirch, France (P.M., L.B., S.M., C.F.); Univ. Bordeaux and INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33600 Pessac, France (S.B., J.F.Q., T.D.); and IGF, CNRS, INSERM, Univ. Montpellier, F-34094 Montpellier, France (S.P., V.C.)

Received March 5, 2021; accepted May 17, 2021

### ABSTRACT

Ion channels are attractive drug targets for many therapeutic applications. However, high-throughput screening (HTS) of drug candidates is difficult and remains very expensive. We thus assessed the suitability of the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technique as a new HTS method for ion-channel studies by taking advantage of our recently characterized intra- and intermolecular BRET probes targeting the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) ion channel. These BRET probes monitor conformational changes during TRPV1 gating and subsequent coupling with calmodulin, two molecular events that are intractable using reference techniques such as automated calcium assay (ACA) and automated patch-clamp (APC). We screened the small-sized Prestwick chemical library, encompassing 1200 compounds with high structural diversity, using either intra- and intermolecular BRET probes or ACA. Secondary screening of the detected hits was done using APC. Multiparametric analysis of our results shed light on the capability of calmodulin inhibitors included in the Prestwick

library to inhibit TRPV1 activation by capsaicin. BRET was the lead technique for this identification process. Finally, we present data exemplifying the use of intramolecular BRET probes to study other transient receptor potential (TRP) channels and non-TRPs ion channels. Knowing the ease of use of BRET biosensors and the low cost of the BRET technique, these assays may advantageously be included for extending ion-channel drug screening.

### SIGNIFICANCE STATEMENT

This study screened a chemical library against TRPV1 ion channel using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) molecular probes and compared the results with the ones obtained using reference techniques such as automated calcium assay and automated patch-clamp. Multiparametric analysis of our results shed light on the capability of calmodulin antagonists to inhibit chemical activation of TRPV1 and indicates that BRET probes may advantageously be included in ion channel drug screening campaigns.

### Introduction

Ion channels are pore-forming membrane proteins allowing ions to flow across membranes. Widely regarded as attractive drug targets for many therapeutic applications, ion channels are the second largest class of membrane proteins for drug discovery behind G protein-coupled receptors (GPCRs). They account for worldwide sales above \$18 billion, which highlights their tractable nature (Wickenden et al., 2012; Global data, 2020). Nonetheless, despite its commercial potential

The research leading to these results received funding from Aquitaine Science Transfert, the Technology Transfer Accelerator Office of New Aquitaine (France); the French National Research Agency (ANR) (grant agreement ANR-19-CE44-0010-02, the CANALBRET project); and the New Aquitaine regional council (grant agreement AAPR20201-2019-8140410, The PHYSTRIG project).

The authors declare that there is no conflict of interest.

<https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000271>

<sup>S</sup>This article has supplemental material available at molpharm.aspetjournals.org.

**ABBREVIATIONS:** ACA, automated calcium assay; AMG517, N-[4-[[6-[4-(Trifluoromethyl)phenyl]-4-pyrimidinyl]oxy]-2-benzothiazolyl]acetamide; APC, automated patch-clamp; BCT C, N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)piperazine-1-carboxamide; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; CAPS, capsaicin; CaM, calmodulin; CPZ, capsazepine; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK293T, Human embryonic kidney 293 cells, that expresses a mutant version of the SV40 large T antigen; HTS, high-throughput screening; HuH7, Human hepatocyte-derived carcinoma cell line 7; Lac Z, E. Coli bacteria gene encoding the  $\beta$ -galactosidase enzyme; mNeonG, mNeon green protein; nLuc, nano luciferase; rLuc2, renilla luciferase 2; OLDA, N-Oleoyldopamine; RTX, resiniferatoxin; sYFP2, yellow super fluorescent protein 2; T4, DNA ligase from bacteriophage T4; TM, transmembrane domain; TRPV1, transient receptor potential channel 1; TRP, transient receptor potential channel; YFP, Yellow Fluorescent Protein.

and academic relevance, *in vitro* pharmacological profiling of most ion channels remains unaddressed (Bagal et al., 2015).

Automated patch-clamp (APC) is rapidly emerging and provides increased throughput screening of ion channel targets (Obergrussberger et al., 2018), but it remains expensive and requires expert handling (Terstappen et al., 2010; Yu et al., 2016). As a consequence, indirect readout technologies are often used for initial screening to be later confirmed by APC. Generally, these techniques take advantage of fluorescent probes to monitor changes in membrane potential or concentration of cytoplasmic ions such as calcium (Terstappen et al., 2010; Yu et al., 2016; McGivern and Ding, 2020). Such assays give only an indirect readout of channel activity, since they monitor molecular mechanisms that are spatially or temporally distant from the studied channel with the risk that the tested compound could up- or downmodulate nonspecific targets. They are therefore prone to a high yield of false positives (Clare, 2010). This drawback can be bypassed by measuring events proximal to the studied ion channel once activated.

For the last twenty years, resonance energy transfer-based techniques have revolutionized molecular pharmacology and biochemistry, allowing measurement of protein-protein interaction and protein conformational changes in real-time in live cells (Miyawaki and Niino, 2015). These techniques are based on the nonradiative intra- or intermolecular transfer of energy between an energy donor and a compatible fluorescent energy acceptor. Such quantum mechanism strictly relies on molecular proximity (around 100 Å) and orientation between donor and acceptor molecules for energy transfer, making it ideal for probing either protein conformational changes or the dynamic of protein-protein interactions. Independence from an external energy source for donor excitation gives bioluminescence resonance energy transfer (BRET) some advantages over related methods, such as fluorescence resonance energy transfer, by avoiding cells photodamage, fluorophore photobleaching, background autofluorescence, or direct acceptor excitation (Pfeffer et al., 2006). Thanks to these advantages, BRET assays have been widely implemented for GPCR and kinases drug screening (Bacart et al., 2008; Kocan and Pfeffer, 2011; Schann et al., 2013; Ayoub, 2016).

Ironically, although ion channels have been perceived as the next GPCR for the last 15 years, according to their importance as a drug target (Kaczorowski et al., 2008), they only recently benefited from BRET technology (Robertson et al., 2016; Ruigrok et al., 2017). Such BRET probes monitor molecular events related to ion-channel activation (conformational changes during gating and protein-protein interactions dynamics) that are of utmost importance for ion channel pharmacology while being intractable using either one of the aforementioned reference techniques for ion-channel HTS. They, therefore, opened up new prospects for improving the effectiveness of ion-channel drug screening. Nonetheless, acceptance of intra- and intermolecular BRET assays as novel tools for ion-channel drug screening relies on their efficiency with regards to conventional methods and need therefore a solid proof-of-concept of their operability and effectiveness under real drug screening conditions.

Here, we assessed the suitability of the BRET technique as a new HTS method for ion channels by taking advantage of our recently characterized intra- and intermolecular BRET probes targeting TRPV1 conformational changes during

gating and subsequent coupling with calmodulin (CaM), two events leading to TRPV1 activation and regulation (Ruigrok et al., 2017). We then screened the small-sized Prestwick chemical library, encompassing 1200 FDA- and EMA-approved compounds with high structural diversity using either automated calcium assays (ACAs) or our intra- and intermolecular BRET probes. We next performed a secondary screen of the detected hits with an APC. Multiparametric analysis of our results put into light the power of the BRET technique to unravel hits compounds that would not have been detected with conventional methods such as ACA and APC. Finally, we present data exemplifying the use of intramolecular BRET probes for the study of other TRPs and non-TRPs ion channels.

## Materials and Methods

**Plasmids.** The mammalian expression vector encoding sYFP2-TRPV1-rLuc2, TRPV1-rLuc2, and sYFP2-CaM were described in (Ruigrok et al., 2017). To generate the other BRET constructs, mNeonGreen and nanoluciferase were used to improve the brightness of the assay in some experiments, and are referred as mNeonG and nLuc for short in the rest of this paper. Mammalian expression vectors for the expression of the nLuc-ion channel-mNeonG or mNeonG-ion channel-nLuc fusion proteins were constructed using cDNA bricks obtained by gene synthesis (Genescript, Leiden, Netherlands) that encode, respectively, nLuc or mNeonGreen (brick 1), any ion channel described in the text (brick 2), and mNeonGreen or nLuc (brick 3). Using the BsmBI type IIS enzyme and T4 DNA ligase, the cDNA Bricks were assembled in frame and in the right order into pcDNA 3.1(+)-Luc Z vector, which allowed direct visualization of the assembly efficiency using a colorimetric test based on alpha complementation (Supplemental Table 1). Briefly, a ligation mix containing 2 µl of T4 DNA ligase buffer 10X, 1 U of BsmBI enzyme, 1 U of T4 DNA ligase, 0.4 mM ATP, 4 mM dithiothreitol, 100 ng of pcDNA3.1(+)-Luc Z vector, and 100 ng of bricks 1–3 was subjected to 35 cycles alternating two steps (step 1: 37°C for 1 minute, step 2: 25°C for 1 minute) before the enzymes were inactivated for 5 minutes at 55°C. The ligation mix was then used to transform *Escherichia coli* DH5α by thermal shock. The mammalian expression vector for Sulfonilurea receptor 1 (SUR1) subunit is a kind gift from Jean Révilloud (Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) and was cotransfected with the intramolecular BRET probe targeting the inwardly-rectifying potassium (Kir) channels Kir6.1 at a 1:1 ratio. Mammalian expression vector coding for human calmodulin (clone ID: OHu22088) is from Genescript and was cotransfected with the intramolecular BRET probe targeting the calcium-activated potassium channel KCa2.3 at a 4:1 ratio.

**Reagents.** Olvanil, OLDA, resiniferatoxin (RTX), AMG517, AMG9810, BCTC, JNJ-17203212, and AMG21629 were all from Tocris (Bristol, UK). Capsaicin (CAPS) and capsazepine (CPZ) were from Sigma (Lyon, France). Coelenterazine H (Nanolight Technology, Pinetop, AZ) was added to a final concentration of 5 µM. The Prestwick chemical library, a collection of off-patent drugs with high chemical and pharmacological diversity, has been obtained from Prestwick Chemical Inc (Illkirch-Graffenstaden, France; <https://www.prestwickchemical.com/screening-libraries/prestwick-chemical-library/>). Of note, we used the previous version of that library with 1200 compounds. Indeed, this library is regularly updated by adding new compounds of interest and removing others.

**Cell Culture and Transfections for BRET Assays.** HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (catalog number D6429; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units.mL<sup>-1</sup> penicillin, and streptomycin. HuH7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (catalog number 31885023; Thermo



Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 1% glutamax (catalog number 35050-038; Thermo Fisher Scientific), 10% fetal bovine serum, 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin, and streptomycin.

For BRET assays performed in 96-well plates, cells were seeded at a density of 500,000 cells in 6-well dishes, 24 hours before transfection. Transient transfections were performed using polyethylenimine (PEI, linear, Mr 25,000; catalog number 23966 Polysciences, Warrington, PA) with a PEI/DNA ratio of 4:1, as explained in (Percherancier et al., 2009). For intramolecular BRET assays, HEK293T cells were transfected with 0.1 µg of sYFP2-TRPV1-rLuc2 and 1.9 µg of empty pcDNA3.1(+) vector, whereas HEK293T cells were transfected with 0.1 µg of TRPV1-rLuc2 expression vector and 1.9 µg of sYFP2-CaM expression vectors for intermolecular BRET assays. After overnight incubation, transfected cells were detached and resuspended in DMEM without red phenol (catalog number 21063-029; ThermoFisher Scientific) containing 10% fetal bovine serum and 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin and streptomycin before being seeded at 10<sup>5</sup> cells per well in 96-well white plates (ref 655083, Greiner Bio One, Courtaboeuf, France). Cells were left in culture for an additional 24 hours before being processed for BRET assay.

BRET assays in high-throughput conditions were performed in 384-well plates using either HEK293T cells transfected with TRPV1-rLuc2 and sYFP2-CaM or HuH7 cells transfected with sYFP2-TRPV1-rLuc2. Briefly, on the day of the transfection, HEK293T and HuH7 cells were rinsed, detached, and resuspended at a density of 350,000–375,000 cells/mL in DMEM without phenol red (catalog number 11880028; ThermoFisher Scientific) supplemented with 1% glutamax, 5% fetal bovine serum, 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin, and streptomycin. Two DNA mix containing either 50 ng/mL of the hTRPV1-rLuc2 expression vector, 200 ng/mL of the sYFP2-Calmodulin expression vector, and 750 ng/mL of noncoding salmon sperm DNA for the intermolecular BRET assay, or 800 ng/mL of YFP-hTRPV1-Luc expression vector and 200 ng/mL of salmon sperm DNA for the intramolecular BRET assay, were prepared in 150 mM NaCl and mixed with an equal volume of PEI, 3 times more concentrated than total DNA [i.e., 3:1 (w/w) PEI/DNA ratio]. The DNA/PEI mix was then incubated for 15 minutes at room temperature before being added to the corresponding cell suspension at a ratio of 1:10 (v/v). HuH7 cells were then seeded directly into white opaque 384-well microplates (catalog number 781080; Greiner Bio One SAS, Les Ulis, France) at a rate of 20 µL per well, i.e., 7,500 cells per well, and were left in culture for an additional 24 hours before being processed for BRET assay. HEK293T cells were seeded into a 75-cm<sup>2</sup> flask (catalog number 15632011; Invitrogen) and were left in culture for an additional 24 hours before being detached and resuspended in equilibration buffer (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, glucose 10 mM, pH 7.5) at a density of 750,000 cells mL<sup>-1</sup>. A 384-well plate was then filled with 20 µL (15,000 cells) of the cell suspension per well and left for equilibration for 1 hour at 22°C in the dark before being processed for BRET assay.

**BRET Measurement in 96-Well Plates.** After the addition of Coelenterazine H into the red-phenol-free cell culture medium at a final concentration of 5 µM, BRET signals were measured using a multidetector TriStar2 LB942 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) and emission filters centered at 540 ± 40 nm for YFP and 480 ± 20 nm for Luc, or 515 ± 40 nm for mNeonGreen and 460 ± 20 nm for nLuc.

The BRET signal was determined by calculating the ratio of the emission intensity measured in the acceptor window ( $I_{acceptor}$ ) over the emission intensity measured in the donor window ( $I_{donor}$ ), according to eq. 1:

$$BRET = \frac{I_{acceptor}}{I_{donor}} \quad (1)$$

Because of the overlapping emission spectra of Luc and YFP, a fraction of the light detected in the YFP filter originates from the Luc emission, resulting in a contaminating signal (Hamdan et al., 2006). In that

configuration, the net BRET was therefore defined as the BRET ratio of cells coexpressing Luc and YFP constructs minus the BRET ratio of cells expressing only the Luc construct in the same experiment.

To assess the functionality of the ion channel BRET-based probes, Coelenterazine H was added to the cell culture medium 5 minutes before the injection of agonists and antagonists and subsequent BRET readings. In these experiments, the maximal quantity of DMSO was 0.3%. All experiments were performed at 37°C and pH 7.4 unless otherwise indicated.

**Concentration-Response and Drug Screening Using Intramolecular and Intermolecular BRET Assays in 384-Well Plates.** Screening of the Prestwick chemical library was performed at 22°C (intermolecular test) or 37°C (intramolecular test) using a 2-step injection protocol. One minute after the injection of Coelenterazine H in each well (10 µL, 5 µM final) to initiate the bioluminescent reaction catalyzed by the luciferase enzyme, 10 µL of the tested compounds (15 µM final) or vehicle alone was injected to assess each compound ability to activate TRPV1 (hereafter designated as activation mode). BRET measurements were performed 5 minutes (intermolecular BRET assay) or 15 minutes (intramolecular BRET assay) after compound injection using an EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) with emission filters centered at 535 ± 15 nm for YFP ( $I_{acceptor}$ ) and 480 ± 15 nm for Luc ( $I_{donor}$ ). Immediately after this first BRET measurement, 20 µL of the prototypic agonist CAPS (final concentration: 500 nM) was injected in each well to assess the ability of each compound to inhibit chemical activation of TRPV1 (hereafter designed as “inhibition mode”). A second BRET measurement was then performed after CAPS injection. In the inhibition mode, the final concentration of the tested compound was 10 µM.

The data in the activation mode are expressed according to eq. 2, and data in the inhibition mode are expressed according to eq. 3.

$$\% \text{ of CAPS effect} = 100 \times \left( \frac{BRET_{comp} - BRET_{base}}{BRET_{CAPS_{max}} - BRET_{base}} \right) \quad (2)$$

$$\% \text{ of inhibition} = \left( \frac{BRET_{comp} - BRET_{CAPSEC80}}{BRET_{base} - BRET_{CAPSEC80}} \times 100 \right) \quad (3)$$

where  $BRET_{comp}$  is the net BRET in the presence of the compound,  $BRET_{base}$  is the basal BRET before injection of the compounds,  $BRET_{CAPS_{EC80}}$  and  $BRET_{CAPS_{max}}$  are the net BRET measured in presence of 500 nM and 15 µM capsaicin, respectively. Two independent runs (n1 and n2) were performed, and an arbitrary percent activation or inhibition cut-off of 30% was chosen to select hit compounds. A counter screen was performed using HEK293T cells transfected with TRPV1-rLuc2 alone. The compound effects on TRPV1 intra- and intermolecular BRET probes were validated only if the basal BRET of TRPV1-rLuc2 remained unaffected during the counter screen step.

In all experiments performed in 384-well plates, the final quantity of DMSO was 1% in the activation mode and 0.87% in the inhibition mode. Reference compounds effects were assessed both in the activation and inhibition modes using identical protocols, except that concentration-response curves were performed instead of a single concentration measurement. All injection steps were done using a TECAN EVO Freedom 150 Platform (TECAN, Männedorf, Switzerland).

**Automated Calcium Assay.** Automated calcium assays were outsourced to Eurofins Pharma Discovery Services (St. Charles, MO). Briefly, HEK293 cell line stably expressing human TRPV1 (Eurofins catalog number CYL3063) were plated in 384-well plates in maintaining medium and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 24 hours, the medium was aspirated from the 384 wells and 40 µL of



dye loading buffer (Hanks' balanced salt solution supplemented with 20 mM HEPES pH 7.4, 2.5 mM probenecid, and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fluo-8  $\text{Ca}^{2+}$  dye) was added to the cells in each well. The assay plate was incubated at 30°C and 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified chamber for at least 80 minutes prior to washing and addition of the Assay buffer (Hanks' balanced salt solution supplemented with 20 mM HEPES, pH 7.4). The calcium-flux assays were performed on a Molecular Devices' FLIPR<sup>Tetra</sup> plate reader (San Jose, CA) using an excitation filter centered at  $482.5 \pm 12.5$  nm and an emission filter centered at  $545 \pm 30$  nm. Concentration-response curves were obtained in duplicate by either injecting increasing concentrations of the indicated reference agonist compounds or by injecting increasing concentration of the indicated reference antagonist compound followed, 3 minutes later, by an injection of 0.1  $\mu\text{M}$  CAPS. Single-point screening of the Prestwick chemical library was performed using an initial injection of the tested compounds at a final concentration of 15  $\mu\text{M}$  to assess each compound's ability to activate TRPV1 for 180 seconds, followed by a second injection of 0.1  $\mu\text{M}$  CAPS to assess each compound's ability to inhibit CAPS-activated TRPV1 for another 180 seconds. In the inhibition mode, the final concentration of the tested compound was 10  $\mu\text{M}$ . The compound wells, reference agonist, reference antagonist, and background vehicle controls were prepared in DMSO at 0.44% final in the activation assay and 0.33% final in the inhibition assay. Two independent experiments were performed on all duplicate tests. All plates were subjected to appropriate baseline corrections. Once baseline corrections were processed, maximum fluorescence values were exported to calculate the normalized  $\text{Ca}^{2+}$  flux relatively to CAPS activation according to eq. 4:

$$\text{normalized } \text{Ca}^{2+} \text{ flux} = \frac{\text{RFU}_{\text{max}} - \text{Baseline}_{\text{avg}}}{\text{RFU}_{\text{CAPS}} - \text{Baseline}_{\text{avg}}} \quad (4)$$

where  $\text{RFU}_{\text{max}}$  and  $\text{Baseline}_{\text{avg}}$  are the maximal fluorescence signal and the baseline signal measured during the recording session of the tested compound respectively, and  $\text{RFU}_{\text{CAPS}}$  is the maximal fluorescence signal measured with either 4  $\mu\text{M}$  CAPS (activation mode) or 0.1  $\mu\text{M}$  CAPS (inhibition mode). In the activation mode, the results are expressed as % of CAPS effect according to eq. 5:

$$\% \text{ of CAPS effect} = \text{normalized } \text{Ca}^{2+} \text{ flux} \times 100 \quad (5)$$

In the inhibition mode, the % of inhibition induced by a compound is given by eq. 6:

$$\% \text{ of inhibition} = 100 - (\text{normalized } \text{Ca}^{2+} \text{ flux} \times 100) \quad (6)$$

**Manual Patch-Clamp.** For whole-cell electrophysiological study, transiently transfected HEK293T cells were bathed in an extracellular medium containing 135 mM NaCl, 5 mM CsCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM glucose, and 10 mM HEPES. The osmolarity (measured with a cryosmometer type 15 Löser) of the external salt solution was adjusted to 300 mOsm with Mannitol and pH adjusted to 7.4 with NaOH. The recording patch-clamp pipette was filled with artificial intracellular saline containing 130 mM CsCl, 5 mM EGTA, 5.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , and 5 mM HEPES (290 mOsm adjusted with Mannitol and pH 7.2 adjusted with NaOH).

Cells were viewed under phase contrast using a Nikon Diaphot inverted microscope. Borosilicate glass micropipettes (GC150F-10, Harvard Apparatus, Phymep, Paris, France) were pulled with a DMZ-Universal puller. The pipettes had a mean resistance of 4 M $\Omega$  when measured under standard recording conditions. An RK-400 patch-clamp amplifier (Biologic, Claix, France) was used for whole-cell recordings. Stimulus control, data acquisition, and processing were carried out on a PC fitted with a Digidata 1200 interface, using the pCLAMP 10.7 software (Molecular Devices, Foster City, CA). Current records were filtered using a Bessel filter at 1 kHz and digitized for storage and analysis. Recordings were performed in voltage-

clamp and whole-cell configurations to measure global currents. After the seal, a resting potential of  $-60$  mV was imposed, and 650 millisecond voltage ramps from  $-60$  to  $+60$  mV were applied every 10 seconds for 3 minutes. After 4 ramps, capsaicin (10  $\mu\text{M}$ ) was applied to the recorded cell by pressure ejection from a glass pipette located close to the cell. Capsaicin-activated currents were determined by the difference between maximal capsaicin-induced and average current before ejection. Currents were then normalized to cell capacitance and expressed as pA/pF.

**Automated Patch-Clamp Assay.** Automated patch-clamp assays were outsourced to SB Drug Discovery (Glasgow, UK). Briefly, automated patch-clamp recordings were performed using the SyncroPatch 384PE (Nanion, Munich, Germany) and HEK293 cell line stably expressing human TRPV1 (SB Drug Discovery) that were plated 24 hours before the experiment and incubated at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ . The voltage protocol generation and data collection were performed with the PatchController384 V1.6.6 and Data Controller V1.6.0. Concentration-response curves were obtained by injecting either increasing concentrations of the indicated reference agonist compounds or by injecting increasing concentration of the indicated reference antagonist compound followed 3 minutes later by an injection of 0.1  $\mu\text{M}$  CAPS. Screening of the Prestwick chemical library was performed with two different protocols to assess the ability of 10  $\mu\text{M}$  concentration of a test compound to either activates TRPV1 (activation mode) or to inhibits CAPS-activated TRPV1 (inhibition mode).

**Activation Mode:** The protocol consisted of two applications (control period) of an external solution containing 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, and 5 mM glucose, at pH 7.4, followed by the addition of 10  $\mu\text{M}$  of the test compound (1 to 2 minutes). Then, a maximum concentration of agonist (3–10  $\mu\text{M}$  capsaicin) was added to confirm the presence of the TRPV1 channel, and lastly, addition of the full block with 10  $\mu\text{M}$  capsazepine (1 minute) was done. Data points that did not fulfill these controls were discarded. Data were normalized according to eq. 7:

$$\% \text{ of CAPS effect} = 100 \times \left( \frac{I_{\text{comp}} - I_{\text{base}}}{I_{\text{max}} - I_{\text{base}}} \right) \quad (7)$$

where  $I_{\text{comp}}$  is the current in the presence of the compound,  $I_{\text{base}}$  is the baseline current, and  $I_{\text{max}}$  is the max current in the presence of the maximum concentration of compound or capsaicin. The concentration-response curves are constrained between 0 (no activation) and 100 (maximum activation).

**Inhibition Mode:** The protocol consisted of two applications of external solution (control period), one application of the agonist capsaicin  $\text{EC}_{50}$  (50 nM) for 1 to 2 minutes, followed by addition of 10  $\mu\text{M}$  of the test compound (1 to 2 minutes) in the presence of capsaicin  $\text{EC}_{50}$ , and lastly, addition of 10  $\mu\text{M}$  capsazepine (1 minute) to control for full inhibition. Data were expressed as % of inhibition according to eq. 8:

$$\text{normalized Current} = 100 - \left( \frac{I_{\text{comp}} - I_{\text{base}}}{I_{\text{ref}} - I_{\text{base}}} \times 100 \right) \quad (8)$$

where  $I_{\text{comp}}$  is the current in the presence of the compound,  $I_{\text{base}}$  is the baseline current, and  $I_{\text{ref}}$  is the current in the presence of the capsaicin  $\text{EC}_{50}$ . The concentration-response curves are constrained between 0 (no inhibition) and 100 (maximum inhibition).

In both activation and inhibition mode, the current was monitored using a ramp protocol from  $-100$  mV to  $+100$  mV over 300 milliseconds, from a holding potential of  $-60$  mV, which was repeated every 20 seconds. The maximum outward current at  $+100$  mV was used for analysis. In each condition, the maximum DMSO concentration at the end of the run was 0.3%.

**Data Preparation, Normalization, Analysis, and Statistics.** GraphPad Prism v6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for plotting concentration-response curves. The size of the error bars indicates the S.D. within the data set.

Potencies of chemicals to activate or inhibit TRPV1 are expressed as  $pEC_{50} \pm S.E.$

Scatter plots, histograms, radar charts, and whisker boxes were plotted using the ggplot2 R package. Statistical analyses were performed using Anatsats (Rilly sur Vienne, France), R, and the PMCMRplus R package. Multiple comparisons were performed using Kruskal-Wallis and Conover post hoc tests.

Hierarchical cluster analysis was performed using R and the dplyr, ggplot2, factorextra, and NbClust libraries (Charrad et al., 2014; Wickham, 2016; Kassambara and Mundt, 2020; R Core Team, 2020; Wickham et al., 2020).

Hierarchical agglomerative clustering is a multivariate statistical classification method of cluster analysis with the aim to build a hierarchy of clusters according to the similarity or the dissimilarity of their characteristics. It is an exploratory approach, and its interpretation depends on the experimental context. Here, the clustering was performed on 54 of the 59 identified hits compounds (see results) and applied to the characteristics listed in Table 1.

The values were first normalized (mean-centered and scaled), and an optimal number of clusters was automatically assessed using the NbClust package, giving an optimal number of 7 clusters. To compute the NbClust algorithm, we used maximum distance and complete-linkage method which are often preferred and tend to produce more compact clusters.

Hierarchical cluster analysis was applied using the complete-linkage method. Three analyses were performed: one relying on the 12 parameters (Table 1), one without the intra- and intermolecular BRET measures, and one without the fluorescent probe-based calcium measurements. The clustering results were then visualized with dendrograms.

## Results

**Comparison of the capability of both intra- and intermolecular BRET probes, automated calcium assay, and automated patch-clamp to measure the potency and efficacy of reference compounds.** We first addressed whether both intra- and intermolecular BRET biosensors discriminate between known TRPV1 agonists and antagonists that are expected to display different potencies. In these experiments, HEK293T cells transiently expressing either the intramolecular BRET probe sYFP2-TRPV1-rLuc2 (Fig. 1A) or the BRET pair TRPV1-rLuc2/sYFP2-CaM (Fig. 1B, intermolecular BRET assay), and plated in 96-well plate, were first challenged with increasing quantities of four known TRPV1 agonists. As expected, both CAPS, RTX, OLDA, and Olvanil induced a concentration-dependent increase of intra- (Fig. 1C) and intermolecular (Fig. 1D) basal BRET. CAPS, Olvanil, and RTX maximally increased the TRPV1 intramolecular BRET ratio by 50% from 0.5 to 0.75 (Fig. 1C), and the TRPV1 intermolecular BRET ratio by 700% from 0.05 to 0.35 (Fig. 1D). Although the absolute variation of the BRET ratio was similar and highly significant for both assays (0.25 for the intramolecular BRET assay and 0.3 for the intermolecular assay), the relative increase was lower when considering the TRPV1 intramolecular BRET probe. This is easily explained by a higher basal BRET ratio for the

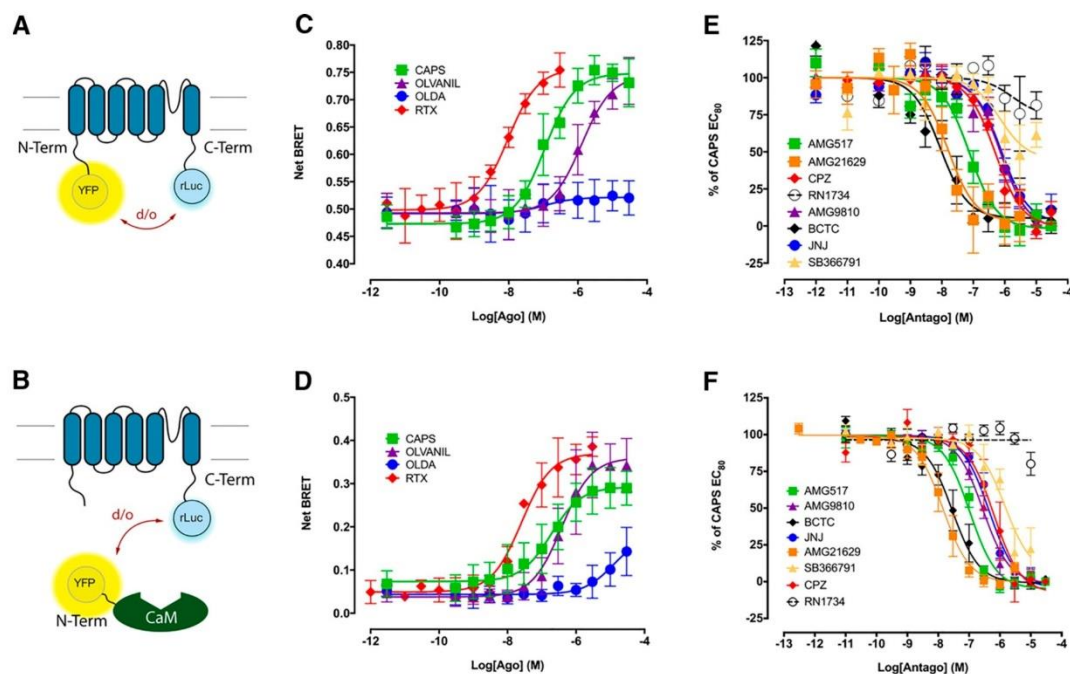
intramolecular BRET probe, which is expected given the proximity of N- and C-terminal extremities in the tetrameric quaternary structure of TRPV1 ion channels (De-la-Rosa et al., 2013). In sharp contrast, since CaM is only weakly coupled to TRPV1 in the resting state (Hasan et al., 2017; Ruigrok et al., 2017), the intermolecular basal BRET ratio is very low, leading to bigger relative changes after activation. In agreement with others, we found that OLDA maximal efficacy was lower than CAPS to activate human TRPV1 in transfected HEK293 cells (Bianchi et al., 2006). The rank order of  $EC_{50}$  values for each agonist was conserved for both BRET biosensors and is in full agreement with the literature (Winter et al., 1990; Ralevic et al., 2001; Bianchi et al., 2006) with  $RTX > CAPS \sim Olvanil > OLDA$  (Fig. 1 and Table 2).

We, therefore, assessed the efficacy and potency of various TRPV1 antagonists using our intra- and intermolecular BRET probes. As shown in Fig. 1E and Fig. 1F, using both intra- and intermolecular TRPV1 BRET probes, we confirmed that CPZ, AMG519, AMG9810, BCTC, JNJ-17203212, and AMG21629 fully antagonized TRPV1 activation by CAPS [hereafter noted as TRPV1(CAPS)] in agreement with the literature (Gavva et al., 2005; Swanson et al., 2005; Bianchi et al., 2006; Gavva et al., 2007a; Gavva et al., 2007b; Papakosta et al., 2011). However, using both BRET assays, the antagonist SB366791 was found to only partially antagonize TRPV1(CAPS), which is in contradiction with the initial characterization of this compound as a full antagonist (Gunthorpe et al., 2004). We, however, confirmed that SB366791 is a weak antagonist (Table 2). As expected, RN1734, which is known to be a TRPV4-specific antagonist, failed to inhibit TRPV1(CAPS). These results indicate that both TRPV1 intra- and intermolecular BRET assays are fully functional to assess the agonist and antagonist behavior of chemical compounds. This statement is reinforced by the fact that both the shape of the current-voltage ( $I/V$ ) curve and the magnitude of the outward current flowing through both untagged TRPV1 and TRPV1 intramolecular BRET probe are similar in transiently transfected HEK293T cells challenged with CAPS (Supplemental Fig. 1). This further supports our previous observations that N- and C-terminal addition of either the YFP and/or Luc groups does not hinder TRPV1 activity (Ruigrok et al., 2017).

The acceptance of BRET probes as a novel tool for ion-channel drug screening relies on their operability and effectiveness with regards to conventional methods. We, therefore, performed concentration-response curves of the aforementioned TRPV1 agonists and antagonists using HTS platforms for both APC and fluorescent probe-based calcium measurement. The resulting potency of these chemicals to modulate TRPV1 activity were compared with the ones measured using our intra- and intermolecular BRET assays in the 384 well plate format. As shown in Fig. 2 and Table 2, the potency measured using each technique was in a similar range for the four agonists tested. Considering the data

TABLE 1  
List of characteristics used for data-driven hierarchical clustering

Activation Mode (% of CAPS Effect)						Inhibition Mode (% of Inhibition)					
BRET intra	BRET inter	Calcium	APC 100 mV	APC 25 mV	APC -100 mV	BRET intra	BRET inter	Calcium	APC 100 mV	APC -25 mV	APC -100 mV



**Fig. 1.** Measuring TRPV1 activity using an intramolecular or an intermolecular BRET. (A) Schematic representation of the sYFP2-TRPV1-rLuc2 intramolecular BRET probe, where sYFP2 was fused to the N-terminal extremity of TRPV1, whereas rLuc2 was fused to the C-terminal extremity of TRPV1. After activation of TRPV1, the distance (d) and/or the orientation (o) between rLuc2 and sYFP2 are expected to be modified during TRPV1 gating and subsequent conformational changes of TRPV1 subunits (Ruigrok et al., 2017). (B) Schematic representation of the intermolecular BRET assay assessing the coupling of TRPV1 to calmodulin. The sYFP2 fluorescent protein was fused to the N-terminal extremity of Calmodulin and rLuc2 to the C-terminal extremity of TRPV1. After activation of TRPV1, TRPV1 coupling to CaM is expected to be increased, thereby affecting the distance d between rLuc2 and sYFP2. (C and D) Concentration-response curves of various agonists-induced BRET changes measured in HEK293T cells expressing the sYFP2-TRPV1-rLuc2 BRET probe (C,  $n = 5$  for all compounds) or the TRPV1-rLuc2/sYFP2-CaM constructs (D,  $n = 9$  for CAPS,  $n = 5$  for RTX,  $n = 4$  for Olvanil and OLDA). (E and F) Concentration-response curves of the ability of various antagonists to inhibit CAPS (500 nM) induced BRET changes in HEK293T cells expressing the sYFP2-TRPV1-rLuc2 BRET probe (E,  $n = 4$  for all compounds) or the TRPV1-rLuc2/sYFP2-CaM constructs (F,  $n = 4$  for all compounds).

obtained with the antagonist compounds, we found that the  $pIC_{50}$  measured with both intramolecular and intermolecular BRET probes were again close to the ones measured with the ACA. APC yielded, however, significantly better  $pIC_{50}$  than the ones measured with either BRET probes or ACA for five antagonists out of the seven tested. Knowing that the concentration of compounds tested in a primary high-throughput screening usually lies between 1 and 10  $\mu$ M, our results nonetheless indicate that both TRPV1-based BRET assays are as fit to perform high-throughput screening as the conventional APC and automated  $Ca^{2+}$ -flux methods.

**Assessment of Technical and Biological Reproducibility for Both Intra- and Intermolecular BRET Assays.** We next assessed the suitability of our BRET assays for HTS purposes using transfected cells seeded in 384-well plates. We first assessed the technical and biological reproducibility of both intra- and intermolecular BRET assays by comparing the results of two independent experiments (done on two different days) where CAPS concentration-response curves were obtained on four consecutive 384-well plate assays (Fig. 3). All concentration-response curves fitting into the range of three S.D.s, our results indicated that both TRPV1 intra- and intermolecular assays offered good biologic

and technical reproducibility (Fig. 3, A and B). To determine the Z'-factor of the assay (Zhang et al., 1999), we measured the efficacy of 500 nM CAPS to trigger TRPV1 conformational change and calmodulin coupling over five independent experiments performed over three different days with 16–24 wells measured per plate (Fig. 3, C and D). All calculated Z'-factor were above or close to 0.5, indicating that both intra- and intermolecular assays for TRPV1 were of high quality and suitable for HTS [average Z'-factor were  $0.58 \pm 0.04$  (average  $\pm$  S.E.) and  $0.54 \pm 0.04$  for intra- and intermolecular BRET assays, respectively].

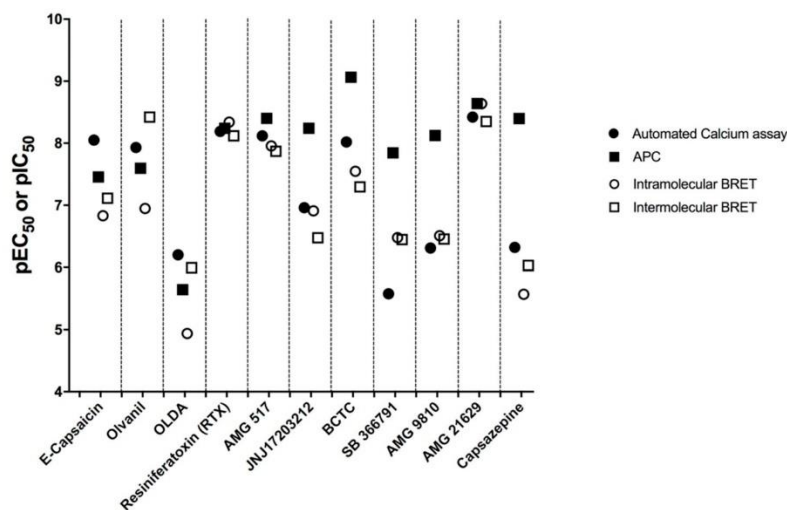
**The Primary Screen of the Prestwick Chemical Library for TRPV1 Activation and Inhibition.** Based on this conclusion, we used HTS experimental conditions with ACA and both intra- and intermolecular BRET probes to screen the Prestwick chemical library for both activation (Fig. 4) and inhibition (Fig. 5) of TRPV1. The final drug concentration was 15  $\mu$ M during the measurement of the compound efficacy to activate TRPV1 and was 10  $\mu$ M during the measurement of the compound efficacy to inhibit TRPV1 activation after the injection of 500 nM CAPS (which is close to CAPS  $EC_{80}$  in our experimental condition, e.g., the concentration of CAPS inducing 80% of TRPV1 maximal activation).

TABLE 2  
 pEC<sub>50</sub>/pIC<sub>50</sub> values derived from curve fitting of TRPV1 agonists/antagonists dose-responses measured using YFP-TRPV1-Luc intramolecular BRET probe, TRPV1-Luc/YFP-CaM intermolecular BRET probe, ACA, and APCBRET assays were measured both in 96-well plate and 384 well plate's formats. Values represent the mean ± S.E. of 3-9 independent experiments performed in duplicate. Values found in the literature are also indicated along with the method used, cellular model, and reference.

Compound	Intramolecular BRET Probe		Intermolecular BRET Probe		ACA	APC	Potency Found in the Literature	Method	Cellular Model	Reference
	96 wells	384 wells	96 wells	384 wells						
<b>Agonists</b>										
<b>Capsaicin</b>	6.96 ± 0.07	6.83 ± 0.05	6.73 ± 0.10	7.11 ± 0.21	8.05 ± 0.08	7.45 ± 0.03	7.1 - 7.3	Ca <sup>2+</sup> (Fluo3/4)	HEK293	(Ralevic et al., 2001; Bianchi et al., 2006)
<b>Oltamil</b>	5.89 ± 0.10	6.95 ± 0.05	6.42 ± 0.11	8.42 ± 0.16	7.93 ± 0.13	7.59 ± 0.04	6.36 - 7.73	Ca <sup>2+</sup> (Fluo3/4)	HEK293	(Ralevic et al., 2001; Bianchi et al., 2006)
<b>OLDA</b>	6.96 ± 0.74	4.84 ± 0.11	4.90 ± 0.31	5.99 ± 0.30	6.20 ± 0.10	5.64 ± 0.05	5.49 ± 0.06	Ca <sup>2+</sup> (Fluo4)	HEK293	(Bianchi et al., 2006)
<b>RTX</b>	8.02 ± 0.08	8.34 ± 0.06	7.59 ± 0.08	8.12 ± 0.18	8.19 ± 0.08	8.24 ± 0.04	7.92 - 8.69	<sup>45</sup> Ca uptake Ca <sup>2+</sup> (Fluo4)	HEK293 neurons	(Winter et al., 1990; Bianchi et al., 2006)
<b>Antagonists</b>										
<b>AMG 517</b>	7.12 ± 0.10	7.85 ± 0.14	6.97 ± 0.07	7.87 ± 0.05	8.12 ± 0.09	8.40 ± 0.05	9.19 ± 0.25	<sup>46</sup> Ca uptake	CHO	(Gavva et al., 2007b)
<b>JNJ17203212</b>	6.12 ± 0.11	6.91 ± 0.07	6.34 ± 0.06	6.47 ± 0.09	6.96 ± 0.02	8.24 ± 0.06	7.20 ± 0.11	Ca <sup>2+</sup> (Fluo3)	HEK293	(Swanson et al., 2005)
<b>BCTC</b>	8.05 ± 0.14	7.55 ± 0.05	7.54 ± 0.10	7.30 ± 0.02	8.02 ± 0.01	9.06 ± 0.02	8.77 ± 0.01	Calcium4	CHO-Trex	(Papalosta et al., 2011)
<b>SB 366791</b>	6.15 ± 0.35	6.47 ± 0.14	5.83 ± 0.21	6.45 ± 0.20	5.58 ± 0.08	7.84 ± 0.06	6.89 ± 0.22	<sup>46</sup> Ca uptake	CHO	(Gunthorpe et al., 2004; Gavva et al., 2005)
<b>AMG 9810</b>	6.12 ± 0.10	6.51 ± 0.32	6.55 ± 0.06	6.45 ± 0.09	6.31 ± 0.05	8.12 ± 0.04	7.72 ± 0.33	<sup>46</sup> Ca uptake	CHO	(Gavva et al., 2005)
<b>AMG 21629</b>	7.8 ± 0.18	8.64 ± 0.06	7.84 ± 0.09	8.35 ± 0.06	8.42 ± 0.04	8.64 ± 0.08	9.28 ± 0.23	<sup>46</sup> Ca uptake	CHO	(Gavva et al., 2007a)
<b>Capsazepine</b>	6.31 ± 0.08	n.d.	6.19 ± 0.14	n.d.	6.32 ± 0.04	8.40 ± 0.06	7.90 - 8.27	<sup>46</sup> Ca uptake Ca <sup>2+</sup> (Fluo4)	CHO HEK	(Gavva et al., 2005; Bianchi et al., 2006)



**Fig. 2.** Comparison of the reference agonist and antagonist potencies when measured in HTS conditions using either the intramolecular BRET probe, the intermolecular BRET probe, APC, or ACA.



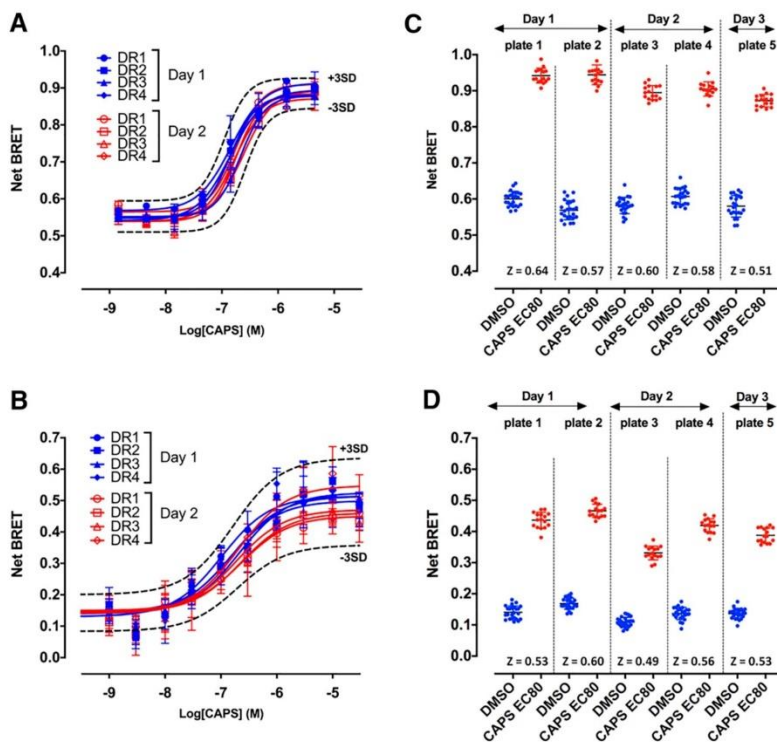
Two independent runs (n1 and n2) were performed, and an arbitrary percent activation or inhibition cut-off of 30% was chosen to select hit compounds. As expected, most compounds exhibited little to no effect whatever the assay considered, whereas a small percentage of compounds demonstrated positive or negative modulation of TRPV1 activity in either activation or inhibition modes (Fig. 4, A–C, Fig. 5, A–C, and Supplemental Table 2). Interestingly, when plotting the compounds' percent distribution histograms, data from BRET experiments exhibited distribution profiles different than data issued from the  $\text{Ca}^{2+}$  flux method. The latter displayed an asymmetric profile with a significantly broader basis, especially in the inhibition mode (Fig. 4, D–F and Fig. 5, D–F). Reproducibility between the results obtained during the two independent runs was derived from scatter plots analysis (Fig. 4, G–H and Fig. 5, G–H) using different statistical methods. Firstly, the median distance between each experimental dot and a theoretical perfect duplicate assay was computed and compared between the three methods used (intramolecular BRET probe, intermolecular BRET probe, and ACA) for both activation and inhibition modes (Supplemental Fig. 2). We found that data dispersion was significantly lower for the intermolecular BRET probe than for the two other techniques in the activation mode and significantly lower for both intra- and intermolecular BRET assays in comparison with the results obtained with ACA in the inhibition mode. Secondly, the global dispersion of the pooled data (n1 and n2) was estimated using 4 classic dispersion metrics: the median absolute deviation, the difference between the largest and smallest values (range), the quartile coefficient of dispersion, and the interquartile range. For all these four metrics, the radar chart area is proportional to the data dispersion. As shown in Supplemental Fig. 3, the calcium-activated method exhibited a much larger area compared with values obtained from the two BRET assays, pointing toward a higher overall signal values dispersion of ACA. The overall conclusion is that TRPV1 BRET probes provide a statistically better signal reproducibility than ACA in

high-throughput screening conditions. Accordingly, we found a significantly higher percentage of confirmed hits between both replicate assays in the activation mode when using intra- or intermolecular BRET probes (100% and 87.5% of confirmed hits, respectively) in comparison with the calcium assay, for which we found 18.1% of confirmed hits (Table 3). Although the percentage of confirmed hits was lower in the inhibition mode than in the activation mode for all three assays, the percentage of confirmed hits for both intra- and intermolecular BRET probes (42.6% and 58.8%, respectively) was still higher than the one found for the calcium assay (31.2%). This confirms that both BRET assays are sufficiently fit for reliable hit identification.

**Hit Confirmation with APC.** The Venn diagrams in Fig. 6 show the total number of unique hits detected by each assay in the activation mode (Fig. 6A) and the inhibition mode (Fig. 6B). A total of 22 compounds were shown to reproducibly trigger TRPV1 in both replicate screens, whereas 47 compounds were shown to reproducibly inhibit TRPV1(CAPS). Remarkably, only three hits were common to the three methods when regarding the inhibition mode (thioridazine hydrochloride, perphenazine, and benzethonium chloride), whereas no hits were common to the three methods when regarding the activation mode. Two hits were detected by both intermolecular and calcium assay to activate TRPV1. Considering the inhibition mode, one hit was common to both calcium assay and intermolecular BRET probe, two hits were common to both intramolecular BRET probe and calcium assay, and four hits were common to both intra- and intermolecular BRET probes. Since 10 compounds were identified in at least two different tests, all assays combined, this primary screen, therefore, identified a total of 59 hits (4.9% of the bank).

We then reassessed the efficacy of each of these 59 compounds to activate TRPV1 or inhibit TRPV1(CAPS) using APC. In a preliminary step, we first confirmed that TRPV1 behaved as an outwardly rectifying channel when stably



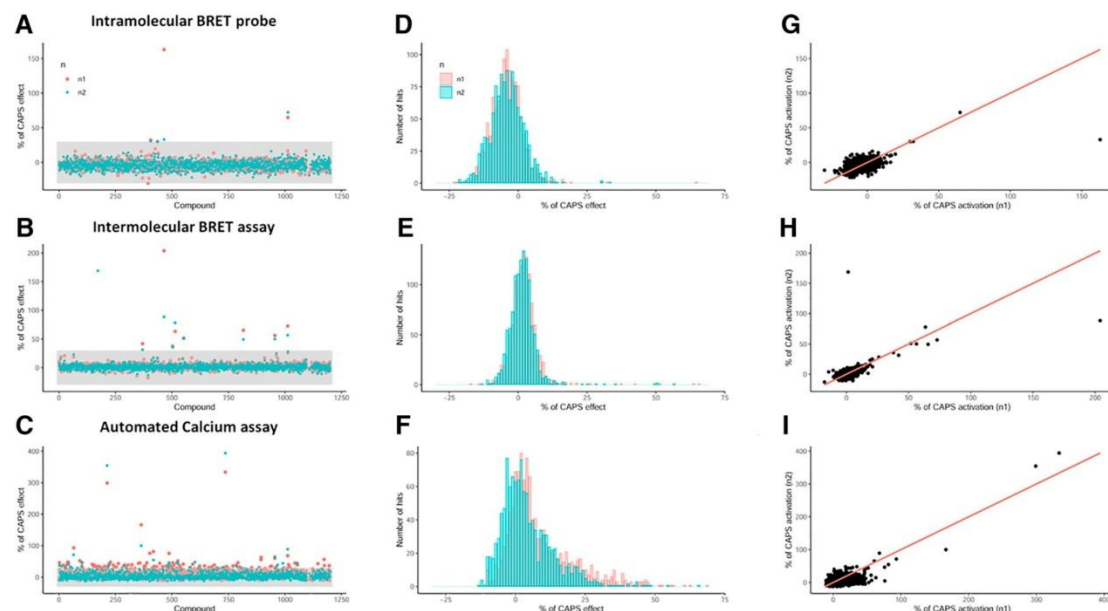


**Fig. 3.** Validation of the suitability of the intramolecular and intermolecular BRET assays targeting TRPV1 for HTS. (A and B) Assessment of the technical and biological reproducibility to measure CAPS-induced dose-dependent increase of the BRET signal measured with intramolecular (A) and intermolecular (B) BRET probes targeting TRPV1. Two sets of four independent dose responses were performed on two different days using each BRET sensor to verify that all concentration-response curves fall within three S.D.s of the mean. (C and D) Z'-factor: Cells transfected with the sYFP2-TRPV1-rLuc2 intramolecular BRET probe (C) or coexpressing TRPV1-rLuc2 and sYFP2-calmodulin (D) were seeded in white opaque tissue culture 384-well plates (see *Materials and Methods* for details). BRET measurements were performed in the presence or absence of CAPS at a concentration equivalent to the  $EC_{90}$  (500 nM). In total, 5 consecutive 384-well plates were processed over 3 consecutive days with 16–24 wells read per plate and per condition. Z'-factor were calculated using the following formula (Zhang et al., 1999):  $Z' = 1 - [3 \times \text{S.D.}(\text{BRET}_{\text{agonist}}) + 3 \times \text{S.D.}(\text{BRET}_{\text{basal}})] / [\text{Mean}(\text{BRET}_{\text{agonist}}) - \text{Mean}(\text{BRET}_{\text{basal}})]$ .

expressed in HEK293T cells, as already described by others in several primary cells and cell lines (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Premkumar et al., 2002) (Fig. 7A). Knowing the outward rectifying properties of TRPV1, it is important to emphasize that most electrophysiologists assess TRPV1 activity by measuring the outward potassium current flowing through the TRPV1 ion channel at high positive membrane potential (e.g., between +60 and +100 mV). The reason is that, although this outward current measured at high positive membrane potential is less physiologically relevant, it is of much greater amplitude than the inward current measured at the negative resting membrane potential of cells (Priest et al., 2007). During a drug screening, the implicit assumption for such practice is that any hit displays an equal ability to activate or inhibit TRPV1 gating irrespective of the membrane potential. We, therefore, compared CAPS and CPZ potency to activate or inhibit TRPV1 ion channel when cell membrane potential was clamped at +100 mV, –25 mV [which is the resting membrane potential of HEK293T cells (Kirkton and Bursac, 2011)] and –100 mV. As shown in Fig.

7B, CAPS potency was right-shifted when the membrane potential was shifted from +100 mV to –25 mV and remained identical between –25 mV and –100 mV. CPZ potency to antagonize TRPV1 gating by CAPS was similar between +100 mV and –25 mV but was right-shifted at –100 mV (Fig. 7B, right panel). These results indicated that the membrane potential impacts CAPS and CPZ potency to activate or inhibit TRPV1. By the way, they (i) provided a potential explanation for the difference in the apparent potency of some TRPV1 agonists and antagonists measured with either APC, BRET probes, or ACA (Figs. 1 and 2), and (ii) called for an in-depth analysis of the efficacy of the 59 identified compounds to activate or inhibit TRPV1 gating as a function of the applied membrane potential during APC experiments.

Among the 59 compounds tested, 5 compounds known to be detergent molecules induced a high nonspecific current in untransfected HEK293T cells [chlorhexidine (#10), methyl benzethonium chloride (#38), benzethonium chloride (#39; which one was initially identified by all methods), alexidine dihydrochloride (#42), thonzonium bromide (#49)] and were



**Fig. 4.** Screening of the Prestwick Chemical Library for identification of TRPV1 activators. “n1” and “n2” stand for the first and second screens. (A, B, C) Identification of candidate compounds activating TRPV1 in the primary screen of the Prestwick chemical library using the intramolecular BRET probe (A), the intermolecular BRET assay (B), and the automated calcium assay (C). The concentration of the compound tested was 15  $\mu$ M in each test. Values were normalized to the maximal efficacy measured in presence of 4  $\mu$ M CAPS (ACA) or 15  $\mu$ M CAPS (BRET assays). Positive candidate compounds were identified by a relative efficacy of at least 30% of maximal CAPS efficacy in the two independent technical replicates of the screen (area in gray). (D, E, F) Histogram of relative compounds efficacies to induce TRPV1 activation when assessed with the intramolecular BRET probe (D), the intermolecular BRET assay (E), and automated calcium assay (F). The x-axes were bounded in the [–30, 75] interval to align the histograms horizontally. The numbers of nondisplayed values are 7, 1, 7, and 110 for intramolecular BRET, intermolecular BRET, and calcium assays, respectively. (G, H, I) Scatter plot of the Prestwick chemical library screen performed in duplicate with the intramolecular BRET probe (G), the intermolecular BRET assay (H), and the automated calcium assay (I). The red line represents the  $y=x$  equation.

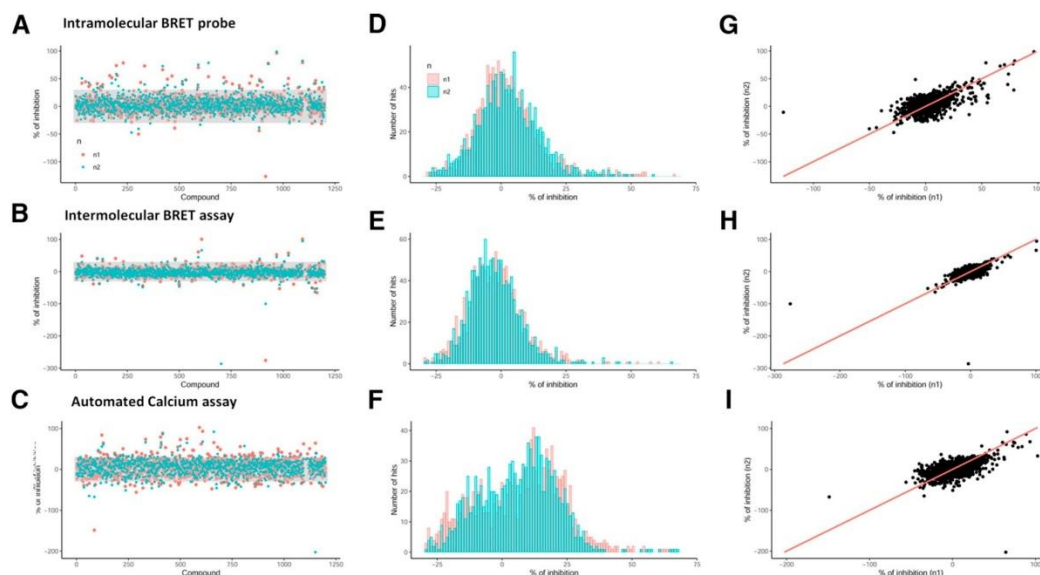
discarded from the rest of the study (Supplemental Table 3). Assessment of the ability of the 54 remaining drugs to either activate TRPV1 or inhibit TRPV1(CAPS) indicated a strong disparity between the results measured at –100 mV, –25 mV, and +100 mV (Fig. 7, C and D). Only six compounds were shown to be confirmed as TRPV1 activator by APC at +100 mV, with a cut-off of 30% of CAPS efficacy (Fig. 7C). Among these six compounds, only two (compounds 40 and 47) were detected whatever the voltage used. Interestingly, compound 27 was found to activate TRPV1 very efficiently at +100 and –100 mV but not at –25 mV. Also, compounds 29 and 58 did not activate TRPV1 at +100 and –25 mV, whereas they did it at –100 mV. Eleven compounds inhibited CAPS-induced TRPV1 activation at +100 mV, but only three of them inhibited TRPV1 activation by CAPS whatever the voltage used (compounds 20, 32, and 58) (Fig. 7D). Compounds 22, 30, and 48 partially blocked TRPV1 activation by CAPS at +100 mV, but displayed no inhibitory activity at either –25 mV or –100 mV. Compound 19 efficiently inhibited TRPV1-CAPS activation at +100 mV but potentiated CAPS activation at –25 mV and had no effect at –100 mV. Compound 60 was as efficient as CPZ to antagonize CAPS activation of TRPV1 at both +100 and –25 mV, but potentiated CAPS activation at –100 mV. Compound 55 behaved as

a partial antagonist of TRPV1 activation by CAPS at –25 and –100 mV, but had no effect at +100 mV. Compound 31 potentiated TRPV1 activation by CAPS at –100 mV but had no effect at either –25 mV or +100 mV. Finally, compound 40 (not represented on Fig. 7C for simplification) strongly potentiated CAPS activation whatever the voltage considered (% of CPZ effect was –343.2, –52.4, and –95.75 respectively for +100 mV, –25 mV, and –100 mV). Altogether, these results indicate that, when using APC, the behavior of a given compound to modulate an ion channel can vary drastically depending on the plasma membrane potential.

**The Correlation between Chemical Structure-Driven and Data-Driven Clustering indicates that Calmodulin Antagonists Act as TRPV1 Inhibitors.** Since no consensus emerged from the comparison of the results obtained with each assay taken independently, we next performed a structure-driven and a data-driven clustering of these 54 drugs to unravel a potential structure-function relation that might, in the light of the bibliography, provide insights into the ability of each drug to either activate or inhibit TRPV1.

We found that all 54 identified drugs could be sorted in only 11 different clusters (Supplemental Table 3). Cluster A contains drugs harboring a trifluoromethyl benzene group.





**Fig. 5.** Screening of the Prestwick chemical library for identification of inhibitors of TRPV1 activation by CAPS. “n1” and “n2” stand to the first and second screens. (A, B, C) Identification of candidate compounds inhibiting TRPV1(CAPS) in the primary screen of the Prestwick chemical library using the intramolecular BRET probe (A), the intermolecular BRET assay (B), and the automated calcium assay (C). The concentration of the compound tested was 10  $\mu$ M in each test. Values were normalized to the maximal efficacy measured in presence of 500 nM CAPS (BRET assays) or 100 nM CAPS (ACA). Candidate compounds were characterized as hits if they induced a decrease of at least 30% of CAPS efficacy in the two technical replicates of the screen (area in gray). (D, E, F) Histogram of relative compounds efficacies to induce TRPV1 activation when assessed with the intramolecular BRET probe (D), the intermolecular BRET assay (E), and automated calcium assay (F). The x-axes were bounded in the [-30, 70] interval to align the histograms horizontally. The numbers of nondisplayed values are 88, 5, 9, and 197 for intramolecular BRET, intermolecular BRET, and calcium assays, respectively. (G, H, I) Scatter plot of the Prestwick chemical library screen performed in duplicate with the intramolecular BRET probe (G), the intermolecular BRET assay (H), and automated calcium assay (I). The red line represents the  $y = x$  equation.

Cluster C contains drugs harboring a bicycle in their structure. Cluster D is composed of detergent molecules. Cluster E is composed of molecules with at least three aromatic moieties joined by at least a carbon-carbon single bond, whereas cluster F contains drugs with only two aromatic rings joined by a linker. Cluster G contains tricyclic compounds such as phenothiazines. Clusters H, I, J, and S contain macrocyclic lactones, statins, dihydropyridines, and sterols-derived compounds respectively. Finally, 5 compounds did not fit in any of the aforementioned clusters and belong therefore to a miscellaneous cluster.

We next performed hierarchical clustering of the data acquired with these 54 hits, taking into account the 12 parameters integrating the results measured with both intra- and intermolecular BRET probes, ACA, and APC at +100 mV, -25 mV, and -100 mV in both activation and inhibition modes. The resulting dendrogram (Fig. 8) indicates the correspondence with the aforementioned

structure-driven clustering and the measured activity of the drug as assessed with each technique in both activation and inhibition mode.

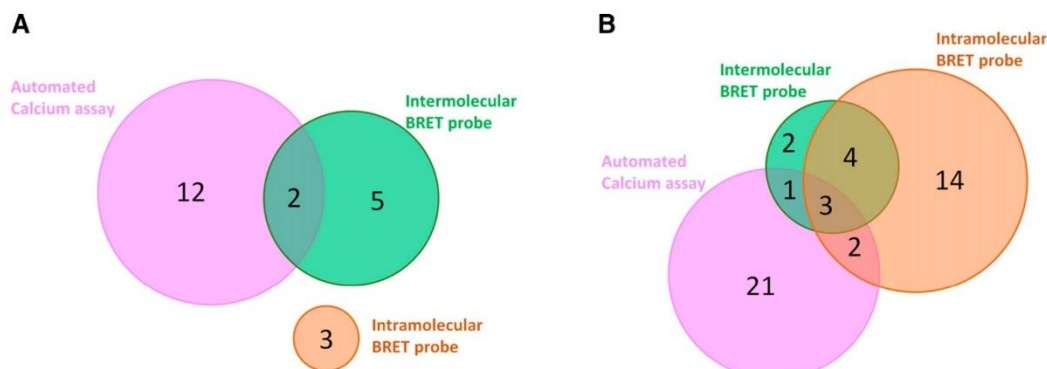
The most important correlation arising from this multi-parametric analysis points to a significant enrichment of drugs belonging to clusters E, G, and J into group 7 of the dendrogram (Supplemental Fig. 4). This prompted us to perform an in-depth analysis of the literature focusing on these clusters. Strikingly, we found that 12 of the 24 hits belonging to cluster E, G, and J are well known calmodulin antagonists [trifluopromazine (#01), chlorpromazine (#03), thioridazine (#04); cyproheptadine (#05); perphenazine (#06), loperamide (#11), clotrimazole (#18), perhexiline maleate (#20), quina-crine (#22), fluphenazine (#23), felodipine (#28), prenylamine lactate (#32)] (Rochette-Egly et al., 1982; Johnson and Witte-nauer, 1983; Hatano et al. 2013; Montero et al., 1991; Caldir-ola et al., 1992; Hegemann et al., 1993; Xin and Zhang, 1993; Oláh et al., 2007; Lübker and Seifert, 2015).

TABLE 3

% of confirmed hit between replicates assays

The number of confirmed hits found for each method is indicated in parentheses.

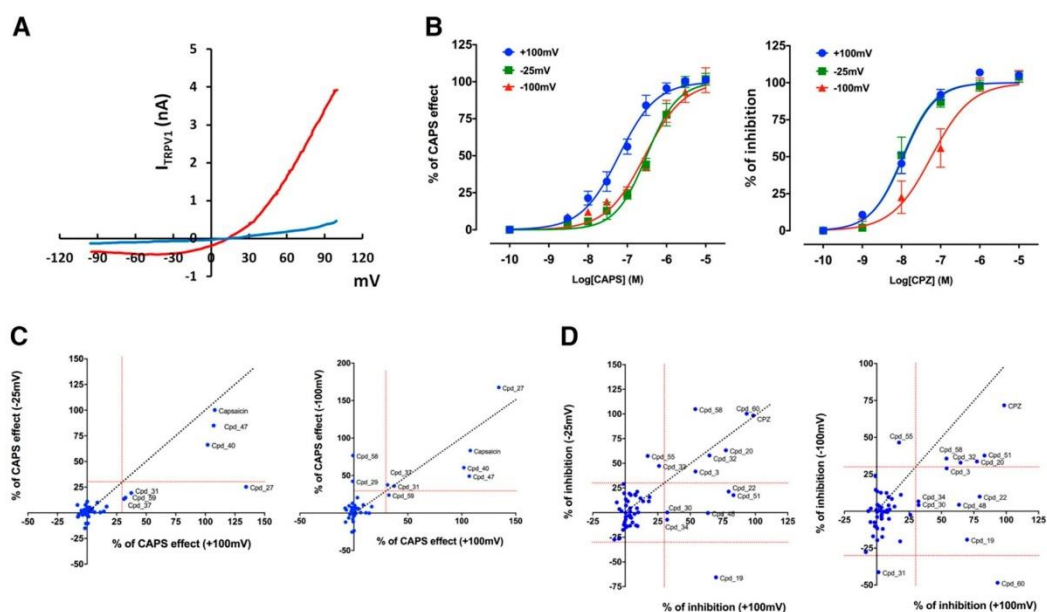
	Intramolecular BRET Probe	Intermolecular BRET Probe	Calcium Assay
Agonist mode	100% (3)	87.5% (7)	18.1% (16)
Antagonist mode	42.6% (23)	58.8% (10)	31.2% (28)



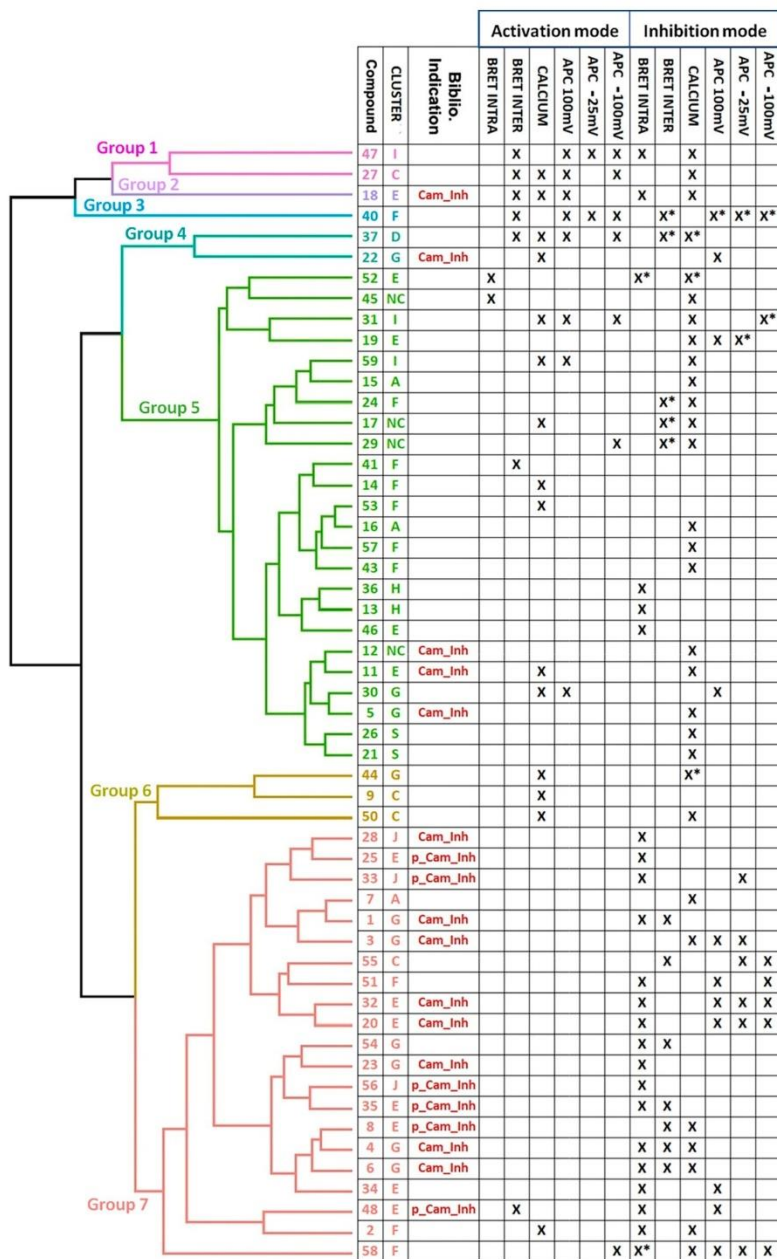
**Fig. 6.** Venn diagram of the hits detected with the TRPV1 intramolecular BRET probe, TRPV1 intermolecular BRET assay, and ACA in the activation mode (A) and in the inhibition mode (B).

Cluster J contains 3 compounds [felodipine (#28), lacidipine (#33), and cilnidipine (#56)] that are all derived from 3,5-diester-4-aryldihydropyridin and differ by structural variations on ester functions and aryl ring. All these three compounds were shown by the intramolecular BRET probe to antagonize the conformational changes occurring in TRPV1 after CAPS activation. No effects were detected using any other technique, except for APC at  $-25$  mV that also

measured an antagonist effect of lacidipine (Fig. 8 and Supplemental Table 3). To the best of our knowledge, among these three compounds, only felodipine has been reported to inhibit CaM (Johnson and Wittenauer, 1983). However, because of their similar chemical structure, it is highly possible that both lacidipine and cilnidipine, two  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers (Micheli et al., 1990; Chandra and Ramesh, 2013), also act as CaM antagonists.



**Fig. 7.** Influence of the imposed membrane potential on the ability of hit compounds to activate TRPV1 or inhibit TRPV1 activation by CAPS. (A) I–V curves of vehicle (blue curve) or CAPS (1  $\mu\text{M}$ , red curve)-evoked currents in HEK cells stably expressing hTRPV1. (B) The concentration-response curve of CAPS (left panel,  $n = 44$ ) or CPZ (right panel,  $n = 21$ )-evoked current measured at +100 mV,  $-25$  mV, and  $-100$  mV in HEK cells stably expressing hTRPV1. CPZ concentration-response curves were measured 2 to 3 minutes after the addition of 50 nM CAPS in the assay buffer. (C) Scatter plot of the ability of hit compounds to activate TRPV1 when the membrane potential is clamped to  $-25$  mV versus +100 mV (left panel) or  $-100$  mV versus +100 mV (right panel). (D) Scatter plot of the ability of hit compounds to inhibit CAPS (50 nM)-activated TRPV1 when the membrane potential is clamped to  $-25$  mV versus +100 mV (left panel) or  $-100$  mV versus +100 mV (right panel).



**Fig. 8.** Data-driven hierarchical clustering of the effect of the hit compounds. The NbClust R package automatically sorted the 54 analyzed hits in 7 different groups. A complete linkage method (default method based on farthest neighbors' distance) was then applied to hierarchical clustering of the hits into each group using a maximum (Chebychev) distance metric (Abello et al., 2002). Correspondence with the structure-driven clustering and the measured activity of the drug as assessed with each technique in both activation and inhibition mode is also indicated. "X" indicates that the indicated drug efficacy was equal or above 30% of CAPS efficacy to trigger TRPV1 activation (activation mode) or inhibited TRPV1 activation by CAPS by at least 30% (see material and methods for details). "X\*" indicates that the indicated drug did not inhibit but potentiated TRPV1 activation by CAPS (see Supplemental Table 3 for quantitative analysis). Whether each compound is identified as CaM inhibitor (Cam\_Inh) or putative CaM inhibitor (p\_Cam\_Inh) is also indicated (see results for details).



Nine out of the ten compounds belonging to cluster G are anti-psychotropic drugs derived from phenothiazine [triflupromazine (#01), chlorpromazine (#03), thioridazine (#04), perphenazine (#06), quinacrine (#22), fluphenazine (#23), metixene (#30), methotrimeprazine (#44), and thiethylperazine maleate (#54)]. Phenothiazines are among the most potent calmodulin inhibitors, especially when the phenothiazine derivative is substituted by a halogen (Rochette-Egly et al., 1982; Caldirola et al., 1992). The tenth compound of the cluster G, cyproheptadine (#05), which is not a phenothiazine, has been described as a calmodulin inhibitor in one study (Xin and Zhang, 1993) and is structurally related to amitriptyline, a known calmodulin inhibitor (Reynolds and Claxton, 1982). To the best of our knowledge, among the ten compounds belonging to cluster G, the only compounds for which CaM antagonist activity has not been established are metixene (#30), methotrimeprazine (#44), and thiethylperazine maleate (#54) (Volpi et al., 1981; Prozialek and Weiss, 1982; Rochette-Egly et al., 1982; Oláh et al., 2007; Lübker and Seifert, 2015).

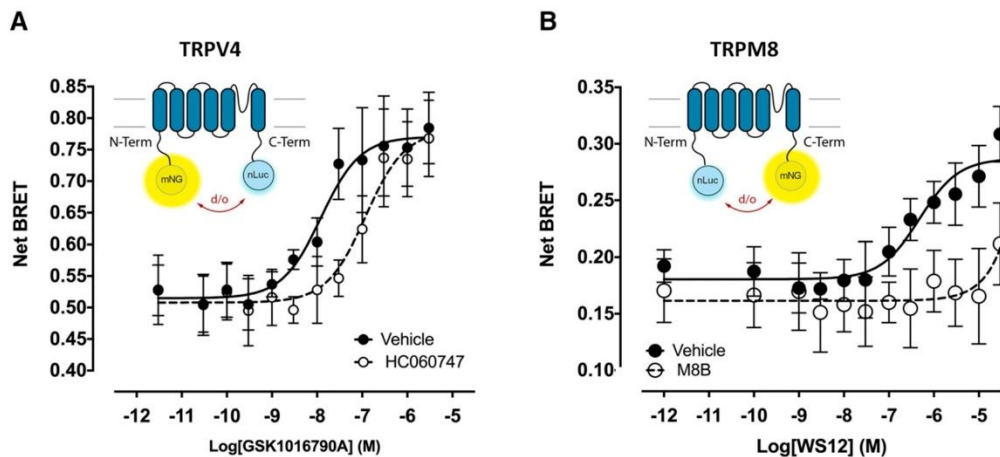
Nine of the twelve compounds belonging to cluster E are composed of poly-cycle rings-containing molecules. Interestingly, perhexilin maleate (#20) and prenylamine Lactate (#32) that had been detected as inhibitors by intramolecular BRET probe in the primary screen are both calmodulin antagonists (Caldirola et al., 1992), and have been confirmed as inhibitors of CAPS-induced TRPV1 activation by APC whatever the voltage used (Fig. 8 and Supplemental Table 3). Fluspirilen (#48), which triggered a conformational change in TRPV1 and was detected as an inhibitor by APC +100 mV, is known to bind CaM (Butts et al., 2013) and is structurally related to penfluridol, a first-generation neuroleptic shown to be a CaM antagonist (Lübker and Seifert, 2015). Butocunazole (#25), which has been detected as an inhibitor of TRPV1(CAPS) by the intramolecular BRET probe is an imidazole-derived compound. Direct interaction of imidazole-derived compounds with calmodulin has been suggested as a possible mechanism for their antifungal activity (Hegemann et al., 1993; Breitholtz et al., 2020), further suggesting a functional link between CaM inhibition and TRPV1 activation. Sertindole (#35), which contains a 4-piperinyl moiety connected in position 3 of an indole ring, and astemizole (#08), which contains a 4-amino-piperinyl moiety connected in position 2 of a benzimidazole ring, share structural features with the calmodulin antagonist CGS 9343B (Norman et al., 1987). Loperamide (#11), a synthetic piperidine derivative, known to inhibit TRPV1 activation by ACA, is a recognized CaM antagonist (Merritt et al., 1982) and can prevent capsaicin-induced thermal allodynia in primates, in the absence of thermal antinociceptive effects (Butelman et al., 2004). Clotrimazole (#18) has a blurred profile since it was detected as an activator of TRPV1 by the intermolecular BRET probe and APC and inhibitor by intramolecular BRET probe and ACA. Nonetheless, clotrimazole (#18) is a potent calmodulin inhibitor (Montero et al., 1991; Hegemann et al., 1993) and has been detected as a TRPV1 activator (Meseguer et al., 2008). Of note, clotrimazole-derived compounds are weak competitive inhibitors of TRPV1(CAPS) (Oláh et al., 2007).

To the best of our knowledge, the only hit compound which has been shown to inhibit purified CaM *in vitro* (Schaeffer et al., 1987) and which does not belong to clusters E, G, or J is

nicergoline (#12), a nitrogen polyheterocyclic compound filed in the miscellaneous cluster (Supplemental Table 3). In agreement with these considerations, most CaM inhibitors or putative CaM inhibitors belong to group 7 of the data-driven hierarchical clustering (Fig. 8). Interestingly, the cross-correlation between chemical structure-driven and data-driven clustering indicates that group 7 is mainly composed of drugs initially identified by intra- and/or intermolecular BRET probes (Fig. 8). Hierarchical clustering of the data acquired without ACA still yields to the formation of 7 groups with one of them being enriched with compounds belonging to clusters E, G, and J (Supplemental Fig. 4). In sharp contrast, hierarchical clustering of the data acquired without our BRET probes does not allow us to identify compounds belonging to clusters E, G, and J as part of a separate group (Supplemental Fig. 4). This observation points to a predominant detection of CaM inhibitors as inhibitors of TRPV1 activation by CAPS using our BRET probes.

**Analysis of Hit Compounds Not Displaying CaM Inhibitor Activities.** Bibliographic pieces of evidence also support an apparent CaM-independent modulation of TRP ion channels, sometimes including TRPV1 itself, by several compounds identified as hits in our screens.

Four compounds, for which no CaM antagonist activity has been described, were identified by more than one technique to inhibit TRPV1(CAPS): [antimycin A (#17), lovastatin (#31), simvastatin (#47), and sertraline (#51)] (Supplemental Table 3 and Fig. 8). In the cluster F, sertraline (#51), a 1,2,3,4-tetrahydronaphthalen derivative, which is substituted by a methylamino at position 1 and a 3,4-dichlorophenyl at position 4 (the S, S diastereoisomer), has been detected as an inhibitor by the BRET intramolecular probe and APC at +100 mV and -100 mV. Interestingly, tetraline urea derivatives have been shown to display antagonistic properties against TRPV1 activation by CAPS (Meseguer et al., 2006; Jetter et al., 2007). Although sertraline is not a tetraline urea derivative, it would be interesting to assess whether substitution of the methylamino group of sertraline by an urea group improve sertraline potency and/or efficacy to inhibit CAPS-mediated TRPV1 activation. Lovastatin (#31) and simvastatin (#47) belong to cluster I, which also contains mevastatin (#59). All these three compounds displayed a blurred profile when comparing the results obtained using activation and inhibition modes with the different readout assays used. Cluster I is composed of statin molecules, also known as HMG-CoA reductase inhibitors, which are a class of lipid-lowering drugs reducing illness and mortality in persons who are at high risk of cardiovascular disease. They are the most common cholesterol-lowering drugs, and cholesterol binding has been shown to be of importance for TRPV1 gating (Saha et al., 2017), which may point toward an indirect action of these compounds on TRPV1 activity. In our study, simvastatin (#47) was detected as an activator by both the intermolecular BRET probe and APC, and as an inhibitor by calcium and intramolecular BRET probes. Lovastatin (#31) and mevastatin (#59) were both detected as an activator by APC but behaved both as TRPV1 activator and inhibitor using ACA. In the literature, lovastatin (#31) and simvastatin (#47) have been shown to trigger TRPV1-dependent  $Ca^{2+}$  influx in endothelial cells (Su et al., 2014; Negri et al., 2020). However, to the best of our knowledge, an effect of mevastatin on the activity of TRP ion channels has never



**Fig. 9.** Assessment of the functionality of intramolecular BRET probes targeting TRPM8 and TRPV4. (A) Concentration-response curves of the TRPV4 agonist GSK1016790A measured in HEK293T cells expressing the mNeonG-TRPV4-nLuc BRET probe, either in presence of the TRPV4 antagonist HC060747 (10  $\mu$ M,  $n = 3$ ) or an equivalent quantity of solvent (vehicle,  $n = 3$ ). The  $pEC_{50}$  of GSK1016790A was  $7.91 \pm 0.11$ . (B) Concentration-response curves of the TRPM8 agonist WS12 measured in HEK293T cells expressing the nLuc-TRPM8-mNeonG BRET probe, either in presence of the TRPM8 antagonist M8B (10  $\mu$ M,  $n = 6$ ) or an equivalent quantity of solvent (vehicle,  $n = 4$ ). The  $pEC_{50}$  of WS12 was  $6.48 \pm 0.21$ . Insets: schematic representation of mNeonGreen-TRPV4-nLuc and nLuc-TRPM8-mNeonGreen intramolecular BRET probes.

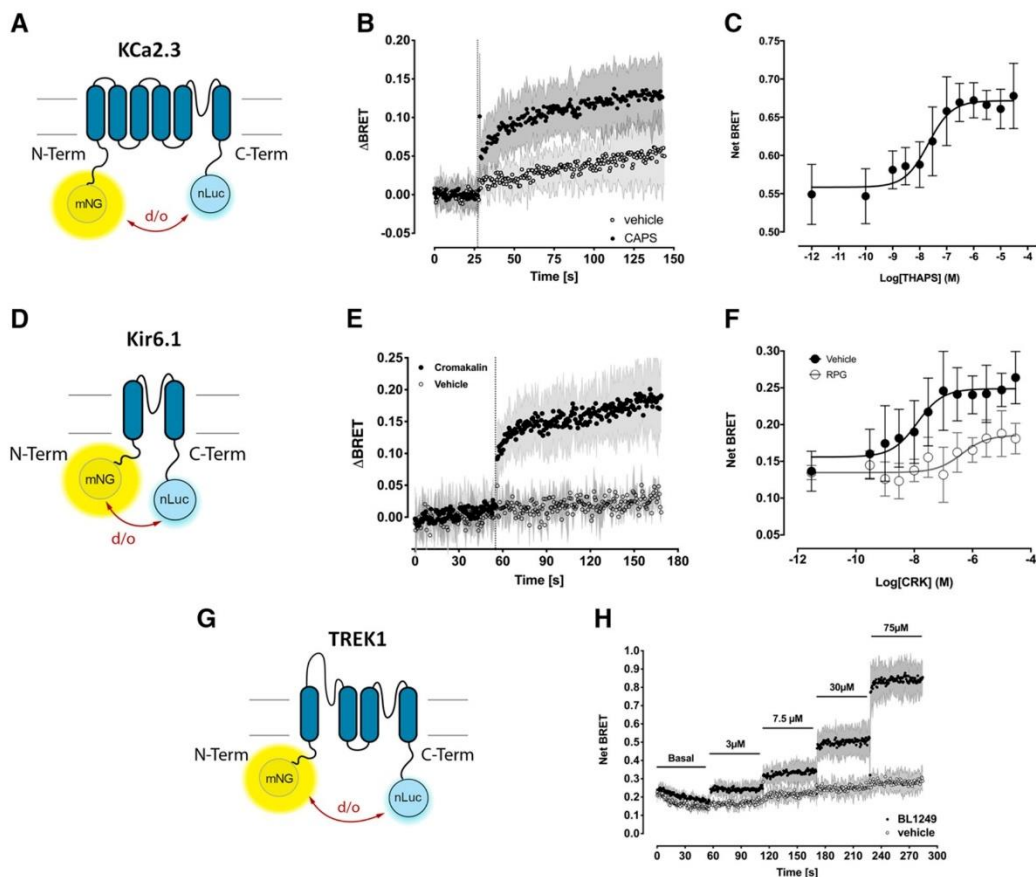
been reported. Finally, two studies suggest that TRPV1 contributes to  $Ca^{2+}$  influx triggered in vagal nociceptive neurons by the well known antibiotic antimycin A (#17), which belongs to the miscellaneous cluster (Nesuashvili et al., 2013; Stanford et al., 2019).

In cluster E, raloxifen (#46), detected as a TRPV1 inhibitor only by the intramolecular BRET probe (Supplemental Table 3 and Fig. 8), has been shown to inhibit TRPV1 activation by CAPS in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats (Yazgan and Nazoroğlu, 2017).

Finally, several compounds not described as CaM antagonists were shown to inhibit CAPS-induced TRPV1 activation by ACA, but not by either of the two BRET probes (Supplemental Table 3 and Fig. 8). Bibliographic evidence exists in support of the inhibitory efficacy against CAPS-induced TRPV1 activation of 6 of these compounds. In cluster A, flufenamic acid (#16), an anthranilic acid derivative carrying an *N*-(trifluoromethyl)phenyl substituent, has been shown to inhibit TRPV1 activation by CAPS (Hu et al., 2010; Guinamard et al., 2013). In cluster C, mefloquine (#7), which is a quinoline derivative and the antagonistic behavior of these compounds against TRPV1, has been recently discussed (Ambatkar and Khedekar, 2019). In cluster E, homochlorcyclizine (#19) shares structural determinants with dexbrompheniramine, which has been shown to inhibit TRPV1 in HEK293 cells (Sadofsky et al., 2008). In cluster F, rosiglitazone (#57), which belongs to the thiazolidinedione class, has been shown to inhibit TRP melastatin 3 ion channel while activating TRP canonical 5 ion channel (Majeed et al., 2011). Interestingly, during the screening of the Prestwick chemical library with the intermolecular BRET probe, the closely related compound Troglitazone enhanced TRPV1 activation by CAPS (Supplemental Table 2). Also, Troglitazone has been recently shown to directly activate TRPV1

(Krishnan et al., 2019). Still in cluster F, hexachlorophene (#58) is a polychloroaromatic compound shown to activate Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1 (KCNQ1) (Zheng et al., 2012), a molecular event known to inhibit TRPV1 (Ambrosino et al., 2019). Whether KCNQ1 ion channels are expressed in HEK293T cells is not known, but outward potassium currents do exist in HEK293T cells (Ponce et al., 2018), leaving room for of an indirect effect of hexachlorophene on TRPV1. In cluster S, epiandrosterone (5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -ol-17-one) (#26) is a dehydroepiandrosterone metabolite only differing by one  $\pi$ -bond from 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -ol-17-one, which one has been shown to antagonize CAPS-induced activation of TRPV1 (Chen et al., 2004). Auranofin (#45), an oral chrysotherapeutic agent for the treatment of rheumatoid arthritis, which belongs to the miscellaneous cluster, has been shown to activate TRPA1 but not TRPV1 in transiently transfected HEK cells using calcium assay (Mannhold et al., 1987). Although we also found that no TRPV1 activation was detected using a calcium assay with this compound, Auranofin, nonetheless, triggered a conformational change in TRPV1 that led to an increase of the BRET measured with the intramolecular BRET probe.

Some compounds for which we found no bibliographic evidence linking them to the TRP ion channel, calcium, or calmodulin were also detected as hits by more than one technique and might be considered for further studies. Efavirenz (#27, cluster C), a noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase, and beta-escin (#37, cluster S) has been detected as TRPV1 activator by both intermolecular BRET probes, calcium, and APC but, to the best of our knowledge, no evidence links these compounds to TRP ion channels. Importantly, beta-escin (#37) is known as a patch-clamp perforating agent but triggered only a very small current in nontransfected cells in our experimental conditions



**Fig. 10.** Assessment of the functionality of intramolecular BRET probes targeting KCa2.3, Kir6.1, and TREK1. (A) Schematic representation of mNeonGreen-KCa2.3-nLuc intramolecular BRET probe. (B) Kinetic measurement of the effect of CAPS (10  $\mu$ M) or vehicle on the BRET ratio measured from HEK293T cells coexpressing mNeon-KCa2.3-nLuc intramolecular BRET probe, untagged TRPV1 ion channel, and CaM ( $n = 5$ ). The dashed line indicates the time of the injection. (C) Dose-response curves of Thapsigargin on the BRET ratio measured from HEK293T cells transfected with the mNeonG-KCa2.3-nLuc BRET probe ( $n = 3$ ). The  $pEC_{50}$  of Thapsigargin was  $7.68 \pm 0.17$ . (D) Schematic representation of mNeonGreen-Kir6.1-nLuc intramolecular BRET probe. (E) Kinetic measurement of the effect of cromakalim or vehicle on the BRET ratio measured from HEK293T cells coexpressing the mNeon-Kir6.1-nLuc and SUR1 subunits ( $n = 3$ ). The dashed line indicates the time of the injection. (F) Dose-response curves of the Kir6.1 agonist cromakalim (CRK), injected in the presence or absence of repaglinide (10  $\mu$ M), on the BRET ratio measured from HEK293T cells transfected with the mNeonG-Kir6.1-nLuc BRET probe ( $n = 4$  for vehicle and  $n = 3$  for RPG). The  $pEC_{50}$  of CRK was  $7.84 \pm 0.18$ . (G) Schematic representation of mNeonGreen-TREK1-nLuc intramolecular BRET probe. (H) Kinetic measurement of the effect of increasing dose of BL1249 or vehicle on the BRET ratio measured from HEK293T cells coexpressing the mNeon-TREK1-nLuc intramolecular BRET probe ( $n = 3$ ).

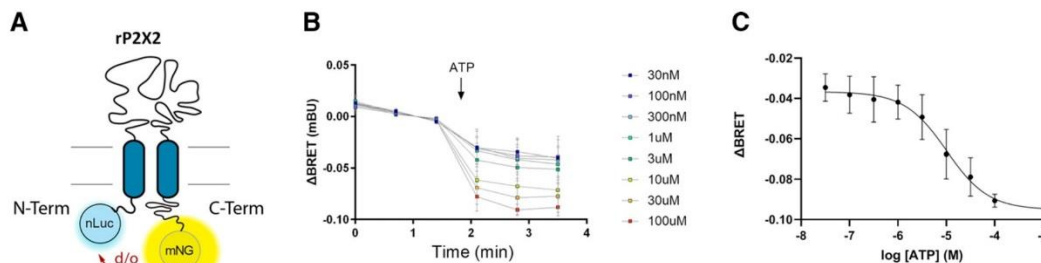
(Supplemental Table 3), thus validating it as a potential hit. Oxethazaine (#2, cluster F), a local anesthetic, has been shown to inhibit TRPV1 activation by CAPS using both ACA and intramolecular BRET probes. Finally, we found no bibliographic evidence linking several compounds detected as hits in our primary screen by only one technique. Among these compounds, dipyrindamole (#9, cluster C), nitrofurantoin (#14, cluster F), and repaglinide (#53, cluster F) were detected as inhibitors or activators only by ACA. Of note, repaglinide has been shown to target neuronal calcium sensor proteins but not calmodulin (Okada et al., 2003), and its binding to TRP ion channel is not described. Pyrvinium pamoate (#52, cluster F) and ivermectin (#13, cluster H) were respectively detected as TRPV1 activator and inhibitor by the

intramolecular BRET probe. Sulfamer (#41, cluster F) was detected as a TRPV1 activator using the intermolecular BRET probe.

Altogether, the high structural diversity of these hits could be useful for structure-activated relationship studies (Tafesse et al., 2014).

**Exemplification of the Concept of Intramolecular BRET Probe to Other Ion Channels.** The results obtained with intramolecular and intermolecular BRET probes prompted us to assess whether BRET-based biosensors could be derived for other ion channels. Since not all ion channels are in interaction with calmodulin, we focused on intramolecular BRET probes targeting ion channels having both N- and C-terminal extremities into the cytoplasm.





**Fig. 11.** (A) Schematic representation of the nLuc-P2X2-mNeonGreen intramolecular BRET probe, where nLuc was fused to the N-terminal extremity of rat P2X2 whereas mNeonGreen was fused to the C-terminal extremity. After activation of P2X2, the distance (d) and/or the orientation (o) between nLuc and mNeonGreen are expected to be modified during P2X2 gating and subsequent conformational changes of P2X2 subunits. (B) Kinetic measurement of the effect of increasing dose of ATP on the BRET ratio measured from HEK293T cells expressing the nLuc-P2X2-mNeonGreen intramolecular BRET probe ( $n = 3$ ). (C) Concentration-response curves of ATP on the BRET ratio measured from HEK293T cells transfected with the nLuc-P2X2-mNeonGreen BRET biosensor ( $n = 3$ ). The pEC50 of ATP was  $4.99 \pm 0.305$ .

We first assessed whether the activity of two other TRPs ion channels, TRPV4 and TRPM8, could also be measured using intramolecular BRET probes. As shown in Fig. 9, the BRET signal measured on HEK293T cells transiently expressing mNeonG-hTRPV4-nLuc (Fig. 9A) and nLuc-hTRPM8-mNeonG (Fig. 9B) intramolecular BRET probes was concentration-dependently increased after addition in the cell culture medium of GSK1016790A and WS12, two specific agonists of TRPV4 and TRPM8 respectively (Bödning et al., 2007; Thorneloe et al., 2008). The measured half-maximal responses were consistent with those reported in the literature using patch-clamp or calcium-flux measurements on cells transiently expressing TRPV4 or TRPM8 (Bödning et al., 2007; Jin et al., 2011). The pharmacological selectivity of the ligand-promoted BRET changes was further demonstrated by the competitive nature of the effects, as both HC060747 and MSB, two well known competitive antagonists of TRPV4 and TRPM8 respectively, right-shifted the corresponding agonist potency to higher values in both intramolecular BRET tests. Altogether, these data strongly suggest that the agonist-promoted BRET changes in TRPV4 and TRPM8 intramolecular BRET probes correspond to activation of these two ion channels in live cells, as previously shown for TRPV1 (Ruigrok et al., 2017).

To go further in the exemplification of ion channel intramolecular BRET probes, we constructed mNeon-KCa2.3-nLuc (Fig. 10A), mNeon-Kir6.1-nLuc (Fig. 10D), and mNeon-TREK1-nLuc BRET (Fig. 10G) intramolecular BRET probes targeting respectively 1) KCa2.3, a small conductance calcium-activated potassium channels sharing the same 6-transmembrane domains (TM) basic architecture with Shaker-like voltage-gated potassium channels and TRP ion channels, 2) Kir6.1, an ATP-sensitive inwardly-rectifying potassium channels, the structure of which contains two-TM domain per monomer, and 3) TREK1, a two-pore-domain background potassium channels containing two pairs of TMs per monomer, each flanking a pore domain. The functionality of KCa2.3 was assessed in two different ways. Firstly, we cotransfected mNeonG-KCa2.3-nLuc intramolecular BRET probe with TRPV1 and calmodulin in HEK293T cells, and triggered a  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cell through TRPV1 pore opening using a saturating concentration of CAPS (Fig. 10B).

CAPS injection induced a rapid increase of the basal BRET signal until reaching a plateau. No such effect was detected when the solvent was injected alone (vehicle). Secondly, in HEK293T cells transiently expressing mNeonG-KCa2.3-nLuc intramolecular BRET probe alone, we triggered a rise in intracellular calcium by blocking calcium transport into the sarcoplasmic and endoplasmic reticula using an increasing dose of thapsigargin (Lu et al., 2014). This produced a concentration-dependent increase of the basal BRET ratio (Fig. 10C). The Kir6.1 intramolecular BRET probe was activated using cromakalim, a potent and selective ATP-sensitive potassium channel opener (Sanguinetti et al., 1988). As expected, cromakalim induced a rapid increase of the basal BRET signal until reaching a plateau while, again, no effect was detected when the solvent was injected alone (vehicle) (Fig. 10E). Importantly, the measured potency of cromakalim (Fig. 10F) fell in the range already described in the literature (Wilson et al., 1988). Also, repaglinide, a known inhibitor of Kir activation by cromakalim (Gasser et al., 2003), not only right-shifted cromakalim concentration-response curve but also decreased cromakalim efficacy and Kir6.1 basal BRET. These observations indicate that repaglinide is not a competitive antagonist of cromakalim as described by others (Gasser et al., 2003), but rather behaves as a noncompetitive unsurmountable antagonist of cromakalim by stabilizing Kir6.1 in a distinct conformational state. Finally, TREK1 was successfully activated using increasing quantities of the chemical activator BL1249 (Pope et al., 2018) (Fig. 10H). Altogether, these results confirm that intramolecular BRET biosensors can probe the conformational changes occurring during the gating of ion channels belonging to various ion channel families and not just the TRP ion channel family.

This led us to assess whether the intramolecular BRET sensor can also probe ligand-gated ion channels such as P2X purinergic receptors that have both extremities inside the cytoplasm. We therefore constructed the nLuc-P2X2-mNeonG intramolecular BRET probe (Fig. 11A) and transiently transfected it in HEK293T cells. The rat P2X2 ion channel was activated in the presence of increasing quantities of ATP that induced a time-dependent decrease of the basal BRET (Fig. 11B). Dose-response analysis revealed that ATP activated the nLuc-P2X2-mNeonG intramolecular BRET probe with



$EC_{50}$  fitting the known potency of ATP to activate native P2X2 (Fig. 11C), as measured using conventional techniques (North and Surprenant, 2000). These results further suggest the suitability of our intramolecular BRET probe to efficiently measure the conformational changes occurring in various ion channel during their gating.

### Discussion

Taking advantage of our recently published intra- and intermolecular BRET probes targeting TRPV1 ion channels activation in real-time and on live cells (Ruigrok et al., 2017), we have 1) assessed whether such BRET biosensors can effectively be used for high-throughput purposes, 2) performed a comparative screen of the Prestwick chemical library with both our BRET probes and ACA, followed by the analysis of the hits using APC, and 3) exemplified the use of intramolecular BRET probe to measure other ion channel activation.

Both intra- and intermolecular BRET probes made it possible to account for the agonist or antagonist ability of different reference compounds to modulate TRPV1 activity in live HEK293T cells (Fig. 1). Although the measured potencies of each agonist obtained from each of our two BRET probes are in full agreement with the data reported in the literature and with the values measured with ACA, the  $pIC_{50}$  values measured from most of the antagonists were found to be lower by 0.5–1.5 log units (Fig. 2 and Table 1). Several experimental differences between our study and the ones in the literature may explain this discrepancy, such as the technique used to measure TRPV1 activity, the pH and temperature of the assay, the amount of CAPS needed to trigger TRPV1 activation in the presence of the various antagonists, as well as the cell model used which has been shown to directly impact both efficacy and potency of TRPV1 ligands (Bianchi et al., 2006). Species-specific differences in TRPV1 functionality may also matter (Abbas, 2020). The potencies measured for each reference compound using both intra- and intermolecular BRET probes were however very close to the one measured using ACA, which is often used as the primary screen for calcium ion channels.

Most studies using APC to study TRPV1, if not all, measure the outward current at nonphysiologic membrane potentials (between +60 and +100 mV) and might thus highlight compounds that are not relevant for a therapeutic effect. We have shown that the choice of the membrane potential to measure the chemical activation of TRPV1 not only impacts the potency of several TRPV1 agonists and antagonists, but also drastically affects the ability of many of the tested drugs to activate or inhibit TRPV1. One likely explanation for this observation is that different ternary or quaternary conformational states of TRPV1 are stabilized when the membrane potential is clamped at various values. This observation is in agreement with the allosteric model for gating of thermo-TRPs, such as TRPV1, in which voltage, temperature, and ligands are independently coupled, either positively or negatively, to channel gating (Matta and Ahern, 2007). This is of prime importance since ligand binding is expected to be intrinsically dependent on its receptor conformation state (de Boer, 2020), thereby rehabilitating nonelectrophysiological methods such as our novel BRET-based assay for ion channel HTS. Both intra- and intermolecular BRET assays achieved,

moreover, excellent Z-factors, further indicating that both BRET assays are fit enough for high-throughput screening (Fig. 3).

We then aimed at comparing the effectiveness of both intra- and intermolecular BRET assays with that of HTS conventional methods (ACA and APC) to screen the Prestwick small-sized chemical library. Primary screening using ACA, intra- and intermolecular BRET assays indicated that 59 drugs activated TRPV1 or inhibited CAPS-induced TRPV1 activation. The results were heterogeneous, since 82.6% of the hits were found by only one method. No hits were found by all three methods to behave as TRPV1 activator, and only 3 drugs were found by the three assays to behave as an inhibitor of TRPV1(CAPS). Of note, out of the 33 drugs found by ACA to modulate TRPV1 activity, 8 were found to both activate and inhibit TRPV1, indicating that almost a quarter of the hits found with ACA yielded ambiguous results (Supplementary Fig. 6 and Table 3). In sharp contrast, no hits were detected as both activator and inhibitor of TRPV1 using either intra- or intermolecular BRET probe.

The secondary screen of the 59 identified drugs with APC highlighted important facts. Since only 14 drugs were confirmed as TRPV1 activator or inhibitor by APC, our results mean either that both BRET probes and ACA are prone to yield a lot of false positive hits or that APC measurement is prone to yield a lot of false-negative hits. A careful review of the literature highlighted interesting clues pointing to a more balanced conclusion: First, as mentioned in the result section, 13 compounds over the 59 detected hits (~22% of the hits identified) are well known calmodulin antagonists, and 12 of them belongs to only three clusters (E, G, and J). Seven other compounds belonging to clusters E, G, or J, share structural similarities with known CaM antagonists (see result section for details). Over these 20 drugs, 15 were identified as TRPV1(CAPS) inhibitors by either one or both BRET probes while only 7 and 6 were respectively detected by ACA and APC (Fig. 8). Also, to the best of our knowledge, 19 other compounds known to be CaM antagonists were part of the Prestwick chemical library but were not included in the lists of 59 drugs identified during the primary screening (Supplemental Table 4). Reanalysis of the results obtained with these compounds revealed that the average inhibition efficacy of 8 of them was either very close to the drug efficacy cut-off fixed at 30%, or above but with no reproducibility between n1 and n2. These compounds, mostly detected with the intramolecular and intermolecular BRET assay, might be therefore false negatives that could have been included as positive hits using a data-driven analysis of the primary screen results instead of a subjective cut-off of the efficacy magnitude. Such workflow will be included in our further studies. Overall, these results indicate that most of the CaM antagonists included in the Prestwick chemical library were detected as inhibitor of TRPV1 activation by CAPS. Interestingly, although calmodulin is classically viewed as a negative modulator of TRPV1, regulating its desensitization (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004; Lishko et al., 2007; Lau et al., 2012), CaM inhibition using various chemical compounds, including chlorpromazine (#3) and fluphenazine (#23), has already been shown to inhibit CAPS-induced TRPV1 activation with a potency in the  $\mu$ M range (Oláh et al., 2007). Whether CaM antagonists can inhibit TRPV1 through direct interaction with TRPV1 itself, by preventing

the physical interaction between TRPV1 and CaM, or by another means, remains to be determined. In the light of our BRET-based repurposing drug screening results, and in the quest for new TRPV1 inhibitors, considering the CaM-TRPV1 physical and/or functional interaction as druggable is a tempting hypothesis that deserves further attention.

We also found bibliographic evidence indicating that 12 drugs out of the 59 identified during the primary screen activated or inhibited TRPV1 or other TRP ion channels without any known relation with calmodulin. Five of these drugs were detected using either one or both BRET probes, 5 were detected using APC and 9 were detected using ACA, and no drug was detected by all three methods together. In sharp contrast with the drugs targeting CaM, which all but one belonged to only three clusters, these 12 drugs belong to various clusters without any clear relationship with their structure (see results for details and Supplemental Table 3). Except for rosiglitazone (#57) and mefloquine (#07), no clear relationship between the chemical structure of these drugs and the prototypical structure of TRPV1 antagonists was found (Szallasi et al., 2007; Ambatkar and Khedekar, 2019), suggesting an indirect role of these drugs. Interestingly, although most CaM antagonists belong to the data-driven group 7 that is mainly detected using the BRET assays, 8 of the 12 aforementioned drugs belong to group 5, which is mainly identified based on ACA data (Fig. 8). No single technique detected all hits in a single HTS run. Our study, therefore, highlights the need for benefiting from the output of different HTS platforms coupled to a multiparametric analysis to optimize future ion-channel drug screening processes. In conclusion, based on a thorough bibliographic analysis of our results, both BRET probes 1) have proven to be as reliable as ACA or APC in identifying potential hits, 2) provide a very specific readout of ion channel activity, and 3) brought back to light the CaM-TRPV1 protein-protein interaction as a druggable target for TRPV1 inhibition. Since BRET biosensors are easy to use with a low cost of implementation and have shown their adaptability to various TRPs and non-TRPs ion channels (Figs. 9–11), they may advantageously be included in ion channel drug screening campaigns.

#### Acknowledgments

The authors thank Bernard Veyret for his wise advice and proof-reading of the manuscript.

#### Authorship Contributions

*Participated in research design:* Franchet, Percherancier.

*Conducted experiments:* Chappe, Michel, Joushomme, Barbeau, Pierredon, Baron, Garenne, Poullietier de Gannes, Hurtier.

*Performed data analysis:* Chappe, Michel, Barbeau, Pierredon, Garenne, Mayer, Lagroye, Quignard, Ducret, Compan, Franchet, Percherancier.

*Wrote or contributed to the writing of the manuscript:* Chappe, Michel, Lagroye, Quignard, Ducret, Compan, Franchet, Percherancier.

#### References

Abbas MA (2020) Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. *Chem Biol Interact* **330**:109178.  
 Abello JM, Pardalos PM, and Resende MGC, eds (2002) *Handbook of massive data sets*, Kluwer Academic, Dordrecht, London.  
 Ambatkar MP and Khedekar PB (2019) Quinoline as TRPV1 antagonists: A new approach against inflammation. *J Drug Deliv Ther* **9**:782–788.

Ambrosino P, Soldovieri MV, Di Zazzo E, Paventi G, Iannotti FA, Mosca I, Miceli F, Franco C, Canzoniero LMT, and Tagliatalata M (2019) Activation of Kv7 potassium channels inhibits intracellular  $Ca^{2+}$  increases triggered by TRPV1-mediated pain-inducing stimuli in F11 immortalized sensory neurons. *Int J Mol Sci* **20**:4322.  
 Ayoub MA (2016) Resonance energy transfer-based approaches to study GPCRs. *Methods Cell Biol* **132**:255–292.  
 Baecart J, Corbel C, Jockers R, Bach S, and Couturier C (2008) The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J* **3**:311–324.  
 Bagal SK, Marron BE, Owen RM, Storer RI, and Swain NA (2015) Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. *Channels (Austin)* **9**:360–366.  
 Bianchi BR, Lee C-H, Jarvis MF, El Kouhen R, Moreland RB, Faltynek CR, and Puttfarcken PS (2006) Modulation of human TRPV1 receptor activity by extracellular protons and host cell expression system. *Eur J Pharmacol* **537**:20–30.  
 Böding M, Wissenbach U, and Flockerzi V (2007) Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. *Cell Calcium* **42**:618–28.  
 Breitholtz M, Ivanov P, Ek K, and Gorokhova E (2020) Calmodulin inhibition as a mode of action of antifungal imidazole pharmaceuticals in non-target organisms. *Toxicol Res (Camb)* **9**:425–430.  
 Butelman ER, Harris TJ, and Kreek MJ (2004) Antiallodynic effects of loperamide and fentanyl against topical capsaicin-induced allodynia in unanesthetized primates. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:155–163.  
 Butts A, DiDone L, Koselny K, Baxter BK, Chabrier-Rosello Y, Wellington M, and Krysan DJ (2013) A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis. *Eukaryot Cell* **12**:273–287.  
 Caldireola P, Mannhold R, and Timmerman H (1992) Overview: calmodulin and calmodulin-antagonists. *Current Opinion on Therapeutic Patents* **2**:1889–1917.  
 Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, and Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**:816–824.  
 Chandra KS and Ramesh G (2013) The fourth-generation calcium channel blocker: cildinipine. *Indian Heart J* **65**:691–695.  
 Charrad M, Ghazzali N, Boiteau V, and Niknafs A (2014) NbClust: an R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *J Stat Softw* **61**:1–36.  
 Chen S-C, Chang T-J, and Wu F-S (2004) Competitive inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by dehydroepiandrosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:529–536.  
 Clare JJ (2010) Targeting ion channels for drug discovery. *Discov Med* **9**:253–260.  
 de Boer M (2020) The relation between intrinsic protein conformational changes and ligand binding. *Biophysics (Oxf)*.  
 De-la-Rosa V, Rangel-Yescas GE, Ladrón-de-Guevara E, Rosenbaum T, and Islas LD (2013) Coarse architecture of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel determined by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **288**:29506–29517.  
 Gasser R, Köppel H, Moosbrugger B, Esche G, Salzer M, Gasser S, and Holzmann S (2003) Indiscriminate effects of repaglinide and other specific modulators of transmembrane KATP-channel gating properties upon ischaemic/hypoxic bovine coronary artery smooth muscle relaxation. *Journal of Clinical and Basic Cardiology* **6**:81–85.  
 Gavva NR, Bannan AW, Hovland Jr DN, Lehto SG, Klionsky L, Surapaneni S, Immke DC, Henley C, Arik L, Bak A, et al. (2007a) Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. *J Pharmacol Exp Ther* **323**:128–137.  
 Gavva NR, Bannan AW, Surapaneni S, Hovland Jr DN, Lehto SG, Gore A, Juan T, Deng H, Han B, Klionsky L, et al. (2007b) The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* **27**:3366–3374.  
 Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, Wang J, Zhu D, Vanderah TW, Porreca F, et al. (2005) AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:474–484.  
 Global data (2020) GlobalData's Pharma Intelligence Center Drug Sales and Forecast Database.  
 Guinamard R, Simard C, and Del Negro C (2013) Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacol Ther* **138**:272–284.  
 Gunthorpe MJ, Rami HK, Jerman JC, Smart D, Gill CH, Soffin EM, Luis Hannan S, Lappin SC, Egerton J, Smith GD, et al. (2004) Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology* **46**:133–149.  
 Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B, and Bouvier M (2006) Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci Chapter* **5**:5–23.  
 Hasan R, Leeson-Payne ATS, Jaggard JH, and Zhang X (2017) Calmodulin is responsible for  $Ca^{2+}$ -dependent regulation of TRPA1 channels. *Sci Rep* **7**:45098.  
 Hatano N, Suzuki H, Muraki Y, and Muraki K (2013) Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the antirheumatic drug auranofin. *Am J Physiol Cell Physiol* **304**:C354–C361.  
 Hegemann L, Toso SM, Lahijani KI, Webster GF, and Uitto J (1993) Direct interaction of antifungal azole-derivatives with calmodulin: a possible mechanism for their therapeutic activity. *J Invest Dermatol* **100**:343–346.  
 Hu H, Tian J, Zhu Y, Wang C, Xiao R, Herz JM, Wood JD, and Zhu MX (2010) Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *PLoS Arch* **4**:59–592.  
 Jetter MC, Youngman MA, McNally JJ, McDonnell ME, Zhang S-P, Dubin AE, Nasser N, Codd EE, Flores CM, and Dax SL (2007) Heteroaryl beta-tetralin ureas as novel antagonists of human TRPV1. *Bioorg Med Chem Lett* **17**:6160–6163.  
 Jin M, Wu Z, Chen L, Jaimes J, Collins D, Walters ET, and O'Neil RG (2011) Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS One* **6**:e16713.

- Johnson JD and Wittenauer LA (1983) A fluorescent calmodulin that reports the binding of hydrophobic inhibitory ligands. *Biochem J* **211**:473–479.
- Kaczorowski GJ, McManus OB, Priest BT, and Garcia ML (2008) Ion channels as drug targets: the next GPCRs. *J Gen Physiol* **131**:399–405.
- Kassambara A, and Mundt F (2020) *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses*.
- Kirkton RD and Bursac N (2011) Engineering biosynthetic excitable tissues from unexcitable cells for electrophysiological and cell therapy studies. *Nat Commun* **2**:300.
- Kocan M and Pflieger KDG (2011) Study of GPCR-protein interactions by BRET. *Methods Mol Biol* **746**:357–371 United States.
- Krishnan V, Baskaran P, and Thyagarajan B (2019) Troglitazone activates TRPV1 and causes deacetylation of PPAR $\gamma$  in 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**:445–453.
- Lau S-YY, Procko E, and Gaudet R (2012) Distinct properties of Ca $^{2+}$ -calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *J Gen Physiol* **140**:541–555.
- Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, and Gaudet R (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**:905–918.
- Lu Y-C, Yang J, Ding G-L, Shi S, Zhang D, Jin L, Pan J-X, Lin X-H, Zhu Y-M, Sheng J-Z, et al. (2014) Small-conductance, calcium-activated potassium channel 3 (SK3) is a modulator of endometrial remodeling during endometrial growth. *J Clin Endocrinol Metab* **99**:3800–3810.
- Lübker C and Seifert R (2015) Effects of 39 compounds on calmodulin-regulated adenylyl cyclases AC1 and Bacillus anthracis edema factor. *PLoS One* **10**:e0124017.
- Majeed Y, Bahmani Y, Seymour VAL, Wilson LA, Milligan CJ, Agarwal AK, Sukumar P, Naylor J, and Beech DJ (2011) Rapid and contrasting effects of rosiglitazone on transient receptor potential TRPM3 and TRPC5 channels. *Mol Pharmacol* **79**:1023–1030.
- Mannhold R, Kramer A, Schäfer W, and Schramm P (1987) CaM-inhibitory actions of Ca antagonists. *Arch Pharm (Weinheim)* **320**:683–692.
- Matta JA and Ahern GP (2007) Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol* **585**:469–482.
- McGivern JG and Ding M (2020) Ion channels and relevant drug screening approaches. *SLAS Discov* **25**:413–419.
- Merritt JE, Brown BL, and Tomlinson S (1982) Loperamide and calmodulin. *Lancet* **1**:283.
- Meseguer V, Karashima Y, Talavera K, D'Hoedt D, Donovan-Rodríguez T, Viana F, Nilius B, and Voets T (2008) Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *J Neurosci* **28**:576–586.
- Messegueur A, Planells-Cases R, and Ferrer-Montiel A (2006) *Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor*. CN 4:1–15.
- Micheli D, Colloidal A, Semeraro C, Gaviraghi G, and Carpi C (1990) Lacidipine: a calcium antagonist with potent and long-lasting antihypertensive effects in animal studies. *J Cardiovasc Pharmacol* **15**:666–675.
- Miyawaki A, and Niino Y (2015) Molecular spies for bioimaging—fluorescent protein-based probes. *Molecular cell* **58**:632–43.
- Montero M, Alvarez J, and Garcia-Sancho J (1991) Agonist-induced Ca $^{2+}$  influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. *Biochem J* **277**:73–79.
- Negri S, Faris P, Rosti V, Antognazza MR, Lodola F, and Moccia F (2020) Endothelial TRPV1 as an emerging molecular target to promote therapeutic angiogenesis. *Cells* **9**:1341.
- Nesuashvili L, Hadley SH, Bahia PK, and Taylor-Clark TE (2013) Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction activates airway sensory nerves via transient receptor potential (TRP) channels. *Mol Pharmacol* **83**:1007–1019.
- Norman JA, Ansell J, Stone GA, Wennogle LP, and Wasley JW (1987) CGS 9343B, a novel, potent, and selective inhibitor of calmodulin activity. *Mol Pharmacol* **31**:535–540.
- North RA and Surprenant A (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:563–580.
- Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, and Tominaga M (2003) Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:8002–8006.
- Obergrussberger A, Goetze TA, Brinkwirth N, Becker N, Friis S, Rapedius M, Haarmann C, Rinke-Weiß I, Stölzle-Feix S, Brüggemann A, et al. (2018) An update on the advancing high-throughput screening techniques for patch clamp-based ion channel screens: implications for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **13**:269–277.
- Okada M, Takezawa D, Tachibana S, Kawamura S, Tokumitsu H, and Kobayashi R (2003) Neuronal calcium sensor proteins are direct targets of the insulinotropic agent repaglinide. *Biochem J* **375**:87–97.
- Oláh Z, Jósavay K, Pecze L, Letoha T, Babai N, Budai D, Otvös F, Szalma S, and Vizler C (2007) Anti-calmodulins and tricyclic adjuvants in pain therapy block the TRPV1 channel. *PLoS One* **2**:e545.
- Papakosta M, Dalle C, Haythornthwaite A, Cao L, Stevens EB, Burgess G, Russell R, Cox PJ, Phillips SC, and Grimm C (2011) The chimeric approach reveals that differences in the TRPV1 pore domain determine species-specific sensitivity to block of heat activation. *J Biol Chem* **286**:39663–39672.
- Percherancier Y, Germain-Desprez D, Galisson F, Mascle XH, Dianoux L, Estéphan P, Chelbi-Alix MK, and Aubry M (2009) Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells. *J Biol Chem* **284**:16595–16608.
- Pflieger KDG, Seeber RM, and Eidne KA (2006) Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc* **1**:337–345.
- Ponce A, Castillo A, Hinojosa L, Martínez-Rendon J, and Cerejido M (2018) The expression of endogenous voltage-gated potassium channels in HEK293 cells is affected by culture conditions. *Physiol Rep* **6**:e13663.
- Pope L, Arrigoni C, Lou H, Bryant C, Gallardo-Godoy A, Renslo AR, and Minor Jr DL (2018) Protein and chemical determinants of BL-1249 action and selectivity for K $_{2P}$  channels. *ACS Chem Neurosci* **9**:3153–3165.
- Premkumar LS, Agarwal S, and Steffen D (2002) Single-channel properties of native and cloned rat vanilloid receptors. *J Physiol* **545**:107–117.
- Priest BT, Swensen AM, and McManus OB (2007) Automated electrophysiology in drug discovery. *Curr Pharm Des* **13**:2325–2337.
- Prozialek WC and Weiss B (1982) Inhibition of calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther* **222**:509–516.
- R Core Team (2020) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ralevic V, Kendall DA, Jerman JC, Middlemiss DN, and Smart D (2001) Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* **424**:211–219.
- Rani N, Sharma A, Gupta GK, and Singh R (2013) Imidazoles as potential antifungal agents: a review. *Mini Rev Med Chem* **13**:1626–1655.
- Reynolds CH and Claxton PTJ (1982) Inhibition of calmodulin-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase: multiple binding-sites for tricyclic drugs on calmodulin. *Biochem Pharmacol* **31**:419–421.
- Robertson DN, Sleno R, Nagi K, Pétrin D, Hébert TE, and Pineyro G (2016) Design and construction of conformational biosensors to monitor ion channel activation: A prototype FAsH/BRET-approach to Kir3 channels. *Methods* **92**:19–35.
- Rochette-Egly C, Boschetti E, Bassot P, and Egly JM (1982) Interactions between calmodulin and immobilized phenothiazines. *J Chromatogr A* **241**:333–344.
- Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, and Gordon SE (2004) Ca $^{2+}$ /calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* **123**:53–62.
- Ruigrok HJ, Shahid G, Goudeau B, Poullietier de Gannes F, Poque-Haro E, Hurtier A, Lagroye I, Vacher P, Arbault S, Sojic N, et al. (2017) Full-spectral multiplexing of bioluminescence resonance energy transfer in three TRPV channels. *Biophys J* **112**:87–98.
- Sadofsky LR, Campi B, Trevisani M, Compton SJ, and Morice AH (2008) Transient receptor potential vanilloid-1-mediated calcium responses are inhibited by the alkylamine antihistamines dexbrompheniramine and chlorpheniramine. *Exp Lung Res* **34**:681–693.
- Saha S, Ghosh A, Tiwari N, Kumar A, Kumar A, and Goswami C (2017) Preferential selection of arginine at the lipid-water-interface of TRPV1 during vertebrate evolution correlates with its snorkeling behaviour and cholesterol interaction. *Sci Rep* **7**:16808.
- Sanguinetti MC, Scott AL, Zingaro GJ, and Siegl PK (1988) BRL 34915 (cromakalim) activates ATP-sensitive K $^{+}$  current in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:8360–8364.
- Schaeffer P, Luginer C, Follenius-Wund A, Gerard D, and Stoclet J-C (1987) Comparative effects of calmodulin inhibitors on calmodulin's hydrophobic sites and on the activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin. *Biochem Pharmacol* **36**:1989–1996.
- Schann S, Bouvier M, and Neuville P (2013) Technology combination to address GPCR allosteric modulator drug-discovery pitfalls. *Drug Discov Today Technol* **10**:e261–e267.
- Stanford KR, Hadley SH, Barannikov I, Ajmo JM, Bahia PK, and Taylor-Clark TE (2019) Antimycin A-induced mitochondrial dysfunction activates vagal sensory neurons via ROS-dependent activation of TRPA1 and ROS-independent activation of TRPV1. *Brain Res* **1715**:94–105.
- Su K-H, Lin S-J, Wei J, Lee K-I, Zhao J-F, Shyue S-K, and Lee T-S (2014) The essential role of transient receptor potential vanilloid 1 in simvastatin-induced activation of endothelial nitric oxide synthase and angiogenesis. *Acta Physiol (Oxf)* **212**:191–204.
- Swanson DM, Dubin AE, Shah C, Nasser N, Chang L, Dax SL, Jetter M, Breitenbucher JG, Liu C, Mazur C, et al. (2005) Identification and biological evaluation of 4-(3-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazine-1-carboxylic acid (5-trifluoromethylpyridin-2-yl)amide, a high affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist. *J Med Chem* **48**:1857–1872.
- Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, and Eid SR (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* **6**:357–372.
- Tafesse L, Kanemasa T, Kurose N, Yu J, Asaki T, Wu G, Iwamoto Y, Yamaguchi Y, Ni C, Engel J, et al. (2014) Structure-activity relationship studies and discovery of a potent transient receptor potential vanilloid (TRPV1) antagonist 4-[3-chloro-5-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-2-pyridyl]-N-[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyl]-3,6-dihydro-2H-pyridine-1-carboxamide (V116517) as a clinical candidate for pain management. *J Med Chem* **57**:6781–6794.
- Terstappen GC, Roncarati R, Dunlop J, and Peri R (2010) Screening technologies for ion channel drug discovery. *Future Med Chem* **2**:715–730.
- Thorneoel KS, Sulpizio AC, Lin Z, Figueroa DJ, Clouse AK, McCafferty GP, Chendrimada TP, Lashinger ES, Gordon E, and Evans L (2008) N-[(1S)-1-[4-(2S)-2-[(2, 4-dichlorophenyl) sulfonyl] amino]-3-hydroxypropanoyl]-1-piperazinyl] carbonyl]-3-methylbutyl-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *J Pharmacol Exp Ther* **326**:432–442.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, and Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**:531–543.
- Volpi M, Sha'afi RI, Epstein PM, Andrenyak DM, and Feinstein MB (1981) Local anesthetics, mepacrine, and propranolol are antagonists of calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:795–799.
- Wickenden A, Priest B, and Erdemli G (2012) Ion channel drug discovery: challenges and future directions. *Future Med Chem* **4**:661–679.
- Wickham H (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer-Verlag New York.
- Wickham H, François R, Henry L, and Müller K (2020) *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*.

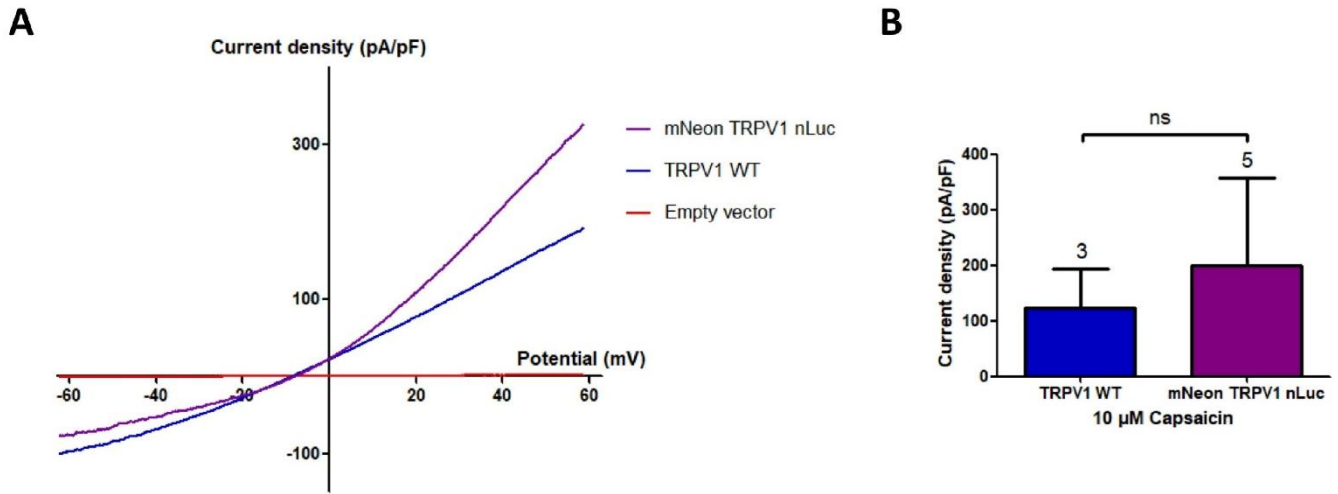
- Wilson C, Coldwell MC, Howlett DR, Cooper SM, and Hamilton TC (1988) Comparative effects of K<sup>+</sup> channel blockade on the vasorelaxant activity of cromakalim, pinacidil and nicorandil. *Eur J Pharmacol* **152**:331–339.
- Winter J, Dray A, Wood JN, Yeats JC, and Bevan S (1990) Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res* **520**:131–140.
- Xin HB and Zhang BH (1993) Inhibitory effects of cyproheptadine on calmodulin activated Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of rabbit erythrocyte membranes. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **14** (Suppl):S5–S7.
- Yazgan Y and Nażroglu M (2017) Ovariectomy-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and calcium ion influx through TRPA1, TRPM2, and TRPV1 are prevented by 17 $\beta$ -estradiol, tamoxifen, and raloxifene in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Mol Neurobiol* **54**:7620–7638.
- Yu HB, Li M, Wang WP, and Wang XL (2016) High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacol Sin* **37**:34–43.
- Zhang JH, Chung TD, and Oldenburg KR (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high-throughput screening assays. *J Biomol Screen* **4**:67–73.

---

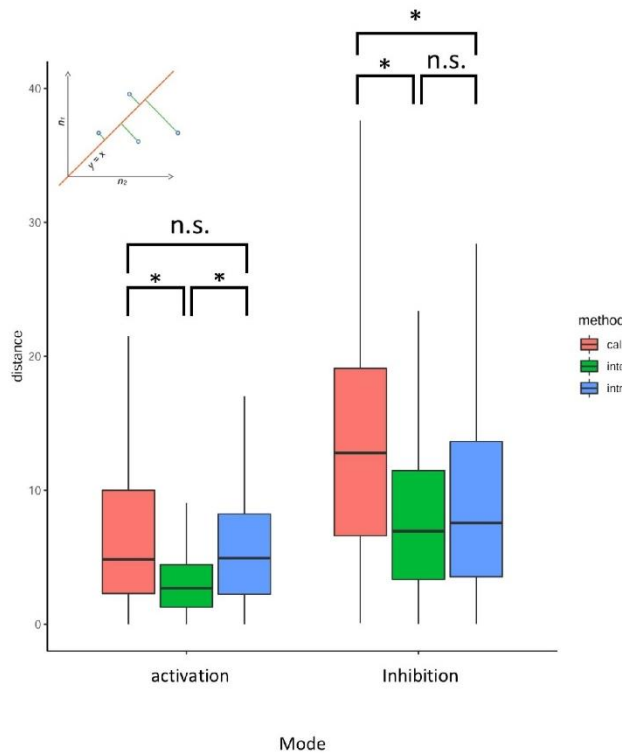
**Address correspondence to:** Yann Percherancier, Laboratoire IMS/UMR5218, Université de Bordeaux I – Bat. A31, 351 av de la liberation, F-33400 Talence, France. E-mail: yann.percherancier@ims-bordeaux.fr

---

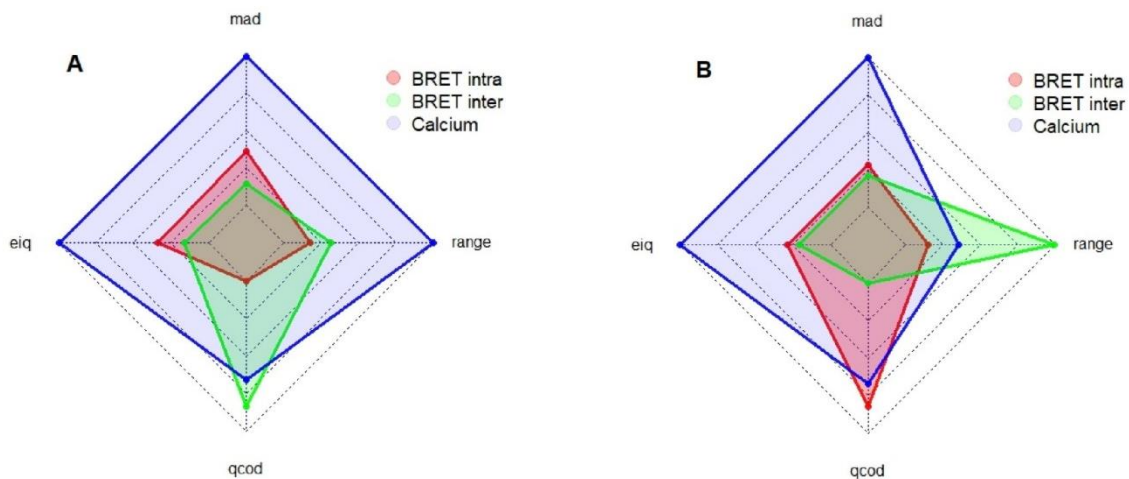




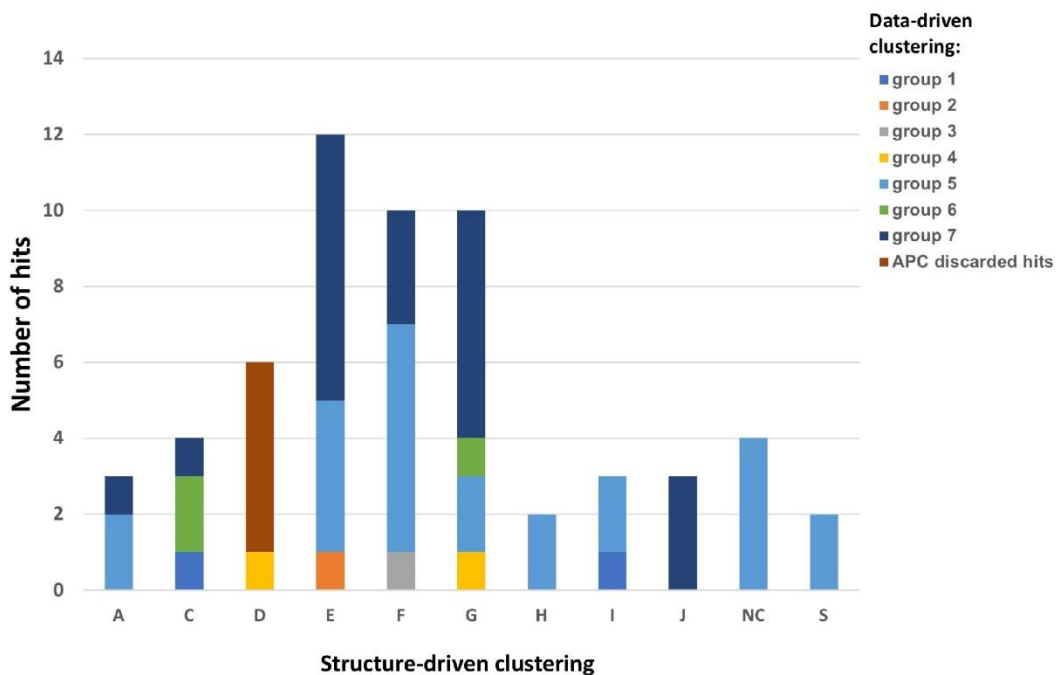
**Supplementary Figure 1:** Capsaicin-induced activation of TRPV1 current. (A) Whole-cell patch-clamp recording showing the representative trace of 10  $\mu$ M Capsaicin-activated current elicited by 650 ms voltage ramps from -60 to +60 mV in HEK293T cells transfected with empty vector, TRPV1 WT or mNeonGreen-TRPV1- nLuc. The holding potential was -60 mV. Currents were normalized to cell capacitance for each cell and are expressed as pA/pF. (B) Summary data for capsaicin-induced mean current densities at +60 mV recorded in cells transfected with the different constructions. Data are expressed as mean value  $\pm$  S.D. and  $3 < n < 5$ . Mann-Whitney test was performed to compare the TRPV1 WT and mNeonGreen-TRPV1-nLuc currents.



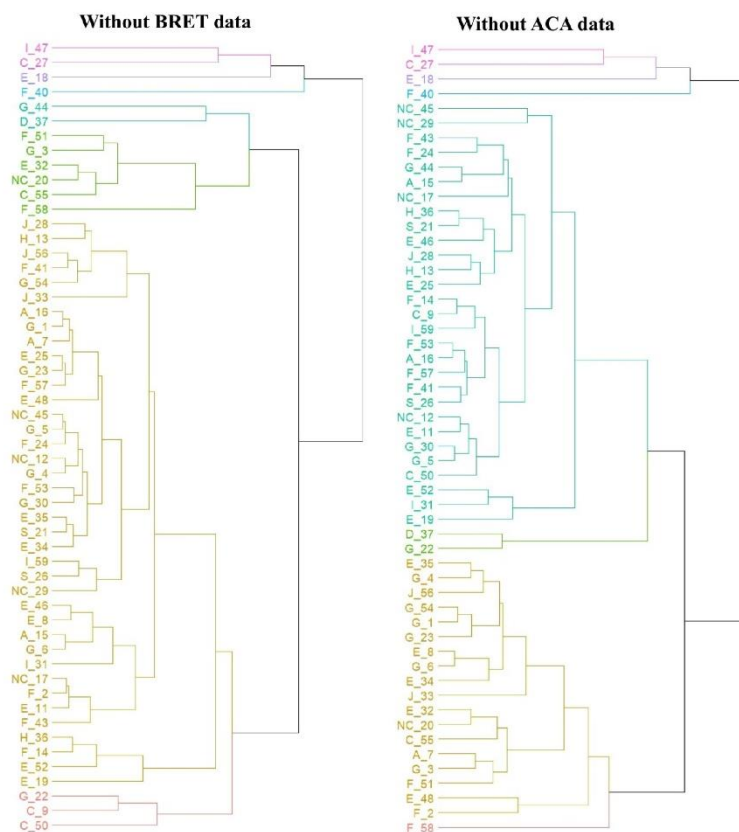
**Supplementary Figure 2:** The distance from each point to the  $y=x$  equation line was computed as shown on the inset for each method (intramolecular, intermolecular, and calcium assays) and both for agonist and antagonist conditions (complete data are shown in figure 4 G-H-I and figure 5 G-H-I). The smaller is the distance (greens line), the higher is the reproducibility between  $n_1$  and  $n_2$  assays. Statistical significance between the different conditions were analysed using a Kruskal-Wallis and Conover post-hoc tests, \*: p-value  $< 5\%$ , n.s.: not significant).



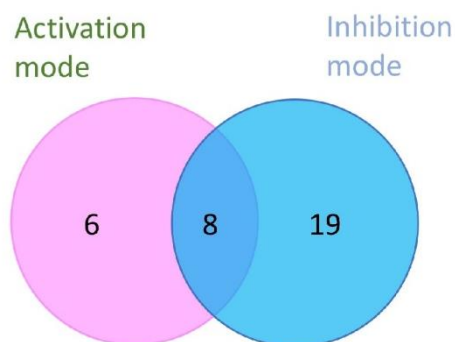
**Supplementary Figure 3:** Four measures frequently used to evaluate dispersion were computed: the median absolute deviation (mad), the difference between the largest and smallest values (range), the quartile coefficient of dispersion (qcod), and the interquartile range (iqr). The higher these metrics, the larger the data dispersion. Data were pooled (n1 and n2) in the 2 different assays conditions: (A) agonist and (B) antagonist. The four metrics were computed, normalized, and plotted on radar charts.



**Supplementary Figure 4:** Number of hits detected within each data-driven group as a function of structure-driven clusters.



**Supplementary Figure 5:** Data-driven hierarchical clustering of the effect of the hit compounds performed without the BRET data (left panel) or ACA data (right panel).



**Supplementary Figure 6:** Venn diagram of the hits detected with the automated Calcium-flux assay in the activation and the inhibition mode.

### 3.1.3. Les sondes BRET encodées génétiquement mettent en lumière la variation de sélectivité ionique induite par le biais de ligand pour TRPV1 et P2X5/7

Cet article, publié dans PNAS, est actuellement sous embargo.

## 3.2. Piezo1 dans l'HTP

### 3.2.1. Contexte

Parmi les SAC exprimés au niveau vasculaire, Piezo1 est un canal exprimé dans les artères pulmonaires à la fois au niveau des CE et des CML. L'activation de Piezo1 induit un influx calcique qui favorise la vasoconstriction dans les CML [98] et la vasorelaxation dans les CE [95]. Cette relaxation a lieu grâce à la production de NO par les CE. Cependant, l'implication de Piezo1 dans la régulation de la balance entre les voies de signalisation favorisant la contraction et celles favorisant la relaxation et leur dérégulation lors du développement de l'HTP sont encore à élucider. Le but de cette étude était de déterminer le rôle de Piezo1 dans le développement de l'HTP sur un modèle de rats hypoxiques chroniques au cours de la mise en place de la pathologie (à 1 semaine) et lorsque celle-ci est installée (à 3 semaines). L'expression de Piezo1 dans les CE et CML a été mise en évidence par immunofluorescence, et son activité a été évaluée grâce à des mesures de contraction sur des artères intrapulmonaires, ainsi que de courants, signaux calciques et potentiels transmembranaires sur des CE et CML. Enfin, la régulation de la voie de signalisation Akt-eNOS a été étudiée par Western blot. Ces résultats ont été publiés dans Cells en juillet 2022 : *Piezo1 channel activation reverses pulmonary artery vasoconstriction in an early rat model of pulmonary hypertension: the role of Ca<sup>2+</sup> influx and Akt-eNOS pathway* [141], et sont présentés ci-dessous sous forme d'article.





Ce travail s'inscrit dans la continuité des stages de Master que j'avais réalisés dans l'équipe avec le Pr Jean-François Quignard sur le rôle des canaux Piezo1 dans les AIP de rats au cours de l'HTP. J'ai notamment participé à la mesure des rapports de Fulton (Figure 1) et réalisé les marquages par immunofluorescence sur les coupes d'AIP (Figure 2).

### 3.2.2. L'activation du canal Piezo1 s'oppose à la vasoconstriction des artères pulmonaires dans un modèle de rat à un stade précoce de développement de l'HTP : le rôle de l'influx Ca<sup>2+</sup> et de la voie Akt-eNOS



Article

# Piezo1 Channel Activation Reverses Pulmonary Artery Vasoconstriction in an Early Rat Model of Pulmonary Hypertension: The Role of Ca<sup>2+</sup> Influx and Akt-eNOS Pathway

Thais Porto Ribeiro <sup>1,2</sup> , Solène Barbeau <sup>1,2</sup>, Isabelle Baudrimont <sup>1,2</sup> , Pierre Vacher <sup>1,2</sup> ,  
Véronique Freund-Michel <sup>1,2</sup>, Guillaume Cardouat <sup>1,2</sup>, Patrick Berger <sup>1,2,3</sup>, Christelle Guibert <sup>1,2</sup> ,  
Thomas Ducret <sup>1,2</sup> and Jean-François Quignard <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Univ. Bordeaux, U1045, 33604 Pessac, France; thais.ribeiro@u-bordeaux.fr (T.P.R.); solene.barbeau@u-bordeaux.fr (S.B.); isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr (I.B.); pierre.vacher@inserm.fr (P.V.); veronique.michel@u-bordeaux.fr (V.F.-M.); guillaume.cardouat@u-bordeaux.fr (G.C.); patrick.berger@u-bordeaux.fr (P.B.); christelle.guibert@u-bordeaux.fr (C.G.); thomas.ducret@u-bordeaux.fr (T.D.)

<sup>2</sup> INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, 33604 Pessac, France

<sup>3</sup> CHU Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, 33604 Pessac, France

\* Correspondence: jean-francois.quignard@u-bordeaux.fr



**Citation:** Porto Ribeiro, T.; Barbeau, S.; Baudrimont, I.; Vacher, P.; Freund-Michel, V.; Cardouat, G.; Berger, P.; Guibert, C.; Ducret, T.; Quignard, J.-F. Piezo1 Channel Activation Reverses Pulmonary Artery Vasoconstriction in an Early Rat Model of Pulmonary Hypertension: The Role of Ca<sup>2+</sup> Influx and Akt-eNOS Pathway. *Cells* **2022**, *11*, 2349. <https://doi.org/10.3390/cells11152349>

Academic Editor: Yoshihiro Fukumoto

Received: 1 June 2022

Accepted: 26 July 2022

Published: 30 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In intrapulmonary arteries (IPAs), mechanical forces due to blood flow control vessel tone, and these forces change during pulmonary hypertension (PH). Piezo1, a stretch-activated calcium channel, is a sensor of mechanical stress present in both endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs). The present study investigated the role of Piezo1 on IPA in the chronic hypoxia model of PH. Rats were raised in chronically hypoxic conditions for 1 (1W-CH, early stage) or 3 weeks (3W-CH, late-stage) of PH or in normoxic conditions (Nx). Immunofluorescence labeling and patch-clamping revealed the presence of Piezo1 in both ECs and SMCs. The Piezo1 agonist, Yoda1, induced an IPA contraction in Nx and 3W-CH. Conversely, Yoda1 induced an endothelial nitric oxide (eNOS) dependent relaxation in 1W-CH. In ECs, the Yoda1-mediated intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) increase was greater in 1W-CH as compared to Nx. Yoda1 induced an EC hyperpolarization in 1W-CH. The eNOS levels were increased in 1W-CH IPA compared to Nx or 3W-CH PH and Yoda1 activated phosphorylation of Akt (Ser473) and eNOS (Ser1177). Thus, we demonstrated that endothelial Piezo1 contributes to intrapulmonary vascular relaxation by controlling endothelial [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, endothelial-dependent hyperpolarization, and Akt-eNOS pathway activation in the early stage of PH.

**Keywords:** Piezo channels; pulmonary artery; calcium signaling; eNOS; Akt

## 1. Introduction

Pulmonary circulation is a system with many unique features such as low pressure around 15 mmHg, high flow, and high compliance. Pulmonary hypertension (PH) is the main disease of the pulmonary circulation and is associated with increased mortality and decreased quality of life. It is characterized by an increase in vascular resistance and pressure (mean pulmonary arterial pressure >20 mmHg at rest) [1].

Circulating vasoactive factors and hypoxia can modulate the intrapulmonary artery (IPA) vascular tone. Chronic hypoxia (CH) increases pulmonary vascular resistance and contributes to vascular wall remodeling. This leads to an increase in the pulmonary arterial pressure, and later to right ventricle (RV) hypertrophy and, eventually, RV failure, which are hallmarks of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension (CH-PH) [2]. Molecular mechanisms of CH-PH include alteration of calcium signaling, oxidative stress,

and inflammation that collectively control the function, growth, and differentiation of pulmonary vascular cells.

PH associated with CH belongs to the third group of the PH classification according to the last World Symposium on Pulmonary Hypertension [3]. Despite considerable advances, the understanding of pathogenic mechanisms of CH-PH continues to be a challenge. For this proposal, the rat model submitted for the CH condition (10% O<sub>2</sub>) was used to improve the knowledge of the pathophysiological mechanisms and the development of dedicated treatments for CH-PH. In addition, this model allows for determining the time course of cellular changes and its correlation with vascular hyperreactivity and remodeling during the temporal development of the disease. Previous studies demonstrated that CH rats displayed an altered vascular function, an increase in RV systolic pressure, and RV hypertrophy following one week of CH. Then, the disease fully develops after 3 weeks of CH [4–6].

Among the various mechanisms contributing to the development of PH, it is well established that the disruption of the interplay between the pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) and pulmonary endothelial cells (PAECs) contributes to vascular dysfunction involving altered calcium homeostasis and abnormal expression or activity of Ca<sup>2+</sup> channels, including mechanosensitive channels [7]. Indeed, these channels may differently contribute to the development of the early (1 week of CH) or late (3 weeks) stage of CH-PH [8,9]. Hemodynamic forces (mechanical forces) activate vascular mechanosensitive calcium channels and a cascade of intracellular signaling mechanisms [10] that also modulate vascular tone. Evidence indicates that high blood flow on vascular cells leads to a change in cell membrane tension and vascular architecture, inducing the opening of mechanosensitive ion channels such as Piezo1 [11,12]. Piezo1 is a nonselective cation channel expressed in both PASMCs and PAECs and allows calcium influx into the cell in response to stretch or small molecules such as Yoda1 [13]. Recent studies showed that the high expression of Piezo1 and its associated increase in intracellular calcium in human PASMCs contributed to IPA vasoconstriction in PH [14]. We previously demonstrated that endothelial Piezo1 channels contributed to the endothelial-dependent relaxation of mouse IPA thanks to nitric oxide (NO) production [9]. However, endothelial Piezo1 deletion did not aggravate CH-PH. Although the interplay between PAECs and PASMCs regulated the vascular tone by mechanisms under the control of Ca<sup>2+</sup> influx through Piezo1, its contribution to the development of CH-PH is not clear yet.

The pulmonary vascular resistance in CH-PH is linked to a dysfunctional response to vasoconstrictive agents and a decrease in the release of relaxing factors by the endothelium (such as NO or endothelium-dependent hyperpolarization (EDH)) [15–18]. Mechanical stimuli exerted on the healthy PAECs produce endothelium-derived NO and, consequently, a reduction of vascular tension [9]. In this condition, the endothelial NO synthase (eNOS) can be activated by a calcium-dependent pathway. The increased intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) binds to calmodulin (CaM) and leads to the activation of the CaM-binding domain of eNOS to produce NO. In addition, the membrane stretch increases Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation of Akt (Ser473). Activation of the PI3K/Akt signaling pathway could stimulate eNOS by phosphorylation of the Ser1177 site [19,20]. However, the interplay of that signaling pathway and the Piezo1 channel is not completely understood during CH-PH.

This study aimed to determine the involvement of Piezo1 in the development of the disease in a rat model of CH-PH after 1 week (1W-CH) and 3 weeks (3W-CH) of CH and to compare the activity of Piezo1 channels in PASMCs and PAECs and their effect on calcium signaling, membrane potential, and the eNOS phosphorylation pathway.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

All animal experimental protocols in this study conformed to European directives and animal protection guidelines. The agreement (A33-063-907) was obtained from the French



authorities and all the protocols used were approved by the local Ethics Committee of the University of Bordeaux.

Male Wistar rats (Janvier laboratory; 200–300 g) were used for all studies. All animals were maintained on a 12:12 h light-dark cycle with free access to water or food. Rats were separated into three groups: the first group (normoxic rats, Nx) was housed in ambient room air. The second group (1W-CH rats), exposed to CH, was placed in a hypobaric chamber (50 kPa) for 1 week. The third group was maintained in the same CH conditions for 3 weeks (3W-CH). The chamber was opened three times a week for 30 min for animal care and cleaning.

### 2.2. Hemodynamic Measurement and Fulton's Index

The rats were intubated and mechanically ventilated with ambient air after being anesthetized with ketamine (60 mg/kg intraperitoneal (IP)) and xylazine (3 mg/kg IP). The right jugular vein was isolated and cannulated. Mean pulmonary pressure was determined by inserting a catheter with fluid-filled force transducers into the vein, and then it was pushed into the RV and into the pulmonary artery as described previously [21].

All animals were euthanized (isoflurane 5% 10 min or anesthetized with ketamine + xylazine if the hemodynamic measurement was performed before) and thoracotomy was performed. The heart and lungs were removed and placed in a perfused, cold physiological Mac solution (Composition of the Mac salt solution (mM): NaCl 119; KCl 5; CaCl<sub>2</sub> 2; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 10; and glucose 5.5, pH = 7.4). The IPAs from the right and left lungs were dissected and used in vascular studies. After removal of the arteries, the RV and left ventricle plus septum (LV + S) were separated. The Fulton index was calculated as  $RV / (LV + S)$  weight.

### 2.3. Vascular Reactivity on IPAs from Rats

Experiments were performed in normoxic (Nx) conditions or after exposition to hypoxia for 1 week or 3 weeks. Rat IPA rings (length 5 mm) were dissected from the lung. IPA rings were mounted in organ baths of a computerized, isolated organ bath system (EMKA, Paris, France) containing a Krebs solution (in mM: NaCl 113, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1, and glucose 11) bubbled with 20% O<sub>2</sub> (Nx condition) or 10% O<sub>2</sub> (CH condition). Isometric tension was recorded in IPA rings to record a contraction. IPA rings from Nx and CH rats were set at optimal length by equilibration against a passive load of 0.9 g (Nx condition) or 1.2 g (CH condition) for 1 hour. A high potassium solution (KCl 80 mM) was applied to obtain a reference contraction.

In the first protocol, the changes in isometric tension were recorded following Yoda1 (1–20 μM) administration. In a second protocol, phenylephrine (10 μM) contractions were elicited and then Yoda1 was applied. The Ca<sup>2+</sup>-free solution was made with the Krebs solution without calcium and with 1 mM EGTA. Values (at the maximum relaxation or contraction) were expressed as a percentage of the initial KCl 80 mM-induced contraction. Contractile response to KCl 80 mM was not significantly different in Nx vs. CH conditions as reported previously [8].

### 2.4. Isolation of PSMCs or PAECs from Rat IPAs

Freshly isolated PSMCs or PAECs from IPAs of Nx or CH rats were obtained using an enzymatic dissociation method. IPAs of the first and second orders were dissected, free from surrounding connective tissues under binocular control in sterile conditions. The IPA was placed successively, first in a Mac solution without calcium for 15 min at room temperature, then in a dissociation solution at 37 °C containing Mac plus 0.5 mg/mL papain, 0.9 mg/mL collagenase type II and 0.3 mM dithiothreitol for 30 min. The IPA was put back and replaced in the Mac solution for 5 min and was gently agitated (3 to 10 times only) using a polished wide-bore Pasteur pipette to release the cells.

The dissociated cells (PSMCs + PAECs) were seeded on round glass coverslips or in Petri dishes in a culture medium (DMEM with 10% fetal bovine serum). Cells were used

within the next 24 h. PAECs were easily recognizable because they were in the form of a sheet of 10–20 cells. These sheets of PAECs were confirmed by positive immunostaining with fluorescent oxLDL (Sigma-Aldrich, Paris, France). To obtain only PSMCs, IPA without endothelium (mechanical abrasion) was enzymatically dissociated as described before. Smooth muscle isolated cells were confirmed by positive immunostaining with an anti- $\alpha$ -smooth muscle actin antibody (Sigma-Aldrich, Paris, France).

#### 2.5. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and Transmembrane Potential in PAECs and PSMCs

PSMCs and PAECs were incubated with a 2  $\mu$ M Cal520 fluorescent probe for 30 min at 37 °C in a Mac solution for measurement of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in real-time fluorescence by confocal microscopy (NIKON) (excitation  $\lambda$ : 488 nm, emission  $\lambda$ : 515 nm). To measure membrane potential, cells were incubated with a red fluorescent probe, FLIPR, as described by the manufacturer (Molecular Device, Paris, France) (image acquisition frequency 0.25 Hz, excitation wavelengths: 561 nm, emission wavelengths: 605 nm). Regions of interest were drawn around each cell to detect cellular fluorescence variations. Results are expressed as the ratio of fluorescence (maximum fluorescence divided by initial fluorescence F/F<sub>0</sub>).

#### 2.6. Electrophysiological Recording

To record currents in response to Yoda1, we used a patch-clamp setup. Briefly, the whole-cell configuration was used with a pipette backfilled with physiological salt solution (Composition of the salt solution (mM): CsCl, 140; EGTA, 1; ATP, 1; HEPES, 10 (pH = 7.3), and cells were bathed in a Mac solution. The holding potential was -65 mV and the cells were depolarized to 65 mV thanks to a ramp depolarization of 500 ms every 10s. The electrodes were pulled on a PC-10 puller (Narishige, Tokyo, Japan) in two stages from borosilicate glass capillaries (1.5 mm OD, 1.16 mm ID, Harvard Apparatus, Saint-Laurent, Canada). The pipettes had a mean resistance of 4–5 M $\Omega$ . Cells were viewed under phase contrast with a Nikon Diaphot inverted microscope (NIKON corporation, Tokyo, Japan).

An RK 400 patch amplifier (Biologic, Paris, France) was used for current recordings. Stimulus control, data acquisition, and processing were carried out on a computer fitted with a Digidata 1200 interface (Axon Instruments, NY, USA), using the pCLAMP v.10 software. Current records were filtered with a Bessel filter at 1 kHz and digitized at 4 kHz for storage and analysis. Data were analyzed using version 9 of the pCLAMP computer software (Axon Instruments / Molecular Devices Corp, San Jose, CA, USA).

#### 2.7. Western Blot Analysis

IPA tissues from Nx or CH rats were removed and stored at -80 °C. Tissues ( $n = 6$ ) were macerated and homogenized in cold lysis buffer and were ultrasonicated in the same buffer (RIPA buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors). The remaining solution was centrifuged at 4 °C for 15 min at 4000 $\times g$  to pellets cell debris. The supernatant was collected as cytosolic proteins to measure the protein concentrations using a Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The proteins (30  $\mu$ g) were then reduced with  $\beta$ -mercaptoethanol, subjected to electrophoresis on a 10% acrylamide reducing gel, and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membrane was blocked for 2 h at room temperature with bovine serum albumin (5%), and then incubated at 4 °C overnight with the following primary antibodies: mouse anti-rat eNOS (1:5000) (BD Transduction ref. 610297), rabbit anti-rat Akt (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., UK, ref. sc-8312), pAkt (Ser473; 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., UK, ref. sc-7985-R), rabbit anti-peNOS (Ser1177; 1:1000) (Cell Signalling Technology, Paris, France, ref. 9571).

The proteins were detected using secondary antibodies conjugated with IgG peroxidase (1:10,000) (Thermo Scientific, Illkirch, France) and exposed using the ChemiDoc XRS system. Images were obtained with Image Lab software (Bio-Rad Laboratories). The intensity of immunoreactive protein bands was quantified using densitometry with the Bio-Rad Image Lab software v.6.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).



### 2.8. Immunostaining

For “en face” staining (whole vessel), all IPAs from rats were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min [22]. After two washes in phosphate-buffered saline (PBS) solution, the IPA has then incubated overnight in PBS solution with 4% BSA and 0.1% Tween-20 with the primary antibody (Piezo1 Proteintech 15939-1-AP, dilution 1:200). The next day, the IPA was washed four times in PBS solution and then incubated at 37 °C for 3 h with the Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit antibody (dilution 1:500). After two washes in PBS solution, nuclei were stained in blue with Hoechst 33342 for 10 min (1 µg/mL; Invitrogen). The IPA was then longitudinally opened and observed under a Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning inverted microscope using a Nikon Plan Apo x60/1.4NA oil immersion objective (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). The IPA was put in front of the objective lens with the endothelial layer toward the objective. Fluorescent images were acquired and analyzed using the Nikon EZC1 software. In “en face” staining, nuclei, labeled in blue with Hoechst 33342, have a spindle form in smooth muscle cells and were rounder in endothelial cells.

For the cross-section, fixed IPAs were embedded in OCT solution and then the frozen IPAs were cut (thickness 15 µm) with a cryostat (Leica, Stuttgart, Germany). Immunostaining was then performed for “en face” staining.

### 2.9. Drugs

All pharmacological agents (phenylephrine, carbachol, L-NAME, Yoda1, gadolinium, thapsigargin, nifedipine, acetylcholine), DMEM, and serum were purchased from Sigma-Aldrich (Paris, France). Enzymes (papain and collagenase) were from Worthington Laboratory (Worthington Biochemical Corp. Lakewood, New Jersey, USA). Drug concentrations were chosen according to their pharmacological properties (affinity and selectivity) described in the literature.

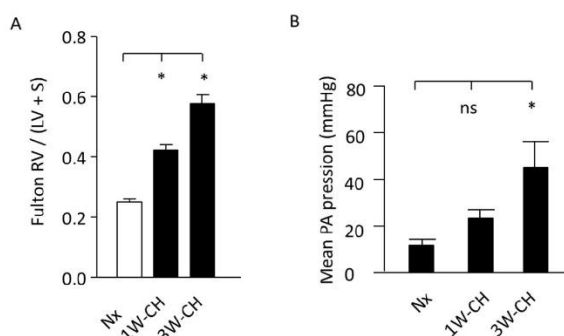
### 2.10. Data Analysis

Data were expressed as mean ± SEM of *n* experiments. Statistical evaluation was performed by the non-parametric test (Mann–Whitney for two groups or Kruskal–Wallis for more than two groups). Values were considered statistically significant when *p* < 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Increase in Mean Pulmonary Artery Pressure (mPAP) and Right Ventricular Hypertrophy Induced by CH

The right cardiac hypertrophy due to PH was measured by the Fulton index (Figure 1A). Hearts from rats submitted to hypoxia presented RV hypertrophy, as evidenced by a significant increase in the Fulton index (RV/(LV + S) weight) at 1W-CH and 3W-CH compared to the control Nx.

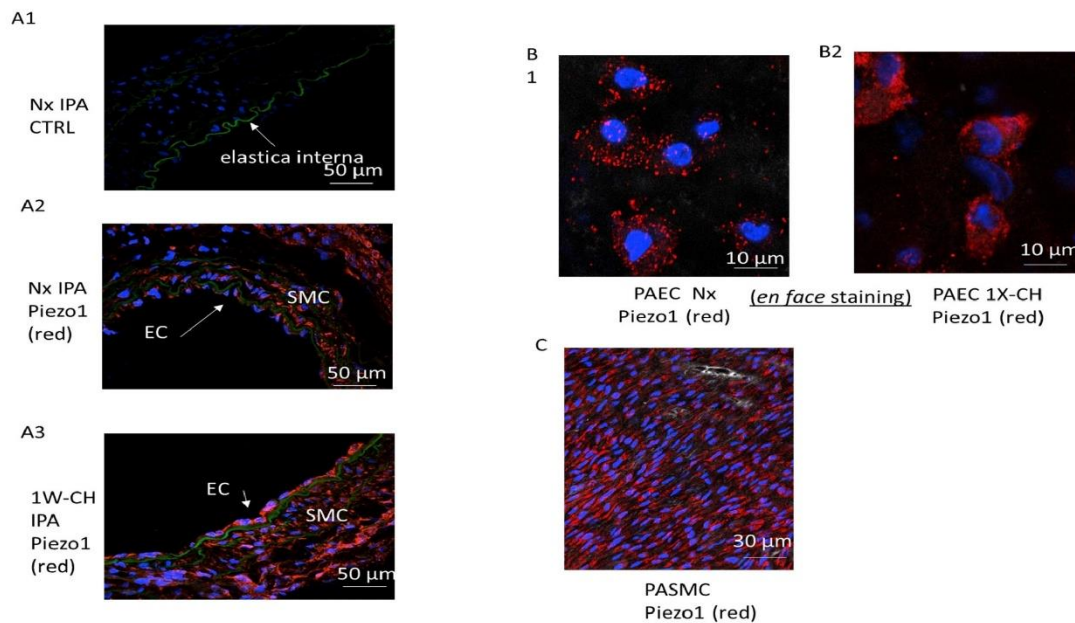


**Figure 1.** Increase in mean pulmonary artery pressure (mPAP) and RV hypertrophy. (A) Fulton index, a cardiac PH marker in normoxic (Nx) or in CH conditions. *n* = 20. (B) Pressure (mean pulmonary artery pressure) increased in CH condition, regardless of time. (\*) *p* < 0.05; (ns) *p* > 0.05.

In hemodynamic measurements, the rats exposed to 3W-CH developed PH with a significant increase in mPAP when compared to the control Nx or 1W-CH (Figure 1B). These results indicate that CH-PH hallmarks increase from the first to the third week, suggesting the significant differences in the development of the early stage (1W-CH) compared to the late stage (3W-CH). This evidence reveals a major interest in understanding the role of Piezo1 in the development of early-stage CH-PH.

### 3.2. Piezo1 Channels Are Expressed in PAECs and PSMCs in an Early Stage of CH-PH

To identify the role of Piezo1 in an early stage of CH-PH, we used two different fluorescence-based technologies to study Piezo1 at the single-cell level (through a cross-section and “en face” immunofluorescence staining). With both techniques, immunofluorescence images demonstrated that PAECs and PSMCs expressed the Piezo1 channels in Nx and 1W-CH conditions (Figure 2A–C).



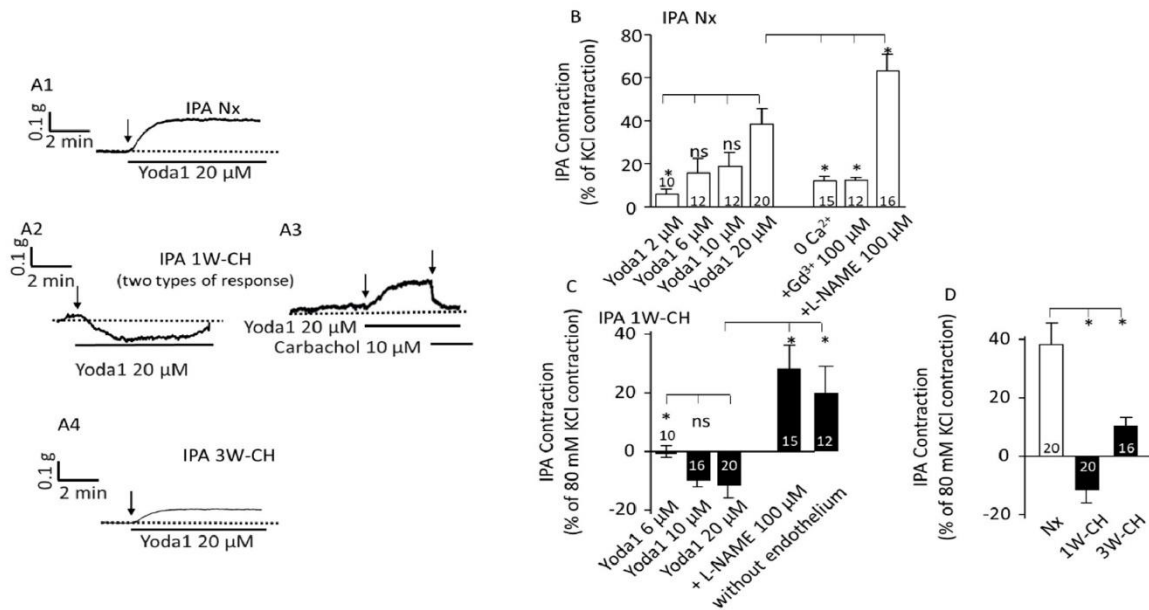
**Figure 2.** Piezo1 channels are expressed in PAECs and PSMCs in an early stage of CH-PH. PSMCs and PAECs expressed Piezo1 channels. (A) Immunostaining on thin transversal section: the endothelial layer (EC) and the media (smooth muscle cell, SMC) of IPA expressed Piezo1 (A1) without primary antibody, (A2) Nx IPA, (A3) 1W-CH IPA; elastic lamina in green separates media from intima. (B) PAECs were observed in the en face configuration in (B1) Nx IPA or (B2) 1W-CH IPA. (C) PSMCs were observed in the en face configuration in Nx IPA; note that SMC nuclei had a characteristic shape (elongated) as compared to EC nuclei. Red = antibody against Piezo1; blue = nucleus.

### 3.3. Piezo1 Activation Changes Vascular Tone Response in IPA

To investigate the involvement of Piezo1 channels in vascular tone, we realized vascular reactivity studies in IPAs from Nx and CH rats submitted to 1W-CH or 3W-CH.

In the first series of experiments using Nx rats, Yoda1, a Piezo1 agonist (1–20  $\mu\text{M}$ ) was tested in IPA tissues at the baseline tone. Figure 3A depicts results from the IPA rings; we found that Piezo1 activation by Yoda1, dose-dependently, induced a contraction of the IPA (Figure 3(A1),B)). To observe the contribution of  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the Piezo1 channel activation in the IPA contraction response, we performed experiments by incubating the IPA in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs solution or using gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ ), a non-selective inhibitor of stretch-activated channels (SACs). As observed in Figure 3B, the effect induced

by Yoda1 was statistically reduced in absence of extracellular calcium or in the presence of  $Gd^{3+}$  in the rat IPA, confirming that a calcium influx possibly through the Piezo1 channel was required for IPA contraction. Inhibition of the NO synthase by L-NAME (100  $\mu$ M) increased the amplitude of the contraction.



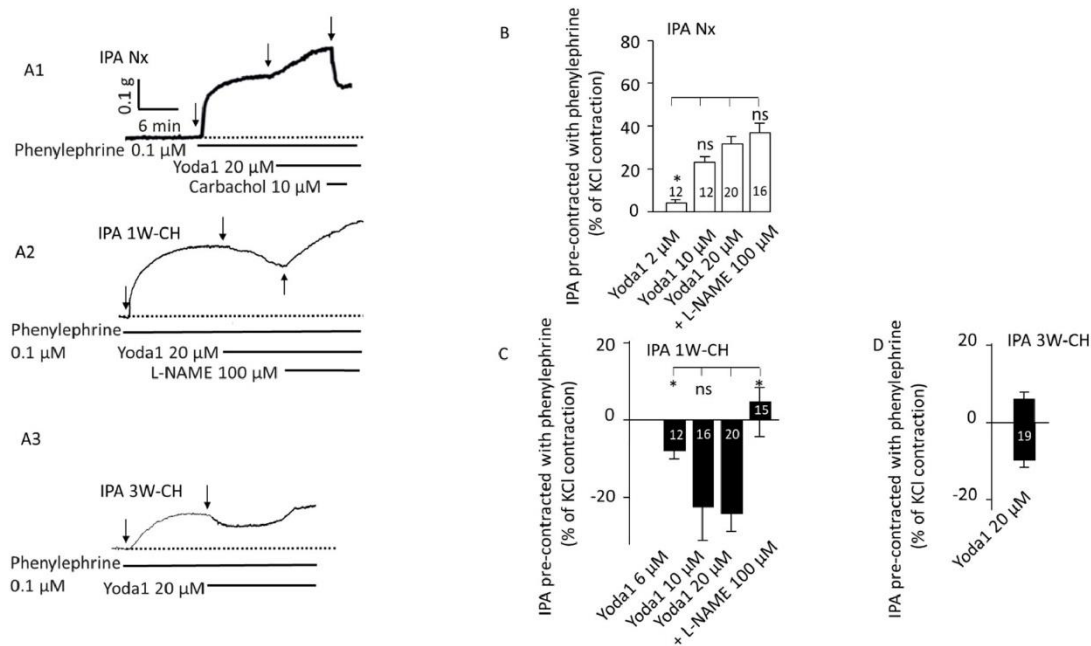
**Figure 3.** Piezo1 activation changes vascular tone response in IPA. Piezo1 contracted Nx IPA, but relaxed 1W-CH IPA. (A) A typical trace of IPA tension was recorded in the presence of Yoda1 in Nx (A1), 1W-CH (A2,A3), and 3W-CH (A4) conditions. For 1W-CH, two types of responses could be observed: a relaxation (A2) or a contraction (A3). In (A3), the application of carbachol (endothelial M3 agonist) induces a relaxation showing a functional endothelium. (B) Statistical analysis of the contraction induced by Yoda1 (2–20  $\mu$ M) in Nx IPA. The Yoda1 (20  $\mu$ M)-induced contraction was inhibited, in absence of extracellular calcium (0  $Ca^{2+}$ ), by  $GdCl_3$  ( $Gd^{3+}$ , 100  $\mu$ M) and amplified in the presence of L-NAME (100  $\mu$ M). (C) Amplitude of the Yoda1-mediated relaxation in 1W-CH. In the presence of L-NAME (100  $\mu$ M) or mechanical abrasion of the endothelium, the relaxation induced by 20  $\mu$ M Yoda1 was reversed to a contraction. (D) Comparison of the effect of 20  $\mu$ M Yoda1 in Nx, 1W-CH, or 3W-CH IPA. \*  $p < 0.05$ . The number inserted in the bar graph represented the number of arterial rings analyzed. The vertical arrow represents the beginning of the drug’s application. ns = not significant. A minimum of four different rats, at least four rings per rat were used.

The 1W-CH rat was an early-stage pulmonary hypertensive model. Remarkably, in experiments with 1W-CH IPA in basal tone conditions, the Yoda1-induced response was drastically statistically different (Figure 3(A2,A3,C)). Yoda1 induced various responses from a small contraction (Figure 3(A3), 30% of the rings) to a relaxation (70% of the rings) (Figure 3(A2)). The relaxation was transient and vascular tone returned to the basal level. In 1W-CH IPA without endothelium, or after treatment with an eNOS inhibitor, L-NAME (100  $\mu$ M), Yoda1-induced relaxation was reversed (Figure 3C). These results suggested that Yoda1-induced relaxation in 1W-CH IPA was mainly attributable to endothelial NO production (Figure 3C). By contrast, at 3W-CH when PH was fully developed (Figure 3D), Yoda1 induced a smaller contraction in IPA compared to those under Nx conditions (Figure 3(A1),B,D).

We then investigated Piezo1-associated vascular reactivity in the presence of phenylephrine (0.1  $\mu$ M) in Nx IPA to pre-contract the vessels to better observe the relaxant effect.



After the phenylephrine contractile response, Yoda1 (2–20  $\mu\text{M}$ ) administration produced a significant sustained concentration-dependent contraction (Figure 4(A1,B)). Application of carbachol after Yoda1 induced a relaxation, indicating a functional endothelium. The presence of L-NAME did not alter that Yoda1-induced contraction (Figure 4(A1)).



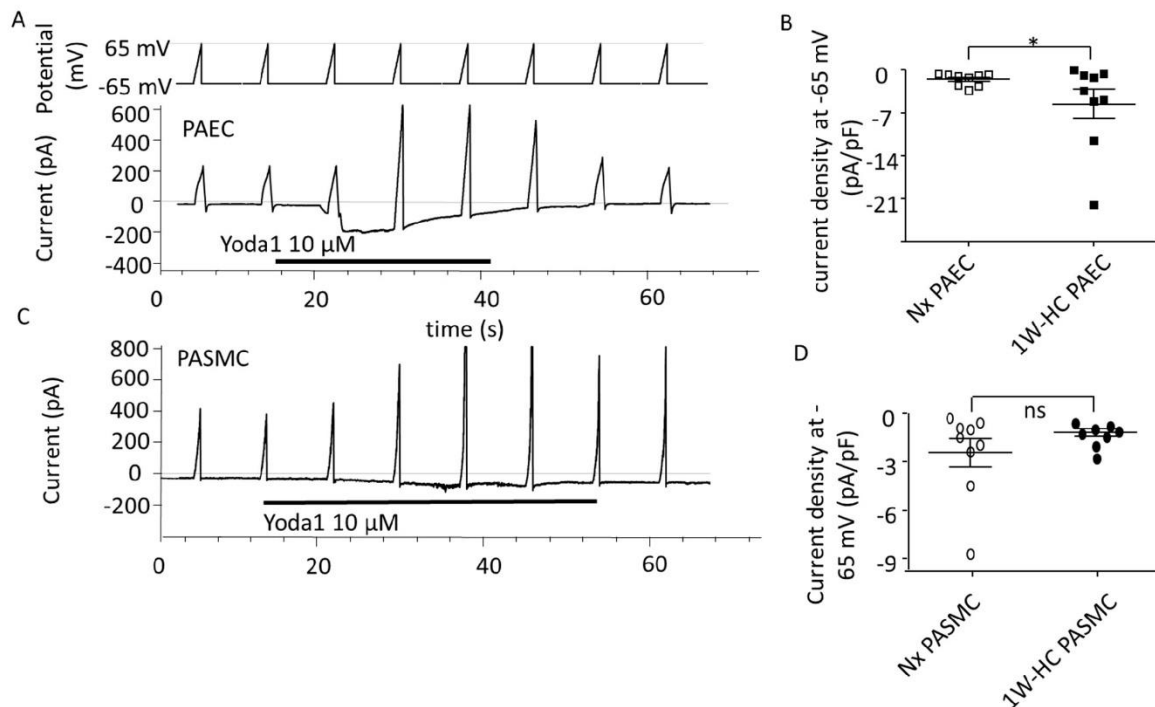
**Figure 4.** Piezo1 activation relaxes pre-contracted IPA from the early stage of PH. On pre-contracted IPA (phenylephrine 0.1  $\mu\text{M}$ ), Piezo1 contracted Nx IPA but relaxed 1W-CH IPA. (A) Typical trace of IPA tension recorded in the presence of Yoda1 on Nx (A1), 1W-CH (A2), or 3W-CH (A3). For Nx IPA, application of carbachol induced a relaxation, indicating a functional endothelium. For 1W-CH IPA, direct application of L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) converted the relaxation to a contraction, pointing out the importance of EC Piezo1 in the release of NO. Following 3W-CH, note the biphasic response (relaxation then contraction). (B) Statistical analysis of the contraction induced by Yoda1 (2–20  $\mu\text{M}$ ) in Nx IPA. (C) Amplitude of the Yoda1-mediated relaxation in 1W-CH pre-contracted IPA. In the presence of L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), Yoda1 induced a contraction instead of relaxation. (D) Effect of 20  $\mu\text{M}$  Yoda1 in 3W-CH IPA (amplitude of the relaxation then contraction). \*  $p < 0.05$ . The number inserted in the bar graph represents the number of arterial rings analyzed. Vertical arrow represents the beginning of the drugs' application. ns = not significant. Minimum four different rats, at least four rings per rat were used.

Furthermore, Yoda1 induced a clear relaxation in pre-contracted 1W-CH IPA with phenylephrine in comparison to Nx (Figure 4(A2,C)). In 1W-CH IPA, Yoda1-induced relaxation was reversed to a contraction by pre-treatment with the NOS inhibitor, L-NAME (100  $\mu\text{M}$ , Figure 4C). In the same way, the direct application of L-NAME after a Piezo1-mediated relaxation induced a contraction, as shown in Figure 4(A2). These results suggest that Yoda1-induced relaxation of 1W-CH is mainly attributable to the role of eNOS-dependent relaxation. By contrast, in 3W-CH IPA, Yoda1 (20  $\mu\text{M}$ ) induced a biphasic response with a small relaxation followed by a contraction (Figure 4(A3,D)). This type of response was never observed for Nx or 1W-CH conditions. Since at 1W-CH the endothelium seems to play a new major role in the Piezo1 effect, we have decided to decipher this mechanism.



### 3.4. PAEC and PASMCM Piezo1 Current in an Early Stage of CH-PH

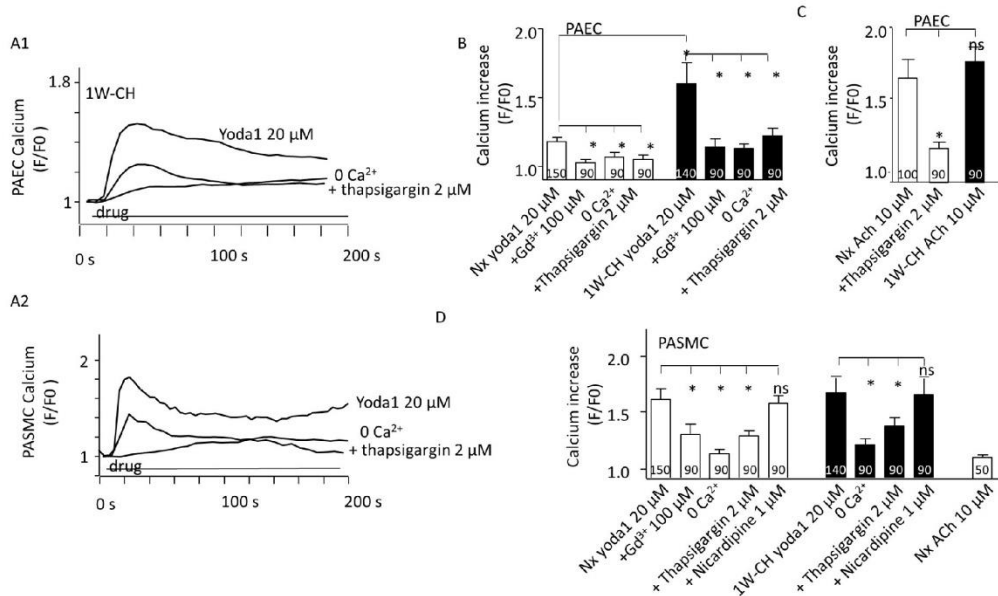
To explore the electrophysiological properties of Piezo1 currents, we measured the current through Piezo1 channels at the plasma membrane. In PAECs or PASMCMs from Nx and 1W-CH IPAs, Yoda1 induced an inward current at a negative potential and an outward current at a positive potential, a hallmark of the non-selective cationic Piezo1 channels (Figure 5A,C). Yoda1 induced a greater current in 1W-CH PAECs as compared to the Nx condition (Figure 5B). Conversely, the effects of Yoda1 on the current were similar in 1W-CH PASMCMs as compared to Nx (Figure 5D).



**Figure 5.** PAEC and PASMCM Piezo1 current in an early stage of CH-PH. Yoda1 induced current activation through Piezo1 channels in PAECs and PASMCMs. (A) Typical current induced by Yoda1 (10  $\mu$ M) on PAECs (holding potential  $-65$  mV, ramp depolarization up to  $65$  mV). (B) Yoda1 induced a greater inward current in 1W-CH PAECs as compared to Nx PAECs at the potential of  $-65$  mV. \*  $p < 0.05$ . (C) Typical current induced by Yoda1 (10  $\mu$ M) on PASMCMs (holding potential  $-65$  mV, ramp depolarization up to  $65$  mV). (D) Yoda1 induced the same inward current in 1W-CH PASMCMs and Nx PASMCMs at the potential of  $-65$  mV. Each point represented a cell.

### 3.5. PAEC and PASMCM Intracellular Calcium Concentration

In PAECs, the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is fundamentally important for NO production and vascular tone regulation. In the Nx group, the basal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was initially stable. The treatment with Yoda1 (20  $\mu$ M) caused a rapid and sustained  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase in responding PAECs (47%) (Figure 6(A1,B)). Pre-treating cells in the physiological solution without of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , or  $\text{Gd}^{3+}$  (2  $\mu$ M) significantly reduced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation evoked by Yoda1. Previous application of thapsigargin (2  $\mu$ M, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor inducing a  $\text{Ca}^{2+}$  endoplasmic reticulum store depletion) also inhibited the calcium response (Figure 6B). These results revealed that Piezo1 activation by Yoda1 induced a  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum and a  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the extracellular medium, suggesting that the store regulation by Piezo1 activation also contributed to global  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation.



**Figure 6.** PAEC and PASM Calcium Piezo1 current in an early stage of CH-PH. Piezo1 activation increased intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in both PAECs and PSMCs. (A1) Yoda1 (20  $\mu$ M) induced a sustained increase in Cal520 fluorescence in isolated PAECs from 1W-CH IPA that was reduced in presence of thapsigargin (2  $\mu$ M) or in absence of extracellular calcium (0  $Ca^{2+}$ ). (A2) Typical trace of calcium increase recorded in the presence of Yoda1 in Nx PSMCs that was reduced in presence of thapsigargin (2  $\mu$ M) or in absence of extracellular calcium (0  $Ca^{2+}$ ). (B) Statistical analysis of the  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by Yoda1 (20  $\mu$ M) in ECs from Nx and 1W-CH IPA (n represents the number of analyzed cells, five different rats at least). Absence of extracellular calcium (0  $Ca^{2+}$ ), presence of  $GdCl_3$  ( $Gd^{3+}$ , 100  $\mu$ M), or thapsigargin (2  $\mu$ M) inhibited the response. (C) Statistical analysis of the  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by ACh (10  $\mu$ M) in PAECs from Nx and 1W-CH IPA. (D) Statistical analysis of the  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by Yoda1 (20  $\mu$ M) in PSMCs from Nx and 1W-CH IPA. The absence of extracellular calcium (0  $Ca^{2+}$ ), presence of  $GdCl_3$  ( $Gd^{3+}$ , 100  $\mu$ M), or thapsigargin (2  $\mu$ M) inhibited the response, whereas nicardipine (1  $\mu$ M; L-type voltage-gated calcium channel inhibitor) did not blunt the response. \*  $p < 0.05$ . n represented the number of analyzed cells, five different rats at least.

Yoda1 induced a greater calcium increase in 1W-CH PAECs compared to the Nx control group. These results corroborate previous reactivity experiments where Yoda1 induced eNOS-dependent relaxation of the 1W-CH IPA. As a control, we examined the  $[Ca^{2+}]_i$  response to acetylcholine (ACh), an agonist of the muscarinic  $M_3$  receptor in PAECs. ACh (10  $\mu$ M) increased  $[Ca^{2+}]_i$  in both Nx and 1W-CH PAECs to a similar extent (Figure 6C), but with a different shape from the one observed in response to Yoda1 (oscillatory response). In addition, the depletion of the endoplasmic reticulum stored by thapsigargin (2  $\mu$ M) reduced the calcium response to acetylcholine (Figure 6C).

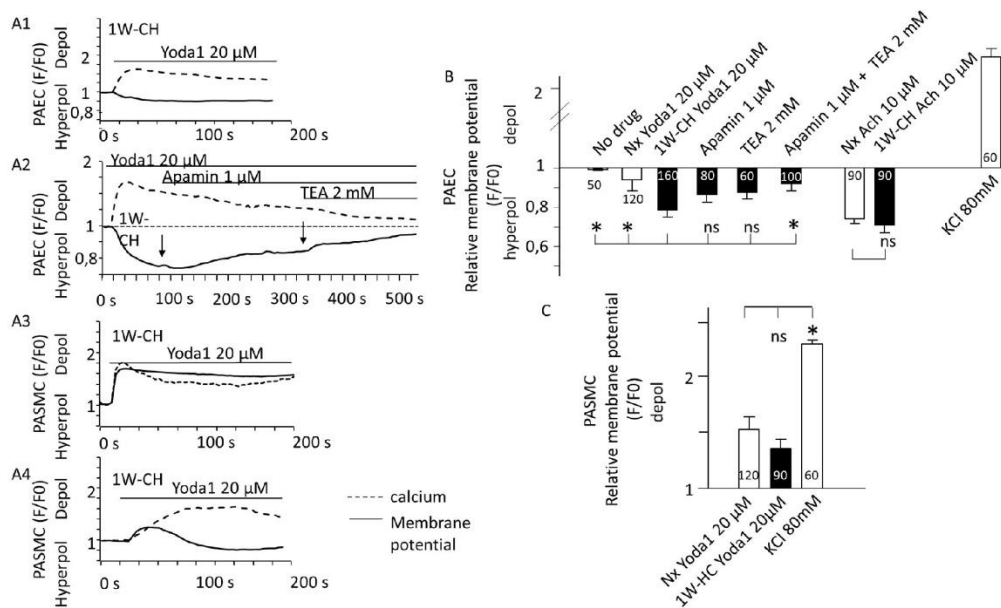
In freshly dissociated responding Nx PSMCs (90%), Yoda1 (20  $\mu$ M) rapidly increased  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 6(A2)). As PSMCs expressed L-type calcium involved in IPA contraction, nicardipine, an L-type calcium channel inhibitor, was tested but it did not inhibit the Yoda1-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  increase. The results showed that the Yoda1-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  increase was significantly reduced in the absence of extracellular  $Ca^{2+}$  or the presence of  $Gd^{3+}$ , but not inhibited by an L-type calcium channel inhibitor, nicardipine (Figure 6D). Similar to PAECs, the release of  $Ca^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum was involved in the Yoda1 response as it was reduced by thapsigargin (2  $\mu$ M) (Figure 6D). As a control, acetylcholine induced a very small increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in PSMCs as compared to PAECs (Figure 6D).

Furthermore, the amplitude of the Yoda1-induced response was similar in PASMCS from Nx or 1W-CH PASMCS. These results indicated that Yoda1 was able to increase  $[Ca^{2+}]_i$  in PASMCS.

3.6. Transmembrane Potential and Piezo1 in PAECs and PASMCS

Since SACs were suggested to regulate vascular tone by releasing endothelium-derived hyperpolarization factor EDH [23], we evaluated the transmembrane potential thanks to a red fluorescent probe in PAECs and PASMCS.

In PAECs, Yoda1 induced hyperpolarization of the transmembrane potential simultaneously with the calcium increase (Figure 7A). The amplitude of the hyperpolarization was statistically different between Nx and 1W-CH conditions. Hyperpolarization is probably due to the activation of endothelial  $K^+$  channels. Since the hyperpolarization and  $[Ca^{2+}]_i$  response are simultaneous, we focused on calcium-activated potassium channels (K-Ca) involved in the EDH mechanism. Hyperpolarization was reduced in the presence of the combination of TEA (2 mM; an inhibitor of K-Ca current) plus apamin (1  $\mu$ M, inhibitor of small conductance KCa, sKCA) (Figure 7B). In addition, the treatment with ACh (Figure 7(A2),B)) also induced hyperpolarization in PAECs from Nx and 1W-CH.



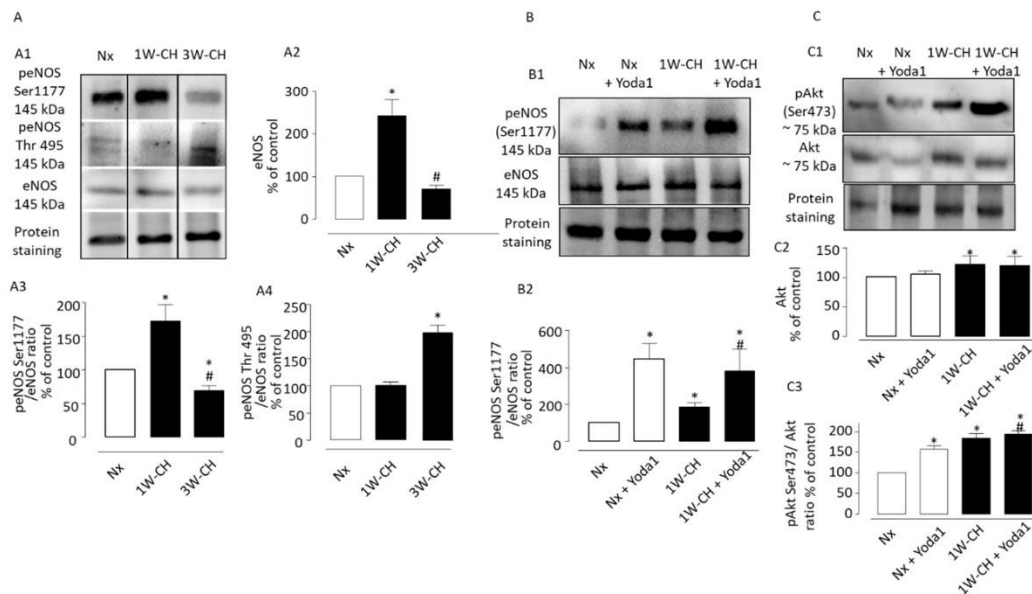
**Figure 7.** Yoda1 induced hyperpolarization of the transmembrane potential in PAECs. Piezo1 activation changed transmembrane potential. (A) Typical traces of the FLIPR fluorescence were recorded in freshly isolated vascular cells stimulated with Yoda1 (20  $\mu$ M) (black line). Dash lines represent  $[Ca^{2+}]_i$  increase recorded simultaneously with the Cal520 fluorescent probe. Yoda1 (A1) hyperpolarized PAECs. This hyperpolarization was reduced by the application of apamin (1 mM), then apamin plus TEA (2 mM), and inhibitors of calcium-dependent potassium channels (A2). By contrast, Yoda1 depolarized PASMCS (A3) or could sometimes have a biphasic response (A4). (B) Statistical analysis of the membrane potential variation induced by Yoda1 (20  $\mu$ M) in freshly isolated PAECs from Nx and 1W-CH IPA. The decrease in FLIRP fluorescence in the presence of Yoda1 was reversed by the combination of apamin (1  $\mu$ M) plus TEA (2 mM). (C) Statistical analysis of the membrane potential variation induced by Yoda1 (20  $\mu$ M) in freshly isolated PASMCS from Nx and 1W-CH IPA. As the control, KCl solution (80 mM) was applied to measure strong depolarization. For statistical analysis, antagonists (apamin and TEA) were preincubated before Yoda1 application and not after, as for Figure 2A. \*  $p < 0.05$ . n represented the number of analyzed cells, five different rats at least.



On the contrary, we observed that in PSMCs from Nx and 1W-CH,  $[Ca^{2+}]_i$  elevation evoked by activation of Piezo1 induced a depolarization (Figure 7(A3,C)). In 10 % of the cells, the depolarization slowly reversed to a small hyperpolarization (Figure 7(A4)). The amplitude of the depolarization was not statistically different between Nx and 1W-CH PSMCs.

3.7. Yoda1 Induces Signaling Pathways Leading to eNOS Activation via Akt Signal Pathways in IPA

We explored the role of CH on eNOS regulation in IPA. Figure 8A demonstrates the effects of 1W-CH or 3W-CH on eNOS expression in IPA in comparison to the Nx condition. As shown in Figure 8(A1,A2), the Western blot experiment showed that total levels of eNOS increased at 1W-CH as compared to Nx, and then declined for the 3W-CH. This increase could explain the IPA relaxation observed at 1W-CH (Figure 3).



**Figure 8.** Piezo1 activation induces phosphorylation of the Akt-eNOS pathway in IPA. Effect of chronic hypoxia on expression and phosphorylation of Akt-eNOS pathway in IPA. (A1) Representative images of total eNOS, and phospho-eNOS in IPA from rats exposed to Nx or 1W-CH (early stage CH-PH) or 3W-CH (later stage). (A2) Graphs showed quantified relative signal intensity normalized (% of control, Nx) to total protein staining in IPA from rats exposed to Nx or 1W-CH or 3W-CH. The eNOS phosphorylation of Ser1177 (A3) or Thr497 (A4) was analyzed and compared to eNOS total levels under the same conditions. (B) Yoda1 led to the activation of eNOS by phosphorylation at Ser1177 in IPA from Nx or 1W-CH. (B1) Representative image of peNOS, (B2) graphs show data for statistical analysis. (C) Akt total levels were increased in 1W-CH PH in comparison to Nx. In addition, Yoda1 increased Akt phosphorylation at Ser473 in all experimental conditions. (C1) Representative image of total Akt and pAkt. (C2) Graphs from Akt quantified relative signal intensity normalized (% of control, Nx) to total protein staining and (C3) pAkt was compared to Akt total levels. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from four (Western blotting) experiments. \*  $p < 0.05$  compared to Nx and #  $p < 0.05$  compared to 1W-CH.

Then, we observed the modulation of eNOS activity by phosphorylation of residue of serine 1177, which induced an active eNOS form, whereas phosphorylation of Thr497 induced an inactive form [19]. In this series of experiments, we compared the relative signal intensity of phosphorylation of residue Ser1177 or Thr497 in 1W-CH or 3W-CH IPA.



We showed that 1W-CH PH increased the eNOS phosphorylation at Ser1177 compared to Nx conditions or 3W-CH PH (Figure 8(A3)). On the other hand, the phosphorylation levels at Thr497 were unaltered between 1W-CH IPA and Nx IPA. However, in 3W-CH IPA, we observed an increase in Thr497 phosphorylation, revealing deregulation of eNOS at 3W-CH PH (Figure 8(A4)).

We assessed whether Yoda1 led to the activation of eNOS by phosphorylation at Ser1177 in IPA from Nx or 1W-CH (Figure 8B). Initially, Yoda1 incubation caused a significant increase in phosphorylation of eNOS at Ser1177 in 1W-CH IPA and Nx IPA; this effect was greater in both Nx and 1W-CH PH as compared to the control (Figure 8B). These results indicated that Piezo1 can phosphorylate eNOS at 1W-CH PH. In addition, the same increase in eNOS phosphorylation was observed in human ECs, which was inhibited by L-NAME,  $Gd^{3+}$ , and the absence of extracellular calcium ( $0 Ca^{2+}$ ) (Figure S1).

We then verified the possible correlation between Piezo1 activation and the upstream mechanism of eNOS activation, such as Akt. To test the possible effect of Piezo1 activation on Akt phosphorylation, the 1W-CH IPA and Nx IPA were treated with Yoda1 (Figure 8C). The results showed that the Akt total levels were increased in 1W-CH IPA. Yoda1 induced Akt phosphorylation at Ser473 in both Nx and 1W-CH, but this effect was higher in 1W-CH in comparison to Nx.

#### 4. Discussion

These data support the role of Piezo1 activation in vascular tone regulation of IPAs. The Piezo1 activation induces PASMCM contraction by increasing calcium signaling. However, in PAECs, Piezo1 also increases calcium levels that were associated with hyperpolarization and the Akt/eNOS pathway. In Nx physiological conditions, the Piezo1 effect is greater in PASMCMs than in PAECs, leading to a contraction. This study also demonstrates the possible underlying mechanisms of endothelial Piezo1 activation on pulmonary vasculature submitted to chronic hypoxia, conducting to a relaxation. As observed, in the early stage of PH (1W-CH), Piezo1 channel activation induced relaxation by at least three mechanisms: (1) increase in endothelial  $[Ca^{2+}]_i$ , (2) endothelial-dependent hyperpolarization, and (3) phosphorylation of Akt and eNOS. Altogether, these results suggest endothelial Piezo1 could contribute to intrapulmonary vascular relaxation that could oppose the development of PH.

In the present study, hemodynamic changes were associated with a progressive increase in the pulmonary pressure and RV hypertrophy (Figure 1B). These data were from previous studies demonstrating the progressive development of the disease in animal models submitted to 1 week of chronic hypoxia, 3 weeks of CH where the disease is fully developed (10% of  $O_2$ ), or following injections of monocrotaline [5,24]. We explored the role of Piezo1 channels on vascular tone under physiological conditions as compared to the early stage of PH induced by CH in rats (1W-CH). We focused on 1W-CH because there was a not significant slight increase in pulmonary arterial pressure, whereas there were significant cardiac changes (Figure 1) and modification of vascular and pulmonary eNOS expression or other proteins [4,25]. This could indicate a possible compensation mechanism.

In Nx IPA, the activation of Piezo1 increased vascular resistance, probably due to PASMCM Piezo1 activation. Electrophysiological and immunofluorescence experiments confirmed that Piezo1 was expressed in PASMCMs (Figures 2 and 5), as in human PASMCMs [14]. Extracellular calcium influx through the Piezo1 channel induced the contraction in PASMCMs, but other mechanisms may amplify this calcium increase. Depletion of calcium from the sarcoplasmic reticulum reduced the Piezo1-mediated calcium increase (Figure 6). Calcium was released from the sarcoplasmic reticulum thanks to the ryanodine receptor (calcium-induced calcium release) [21,26], which could be activated by the calcium that flows through Piezo1. Another hypothesis is that Piezo1 is expressed at the reticulum [14,27] and Yoda1 simultaneously stimulated the Piezo1 channel at the plasma and reticulum membrane. The presence of this reticular channel may explain why, in absence of extracellular calcium, Yoda1 still induced a small calcium response in PASMCMs (Figure 6D). Another amplification

could be related to membrane potential. As Piezo1 is a cationic channel, cationic influx induced a depolarization, as observed in Figure 7 or by Rode et al. [28] in mice. This depolarization may activate calcium influx through voltage-gated calcium channels that could amplify the contraction. Unfortunately, we could not observe this phenomenon as an inhibitor of the voltage-gated calcium channel (nicardipine) did not statistically reduce the calcium response (Figure 6D).

In our conditions, Yoda1 induced a similar calcium increase and depolarization in 1W-CH PSMCs as compared to Nx, although the density of the Piezo1 current diminished in 1W-CH PSMCs. A possible compensation mechanism by the calcium-induced calcium release by the reticulum may explain this discrepancy. Upregulation of Piezo1 channels may appear later, such as for TRPV4 calcium channels [29]. In agreement, evidence was provided that the Piezo1 protein level was upregulated in the PH pulmonary artery [14].

The interplay between endothelial and smooth muscle cells regulates the vascular tone. A fine regulation of  $Ca^{2+}$  signaling pathways in both vascular endothelial and smooth muscle cells is important for the control of pulmonary vascular tone. As in mice [9], rat PAECs expressed functional Piezo1 channels. Calcium influx in PAECs through Piezo1 channels may activate NOS-dependent relaxation. Indeed, in the presence of L-NAME (1W-CH), Piezo1-mediated contraction was greater (Figure 3). However, this NOS-dependent effect was insufficient to oppose PSMC contraction. Acetylcholine, which relaxed the IPA, increased calcium in PAECs, but with a different shape compared to Yoda1 (Figure 6A). As observed on lung slices,  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations are important for the control of vascular tone [30]. These oscillations may explain the better relaxation induced by acetylcholine as compared to Yoda1. Furthermore, acetylcholine does not strongly increase  $[Ca^{2+}]_i$  in SMCs. In other vascular species, endothelial Piezo1 stimulated by Yoda1 or by shear stress can induce relaxation in physiological conditions such as in mouse pulmonary arteries [9,31] or mesenteric arteries [32]. This is also certainly due to a weaker expression of this channel at the PSMC level.

Relaxation could be linked to a decrease in PSMC contraction, or an increase in relaxing factors released by the endothelium, such as NO or EDH. In our study, the relaxant effect induced by Yoda1 in 1W-CH IPA was associated with greater activity of the endothelium due to a release of the relaxing factor as NO. Indeed, relaxation was inhibited in the presence of L-NAME, a powerful inhibitor of NOS. Furthermore, we observed that, in presence of L-NAME, relaxation was reversed to a contraction, confirming that PSMC contraction is only slightly reduced and that the relaxation is linked to increased activity of the endothelium. Increased NOS activity and NO production at 1W-CH could be due to several factors such as calcium, amount of eNOS, and phosphorylation. Yoda1 induced a more important  $[Ca^{2+}]_i$  increase due to a greater cationic current through Piezo1 (Figure 5). This greater current could be due to an increase in the Piezo1 channel activity or an increase in Piezo1 channels at the membrane as observed in PAECs from patients with idiopathic PAH [20]. Therefore, the calcium signal induced by Piezo1 activation could increase the activation of eNOS. Such calcium influx increase was previously described at 3W-CH, but here, we demonstrated that this modulation appears in the early phase of the disease [18,33,34]. In 3W-CH, Yoda1 still induced a relaxation (with a return of the contraction). This relaxation could be linked to a persistent increase in Piezo1 channel activity as observed in human PAECs [20]. However, this relaxation was smaller than at 1W-CH due to insufficient NO production in CH-PH associated with eNOS decoupling or phosphorylation at the site of residue Thr497.

Several experimental models demonstrated the role of CH on eNOS regulation in vascular pulmonary beds from different species [35]. In addition, the eNOS expression was related to eNOS uncoupling during CH-induced PH [25]. The present data obtained in the IPA demonstrated that eNOS expression was higher in 1W-CH, leading to better relaxation.

eNOS activation is regulated by calcium-calmodulin complexes and phosphorylation by kinases at residue Ser1177 (active form) or phosphorylation at Thr497 (inactive form) [19]. Consequently, we also determined that the 1W-CH stage was associated with an increase



in phosphorylation. As expected, the eNOS phosphorylation at residue Ser1177 increased, promoting relaxation, whereas phosphorylation at Thr497 (inactive form) was not altered. At 3W-CH there was an increase in phosphorylation at Thr497, revealing deregulation of eNOS.

Recent studies revealed that the Piezo1 agonist Yoda1 induced eNOS phosphorylation at serine 635 and serine 1179 in ECs [36]. In aorta endothelial cells, the mechanical stimuli induce activation of Piezo1 and the downstream phosphorylation of Akt and eNOS at Ser1177. In addition, the calcium influx via T-type calcium channels phosphorylated NO-synthase (Ser1177) via the CAMK2/CAMK4 in cultured human endothelial cells [37]. However, the link between calcium influx and mechanisms of eNOS phosphorylation in IPA from an early stage of CH-PH should be further investigated. In the obtained data, Yoda1 caused phosphorylation of eNOS (Ser1177), suggesting that Yoda1 activated eNOS by phosphorylating induced signaling pathways in addition to the  $Ca^{2+}$ /CAM pathway.

It has been shown that activation of the survival signal PI3K/Akt pathway induces phosphorylation of eNOS at site Ser1177 [19]. We found that Piezo1 activation increased phosphorylation of Akt at the residue of serine 473 in IPA. These results corroborate studies showing that the Akt pathway mediates the increased eNOS activation in response to Yoda1 in cultured endothelial cells.

Under physiologic conditions, an acetylcholine-induced, endothelium-dependent vasodilator response was associated with NO release, but also with an endothelial-dependent hyperpolarization (EDH)-mediated response [38]. The hyperpolarization was due to the activation of the endothelial calcium-activated potassium channel. Hyperpolarization spreads to the PASM and closes voltage-gated calcium channels, relaxing the cell [19]. In pathologic conditions, the endothelium presents functional and structural alterations. An impaired EDH-mediated response is related to the deregulation of calcium-activated potassium channels, such as the IKCa-intermediate- and SKCa-small-conductance calcium-activated potassium channels [39]. Previous studies suggested a reduction in the EDH response induced by acetylcholine in pulmonary arteries from a model of 3W-CH [40]. In PAECs, we demonstrated that Piezo1 provokes a PAEC hyperpolarization. We thus hypothesize that calcium influx through Piezo1 would lead to the activation of IKCa or SKCa. Potassium efflux overcame cationic influx through Piezo1 and provoked a hyperpolarization in PAECs. Such hyperpolarization spread to the PASM45Cs to close voltage-gated calcium channels and induced relaxation, complementary to the one due to eNOS activation. By contrast, endothelial Piezo1 channels induced an endothelial cell depolarization in mesenteric arteries due to the cationic influx through Piezo1 [41]. Indeed, in this specific vascular bed, sodium influx through Piezo1 induces a depolarization that spreads to the underlying smooth muscle cells, thus inducing vasoconstriction. This appears when Piezo1 is activated by blood flow modulation during physical exercise [28]. The discrepancy between mesenteric and PA could be due to a specific coupling between Piezo1 and KCa or to the levels of KCa.

CH-PH has been associated with a reduction in the acetylcholine-induced, endothelium-dependent response and loss of eNOS-mediated vasodilation at 3W-CH [42,43]. By contrast, the Piezo1 relaxing effect may be useful to limit the progress of the PH. This increase in NO production is certainly beneficial for IPAs. It induces a relaxation that opposes the vasoconstriction induced by hypoxia. It is also well known that NO inhibits the production of endothelin and the SMC proliferation involved in vascular wall remodeling [44]. However, this beneficial effect could be limited by deleterious NO action. It could react with free radicals to form highly toxic peroxynitrite (NOO-) production or favor inflammation [45].

## 5. Conclusions

The present study thus demonstrates that endothelial Piezo1 contributes to intrapulmonary vascular relaxation by controlling endothelial  $[Ca^{2+}]_i$ , endothelial-dependent hyperpolarization (EDH), and Akt-eNOS- pathways at the early stage of PH. Such a mechanism counterbalances the IPA contraction mediated by CH in the early stage of PH.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11152349/s1>, S.1. Supplementary material, S.1.1. Human pulmonary arterial endothelial cell culture, S.1.2. Reagents and chemicals, S.2 Supplementary data, S.2.1 Yoda induces eNOS phosphorylation in HPAECs, Figure S1: Piezo1 activation induces eNOS phosphorylation at Ser1177. References [36,46–48] are cited in the Supplementary materials.

**Author Contributions:** Conceptualization, T.P.R. and J.-F.Q.; methodology and investigation, T.P.R., S.B. and J.-F.Q.; validation, T.P.R., S.B., T.D. and J.-F.Q.; formal analysis and data curation, T.P.R., S.B. and J.-F.Q.; writing—original draft preparation, T.P.R. and J.-F.Q.; writing—review and editing, I.B., P.V., V.F.-M., G.C., P.B., C.G., T.D., and J.-F.Q.; supervision, J.-F.Q.; project administration and funding acquisition, P.B., C.G., T.D. and J.-F.Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** All animal experimental protocols in this study conformed to European directives and animal protection guidelines. The animal study protocol was approved by the Ethics Committee. Agreement (A33-063-907) was obtained from French authorities and all the protocols used were approved by the local Ethics Committee of the University of Bordeaux.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to acknowledge Paul Robillard and Marilyne Campagnac for technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Simonneau, G.; Montani, D.; Celermajer, D.; Denton, C.P.; Gatzoulis, M.A.; Krowka, M.; Williams, P.G.; Souza, R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1801913. [CrossRef]
- Freund-Michel, V.; Guibert, C.; Dubois, M.; Courtois, A.; Marthan, R.; Savineau, J.-P.; Muller, B. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **2013**, *7*, 175–200. [CrossRef] [PubMed]
- Condon, D.; Nickel, N.P.; Anderson, R.; Mirza, S.; Perez, V.A.D.J. The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension: What's old is new. *F1000Research* **2019**, *8*, 888. [CrossRef] [PubMed]
- Fessart, D.; Martin-Negrier, M.-L.; Claverol, S.; Thiolat, M.-L.; Crevel, H.; Toussaint, C.; Bonneau, M.; Muller, B.; Savineau, J.-P.; Delom, F. Proteomic remodeling of proteasome in right heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**, *66*, 41–52. [CrossRef]
- Bonnet, S.; Dumas-De-La-Roque, E.; Bégueret, H.; Marthan, R.; Fayon, M.; Dos Santos, P.; Savineau, J.-P.; Baulieu, E.-E. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9488–9493. [CrossRef] [PubMed]
- Bonnet, S.; Hyvelin, J.-M.; Bonnet, P.; Marthan, R.; Savineau, J.-P. Chronic hypoxia-induced spontaneous and rhythmic contractions in the rat main pulmonary artery. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2001**, *281*, L183–L192. [CrossRef] [PubMed]
- 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. [CrossRef] [PubMed]
- 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. [CrossRef]
- Lhomme, A.; Gilbert, G.; Pele, T.; Deweirdt, J.; Henrion, D.; Baudrimont, I.; Campagnac, M.; Marthan, R.; Guibert, C.; Ducret, T.; et al. Stretch-activated Piezo1 Channel in Endothelial Cells Relaxes Mouse Intrapulmonary Arteries. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2019**, *60*, 650–658. [CrossRef]
- Yamashiro, Y.; Yanagisawa, H. The molecular mechanism of mechanotransduction in vascular homeostasis and disease. *Clin. Sci.* **2020**, *134*, 2399–2418. [CrossRef]
- Morley, L.C.; Shi, J.; Gaunt, H.J.; Hyman, A.; Webster, P.J.; Williams, C.; Forbes, K.; Walker, J.J.; Simpson, N.A.B.; Beech, D. Piezo1 channels are mechanosensors in human fetoplacental endothelial cells. *Mol. Hum. Reprod.* **2018**, *24*, 510–520. [CrossRef] [PubMed]
- 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. [CrossRef]
- Syeda, R.; Xu, J.; E Dubin, A.; Coste, B.; Mathur, J.; Huynh, T.; Matzen, J.T.; Lao, J.; Tully, D.C.; Engels, I.H.; et al. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *eLife* **2015**, *4*, e07369. [CrossRef] [PubMed]
- Liao, J.; Lu, W.; Chen, Y.; Duan, X.; Zhang, C.; Luo, X.; Lin, Z.; Chen, J.; Liu, S.; Yan, H.; et al. Upregulation of Piezo1 (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1) Enhances the Intracellular Free Calcium in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells From Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patients. *Hypertension* **2021**, *77*, 1974–1989. [CrossRef] [PubMed]



15. Barer, G.; Emery, C.; Stewart, A.; Bee, D.; Howard, P. Endothelial control of the pulmonary circulation in normal and chronically hypoxic rats. *J. Physiol.* **1993**, *463*, 1–16. [[CrossRef](#)]
16. Cahill, E.; Rowan, S.C.; Sands, M.; Banahan, M.; Ryan, D.; Howell, K.; McLoughlin, P. The pathophysiological basis of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the mouse: Vasoconstrictor and structural mechanisms contribute equally. *Exp. Physiol.* **2012**, *97*, 796–806. [[CrossRef](#)]
17. A Shimoda, L.; Sham, J.; Sylvester, J.T. Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung. *Physiol. Res.* **2000**, *49*.
18. Tanaka, S.; Shiroto, T.; Godo, S.; Saito, H.; Ikumi, Y.; Ito, A.; Kajitani, S.; Sato, S.; Shimokawa, H. Important role of endothelium-dependent hyperpolarization in the pulmonary microcirculation in male mice: Implications for hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2018**, *314*, H940–H953. [[CrossRef](#)]
19. Vanhoutte, P.M.; Shimokawa, H.; Feletou, M.; Tang, E.H.C. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol.* **2015**, *219*, 22–96. [[CrossRef](#)]
20. Wang, Z.; Chen, J.; Babicheva, A.; Jain, P.P.; Rodriguez, M.; Ayon, R.J.; Ravellette, K.S.; Wu, L.; Balistrieri, F.; Tang, H.; et al. Endothelial upregulation of mechanosensitive channel Piezo1 in pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2021**, *321*, C1010–C1027. [[CrossRef](#)]
21. Dahan, D.; Ducret, T.; Quignard, J.-F.; Marthan, R.; Savineau, J.-P.; Estève, E. Implication of the ryanodine receptor in TRPV4-induced calcium response in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2012**, *303*, L824–L833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Li, C.; Liu, Z.H.; Chen, J.W.; Shu, X.Y.; Shen, Y.; Ding, F.H.; Zhang, R.Y.; Shen, W.F.; Lu, L.; Wang, X.Q. Using En Face Immunofluorescence Staining to Observe Vascular Endothelial Cells Directly. *J. Vis. Exp.* **2019**, e59325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kohler, R.; Distler, A.; Hoyer, J. Increased mechanosensitive currents in aortic endothelial cells from genetically hypertensive rats. *J. Hypertens.* **1999**, *17*, 365–371. [[CrossRef](#)]
24. 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, C.; et al. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel activity in pulmonary artery by upregulating Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>3.2. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2013**, *305*, L154–L164. [[CrossRef](#)]
25. Dubois, M.; Delannoy, E.; Duluc, L.; Closs, E.; Li, H.; Toussaint, C.; Gadeau, A.-P.; Gödecke, A.; Freund-Michel, V.; Courtois, A.; et al. Biopterin Metabolism and eNOS Expression during Hypoxic Pulmonary Hypertension in Mice. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gilbert, G.; Ducret, T.; Marthan, R.; Savineau, J.-P.; Quignard, J.-F. Stretch-induced Ca<sup>2+</sup> signalling in vascular smooth muscle cells depends on Ca<sup>2+</sup> store segregation. *Cardiovasc. Res.* **2014**, *103*, 313–323. [[CrossRef](#)]
27. McHugh, B.J.; Buttery, R.; Lad, Y.; Banks, S.; Haslett, C.; Sethi, T. Integrin activation by Fam38A uses a novel mechanism of R-Ras targeting to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 51–61. [[CrossRef](#)]
28. Rode, B.; Shi, J.; Endesh, N.; Drinkhill, M.J.; Webster, P.J.; Lotteau, S.J.; Bailey, M.A.; Yuldasheva, N.Y.; Ludlow, M.J.; Cubbon, R.M.; et al. Piezo1 channels sense whole body physical activity to reset cardiovascular homeostasis and enhance performance. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)]
29. Barbeau, S.; Joushomme, A.; Chappe, Y.; Cardouat, G.; Baudrimont, I.; Freund-Michel, V.; Guibert, C.; Marthan, R.; Berger, P.; Vacher, P. Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia. *Biomolecules* **2022**, *12*, 954. [[CrossRef](#)]
30. Sanderson, M.J.; Bai, Y.; Perez-Zoghbi, J.F. Ca<sup>2+</sup> Oscillations Regulate Contraction Of Intrapulmonary Smooth Muscle Cells. In *Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation. Advances in Experimental Medicine and Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; Volume 661, pp. 77–96. [[CrossRef](#)]
31. Wang, H.; Yuan, Z.; Wang, B.; Li, B.; Lv, H.; He, J.; Huang, Y.; Cui, Z.; Ma, Q.; Li, T.; et al. COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), a Novel PIEZO1 Regulator That Controls Blood Pressure. *Hypertension* **2022**, *79*, 549–561. [[CrossRef](#)]
32. Wang, S.; Chennupati, R.; Kaur, H.; Iring, A.; Wettschureck, N.; Offermanns, S. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 4527–4536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. A Fagan, K.; Morrissey, B.; Fouty, B.W.; Sato, K.; Harral, J.W.; Morris, K.G.; Hoedt-Miller, M.; Vidmar, S.; McMurtry, I.F.; Rodman, D.M. Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir. Res.* **2001**, *2*, 306–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Xue, C.; Johns, R.A. Upregulation of Nitric Oxide Synthase Correlates Temporally With Onset of Pulmonary Vascular Remodeling in the Hypoxic Rat. *Hypertension* **1996**, *28*, 743–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Blum-Johnston, C.; Thorpe, R.B.; Wee, C.; Opsahl, R.; Romero, M.; Murray, S.; Brunelle, A.; Blood, Q.; Wilson, R.; Blood, A.B.; et al. Long-term hypoxia uncouples Ca<sup>2+</sup> and eNOS in bradykinin-mediated pulmonary arterial relaxation. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2018**, *314*, R870–R882. [[CrossRef](#)]
36. Jin, Y.-J.; Chennupati, R.; Li, R.; Liang, G.; Wang, S.; Iring, A.; Graumann, J.; Wettschureck, N.; Offermanns, S. Protein kinase N2 mediates flow-induced endothelial NOS activation and vascular tone regulation. *J. Clin. Investig.* **2021**, *131*. [[CrossRef](#)]
37. Zheng, Z.; Wang, X.; Wang, Y.; King, J.A.C.; Xie, P.; Wu, S. CaMK4 is a downstream effector of the  $\alpha$ 1G T-type calcium channel to determine the angiogenic potential of pulmonary microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2021**, *321*, C964–C977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hansen, P.B.L.; De Mey, J.G.R.; Vanhoutte, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarizations in health and disease. *Acta Physiol.* **2016**, *219*, 97–99. [[CrossRef](#)]

39. Ottolini, M.; Daneva, Z.; Chen, Y.; Cope, E.L.; Kasetti, R.B.; Zode, G.S.; Sonkusare, S.K. Mechanisms underlying selective coupling of endothelial Ca<sup>2+</sup> signals with eNOS vs. IK/SK channels in systemic and pulmonary arteries. *J. Physiol.* **2020**, *598*, 3577–3596. [[CrossRef](#)]
40. Kroigaard, C.; Dalsgaard, T.; Nielsen, G.; E Laursen, B.; Pilegaard, H.; Köhler, R.; Simonsen, U. Activation of endothelial and epithelial K<sub>Ca</sub>2.3 calcium-activated potassium channels by NS309 relaxes human small pulmonary arteries and bronchioles. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *167*, 37–47. [[CrossRef](#)]
41. Beech, D.J. Endothelial Piezo1 channels as sensors of exercise. *J. Physiol.* **2018**, *596*, 979–984. [[CrossRef](#)]
42. Marthan, R.; Savineau, J.-P. Modulation of Ion Channels in Pulmonary Arterial Hypertension. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 2443–2455. [[CrossRef](#)]
43. Klinger, J.R.; Abman, S.H.; Gladwin, M.T. Nitric Oxide Deficiency and Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 639–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rossi, G.P.; Seccia, T.M.; Nussdorfer, G.G. Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: Relevance in the physiology and pathology of the cardiovascular system. *Int. Rev. Cytol.* **2001**, *209*, 241–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yang, Y.; Wang, D.; Zhang, C.; Yang, W.; Li, C.; Gao, Z.; Pei, K.; Li, Y. Piezo1 mediates endothelial atherogenic inflammatory responses via regulation of YAP/TAZ activation. *Hum. Cell* **2021**, *35*, 51–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wong, T.Y.; Juang, W.C.; Tsai, C.T.; Tseng, C.J.; Lee, W.H.; Chang, S.N.; Cheng, P.W. Mechanical Stretching Simulates Cardiac Physiology and Pathology through Mechanosensor Piezo1. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Resta, T.C.; Chicoine, L.G.; Omdahl, J.L.; Walker, B.R. Maintained upregulation of pulmonary eNOS gene and protein expression during recovery from chronic hypoxia. *Am. J. Physiol.* **1999**, *276*, H699–H708. [[CrossRef](#)]
48. Fleming, I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflug. Arch.-Eur. J. Physiol.* **2010**, *459*, 793–806. [[CrossRef](#)]

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

# 1. Effet de l'hypoxie et des forces mécaniques sur les SAC

Mes travaux de thèse ont permis d'étudier l'effet de l'hypoxie et des forces mécaniques sur des canaux mécanosensibles (TRPV4 et Piezo1). Nous avons pu montrer l'influence de la confluence cellulaire en culture sur les réponses de TRPV4 en condition d'hypoxie et l'implication de Piezo1 dans la vasorelaxation des artères pulmonaires au cours du développement de l'HTP.

## 1.1. Modulation de l'activité de TRPV4 en hypoxie selon la confluence

TRPV4, à faible confluence, présentait une activité plus importante en condition d'hypoxie. À l'inverse, à forte confluence, l'activité de TRPV4 était inhibée en condition d'hypoxie. Nous avons montré par différentes approches que le canal était internalisé suite à un conditionnement en hypoxie à forte confluence, expliquant la diminution des réponses au GSK, son agoniste [Figure 43] [137]. En revanche, il serait intéressant de mettre en évidence le mécanisme d'internalisation de TRPV4, notamment à savoir s'il s'agit d'une endocytose ou d'une diminution de l'adressage à la membrane. De précédentes études ont montré que TRPV4 pouvait être adressé à la membrane par deux modes distincts qui sont la fusion partielle de vésicules à la membrane, et la fusion complète [81]. Après stimulation au GSK, une augmentation rapide de la fusion partielle a été observée par rapport à la fusion complète. TRPV4 est ensuite endocytosé et redirigé vers les endosomes via un mécanisme dépendant de la clathrine et régulé par la PI3K et la PKC [81]. Nos résultats de biotinylation de surface confirment que l'adressage de TRPV4 n'est pas modifié en présence d'une forte confluence seule, ni d'un conditionnement à l'hypoxie seul. Cela suggère que TRPV4 est internalisé uniquement lors de la combinaison de ces deux paramètres. Ce mécanisme d'internalisation reste à élucider, et s'il s'agit d'une endocytose, il serait intéressant de voir s'il implique des acteurs comme la clathrine, la cavéoline ou encore la flotilline [Figure 44].

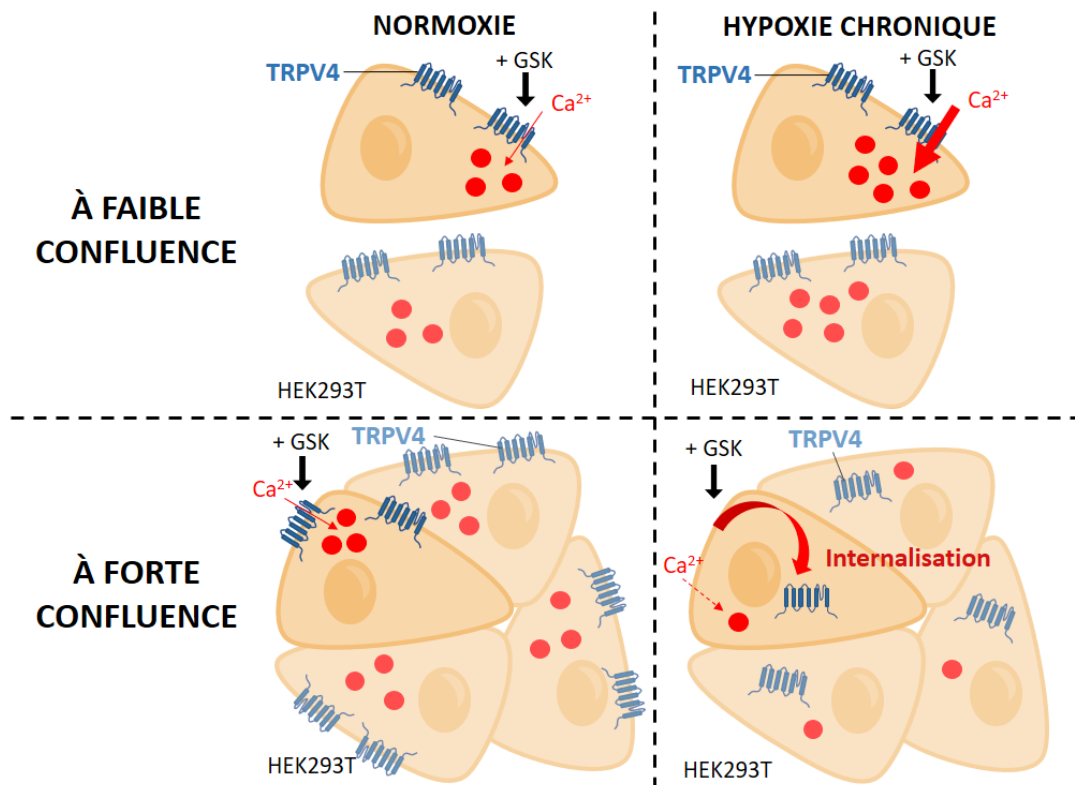


Figure 43 : L'activité de TRPV4 en réponse à l'hypoxie est affectée par la confluence cellulaire.

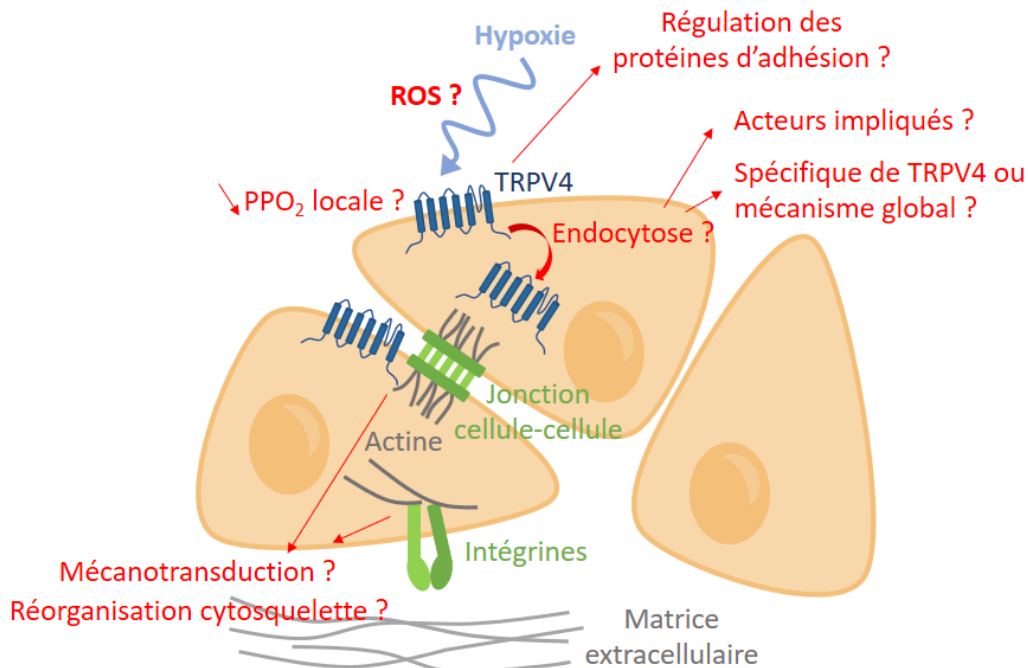


Une autre question qui se pose est de savoir si ce mécanisme est spécifique à TRPV4 ou si c'est un mécanisme global d'endocytose. En effet, de par sa mécanosensibilité, TRPV4 pourrait être particulièrement sensible à une modification de la rigidité membranaire induite par la confluence cellulaire. Mais cette internalisation en condition d'hypoxie à forte confluence pourrait aussi être observée pour d'autres SAC, également sensibles à une modification de la rigidité membranaire, ou plus globalement à d'autres canaux ioniques. De manière générale, l'endocytose est inhibée lorsque la rigidité membranaire est augmentée [142] mais favorisée en condition d'hypoxie [143]. Or, ici TRPV4 est internalisé uniquement en hypoxie chronique à forte confluence, lorsque la rigidité membranaire est augmentée. Ces résultats suggèrent soit que l'hypoxie chronique combinée à une importante rigidité membranaire favorise l'endocytose globale, soit que le mécanisme est spécifique à TRPV4, notamment de par sa sensibilité à l'hypoxie et aux contraintes mécaniques.

Les jonctions cellulaires peuvent également jouer un rôle important dans la mécanotransduction notamment via leur interaction avec le cytosquelette [144]. Une modification de la confluence cellulaire peut ainsi entraîner une modification des tensions perçues par le cytosquelette via ces jonctions cellule-cellule, mais aussi par l'intermédiaire d'intégrines. En effet, les intégrines peuvent activer TRPV4 qui, via la voie de signalisation Rho-ROCK, induit une réorganisation du cytosquelette d'actine et des adhésions focales [145]. De plus, au niveau des invadosomes, TRPV4 interagit avec l'intégrine  $\beta 1$  dont il régule l'activation [139].

La sensibilité de TRPV4 à l'hypoxie pourrait, quant à elle, s'expliquer par l'action des ROS. En effet, TRPV4 possède de nombreuses cystéines, sensibles aux ROS, et il a été montré que TRPV4 était sensible aux ROS via différents points de mutation au niveau de boucles intra- et extracellulaires [139]. Cette sensibilité de TRPV4 aux ROS est impliquée dans la régulation de la fonction de podosomes où TRPV4 active ASK1 (une MAPK sensible aux ROS) et interagit avec MYO1C (myosine impliquée dans le trafic vésiculaire) [139]. Ainsi, TRPV4 peut participer à la régulation de l'adhésion cellulaire, pouvant moduler des protéines d'adhésion en réponse aux stress mécaniques et aux ROS.

Certaines études ont mis en évidence la présence d'une hypoxie localisée au niveau des cellules à forte confluence [146, 147]. En effet, les cellules confluentes présentent un plus haut taux de consommation en oxygène, ainsi qu'une activité HIF-1 $\alpha$  augmentée. En revanche, bien que la PPO<sub>2</sub> locale soit diminuée, les mécanismes impliqués sont différents par rapport à l'hypoxie appliquée sur des cellules à faible confluence, et l'activation de HIF-1 $\alpha$  est indépendante de la voie Akt/mTOR dans les cellules confluentes [147]. Ces résultats suggèrent que des cellules cultivées à forte confluence, en condition d'hypoxie chronique, subissent une hypoxie accrue pouvant expliquer les importantes modifications observées dans les réponses médiées par TRPV4.

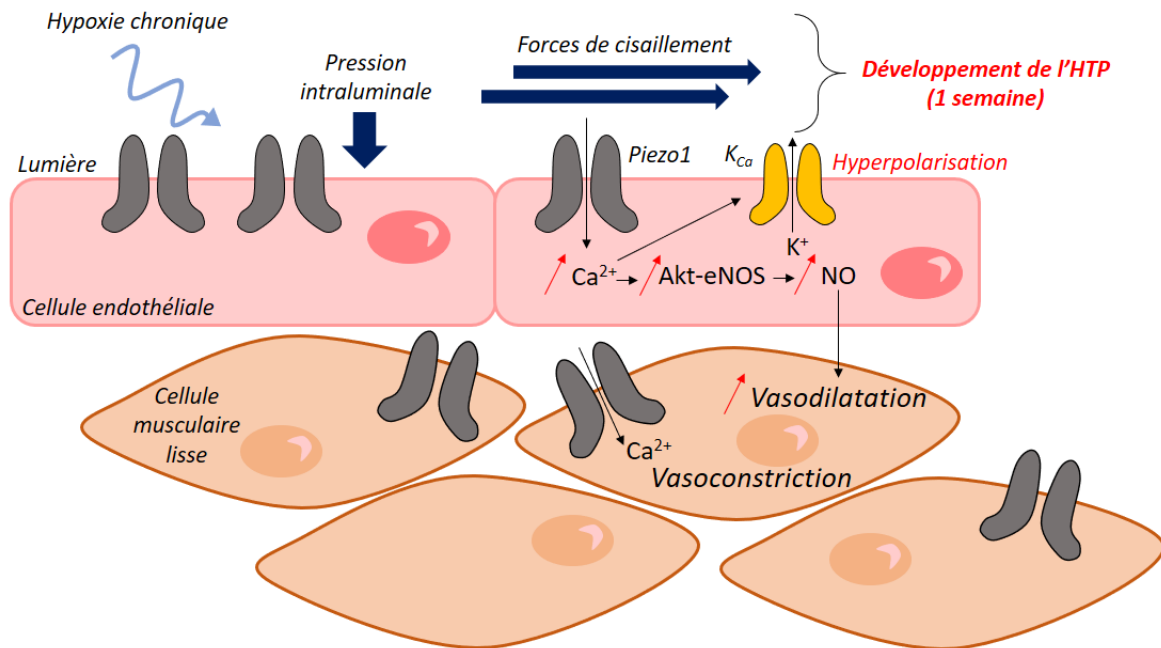


**Figure 44 : Perspectives d'étude sur l'effet de l'hypoxie selon la confluence cellulaire.**

*ROS = espèces réactives de l'oxygène, PPO<sub>2</sub> = pression partielle en dioxygène.*

## 1.2. Implication de Piezo1 dans la relaxation au cours de l'HTP

L'implication d'un autre SAC, Piezo1, a également été démontrée dans le développement de l'HTP de groupe 3 qui implique à la fois l'hypoxie chronique et une augmentation des contraintes mécaniques [141]. En condition de normoxie, l'effet de Piezo1 est plus important dans les CML que dans les CE, conduisant à une contraction des AIP. En revanche, chez des rats placés en hypoxie chronique pendant une semaine, correspondant à un stade précoce de développement de l'HTP, l'activation de Piezo1 entraîne une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CE, une hyperpolarisation des CE ainsi que l'activation de la voie Akt-eNOS. Ces mécanismes peuvent induire une vasorelaxation pouvant contrebalancer l'augmentation de la contraction observée lors de l'HTP. Ainsi, Piezo1 pourrait être impliqué dans un mécanisme de compensation au cours du développement de l'HTP. En effet, après une semaine d'hypoxie, les rats présentent un rapport de Fulton plus élevé (traduisant du remodelage du ventricule droit) sans augmentation significative de la PAPm. L'activation de Piezo1 dans les CE qui sont exposées à des forces de cisaillement pourrait ainsi entraîner une relaxation des vaisseaux via la production de NO [Figure 45].



**Figure 45 : Implication de Piezo1 dans la vasorelaxation au cours du développement de l'HTP.**

## 2. Apport de la technique de BRET

### 2.1. Étude des effets de l'hypoxie et de l'hyperoxie

Lors de ces travaux, nous avons utilisé le BRET comme outil d'étude des canaux ioniques, en complément des techniques de patch-clamp et d'imagerie calcique. Grâce aux différentes constructions utilisées, le BRET nous permet d'investiguer l'interaction des canaux avec des protéines partenaires, des changements de conformation, ou encore le passage d'ions directement au niveau du canal. L'avantage de cette technique basée sur une réaction enzymatique pour produire de la bioluminescence, et ne nécessitant pas d'excitation laser, est la mesure du transfert d'énergie en temps réel dans les cellules vivantes, nous permettant d'étudier l'effet direct de facteurs physiques (comme la température, l'hypoxie, l'étirement, etc.) [Figure 48]. Nous avons ainsi pu étudier les effets de l'hypoxie et de l'hyperoxie chroniques mais aussi de l'hypoxie aiguë sur l'activité de TRPV4 dans des HEK293T en culture. Les résultats obtenus en hypoxie chronique nous ont permis de confirmer l'internalisation de TRPV4 à forte confluence pour les cellules hypoxiques grâce à la construction BRET TRPV4-nLuc + mNeonG-CAAX. En hypoxie aiguë, bien que les réponses au GSK ne soient pas modifiées, la  $[Ca^{2+}]_i$  semble augmentée directement au niveau du canal, et plus globalement au niveau cytosolique. Ainsi, l'exposition transitoire de TRPV4 à l'hypoxie pourrait moduler son activité. Il serait intéressant d'étudier plus en détail l'activation de TRPV4 en condition d'hypoxie aiguë, notamment en patch-clamp où il est possible d'enregistrer des courants en perfusant les cellules avec une solution bullée avec de l'azote [105].

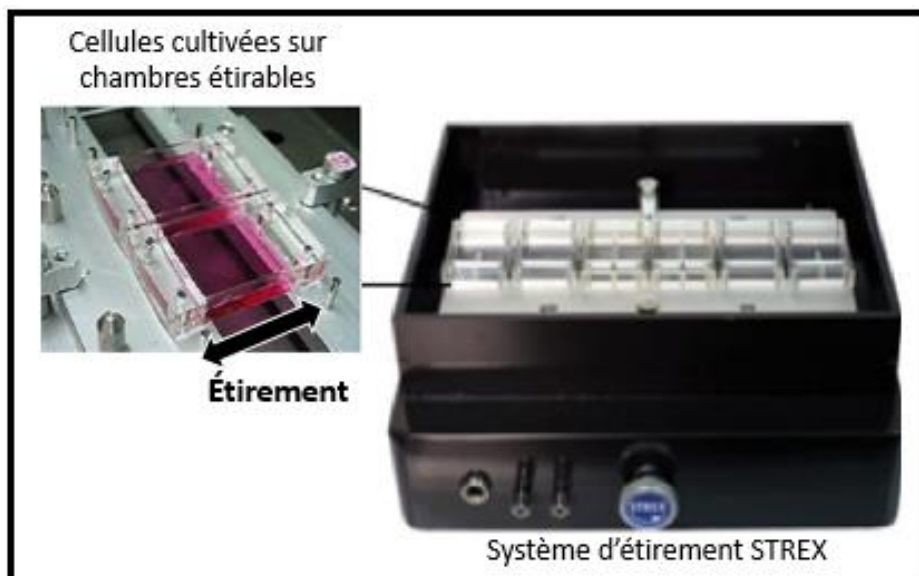
Grâce à la sonde BRET mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4, les effets de l'hypoxie chronique intermédiaire (10 %  $O_2$ ) et de l'hyperoxie chronique (60 %  $O_2$ ) sur les réponses calciques médiées par TRPV4 ont été évalués. Les résultats montrent que l'hypoxie chronique 10 %  $O_2$  n'est pas assez sévère pour induire une modification de la réponse calcique au GSK (100 nM).

Cependant, une plus forte interaction entre TRPV4 et la CaM a été observée (avec la construction TRPV4-nLuc + mNeonG-CaM) pour des concentrations en GSK élevées en hypoxie 10 % O<sub>2</sub> suggérant une potentialisation du canal dans ces conditions. En hyperoxie chronique 60 % O<sub>2</sub>, l'amplitude des réponses calciques médiées par TRPV4 n'est pas non plus modifiée par rapport à la normoxie en réponse à 100 nM de GSK. Pour des concentrations plus élevées en GSK, on retrouve également en hyperoxie une interaction plus importante entre TRPV4 et la CaM. Ainsi, une variation chronique du pourcentage en O<sub>2</sub> pourrait sensibiliser TRPV4 et induire des réponses plus importantes. En effet, lors de nos expériences, cette augmentation de l'interaction avec la CaM avait lieu à partir des réponses à 1 µM de GSK. Il serait intéressant d'investiguer cette potentialisation en réponse à d'autres stimuli plus physiologiques comme des stimuli mécaniques.

## 2.2. Étude des effets de stress mécaniques

En effet, grâce à la technique de BRET, il est possible de regarder l'effet de différents facteurs physiques en direct avec un spectrophotomètre relié à des fibres optiques permettant la mesure du signal de BRET directement dans les incubateurs. Ainsi, nous pourrions évaluer les effets de l'étirement sur l'activation de TRPV4 en normoxie, mais aussi en hypoxie (1 % ou 10 % O<sub>2</sub>), ou encore en hyperoxie.

Pour l'étude de l'étirement, les cellules peuvent être cultivées sur des chambres étirables en silicone (système d'étirement STREX ST-140-10, B-bridge international) [Figure 46] coatées au collagène avant ensemencement pour des CML. Les cellules peuvent ensuite être placées soit en conditions contrôles non étirées dans l'incubateur en normoxie, soit en conditions physiologiques ou pathologiques étirées grâce à l'appareil STREX à la fréquence de 1 Hz (60 cycles par min) 10 ou 20 % respectivement en normoxie ou en hypoxie. Ce modèle a été utilisé avec des CE cultivées à 20 % d'étirement à 1 % O<sub>2</sub> pour mimer les conditions d'HTP [148].

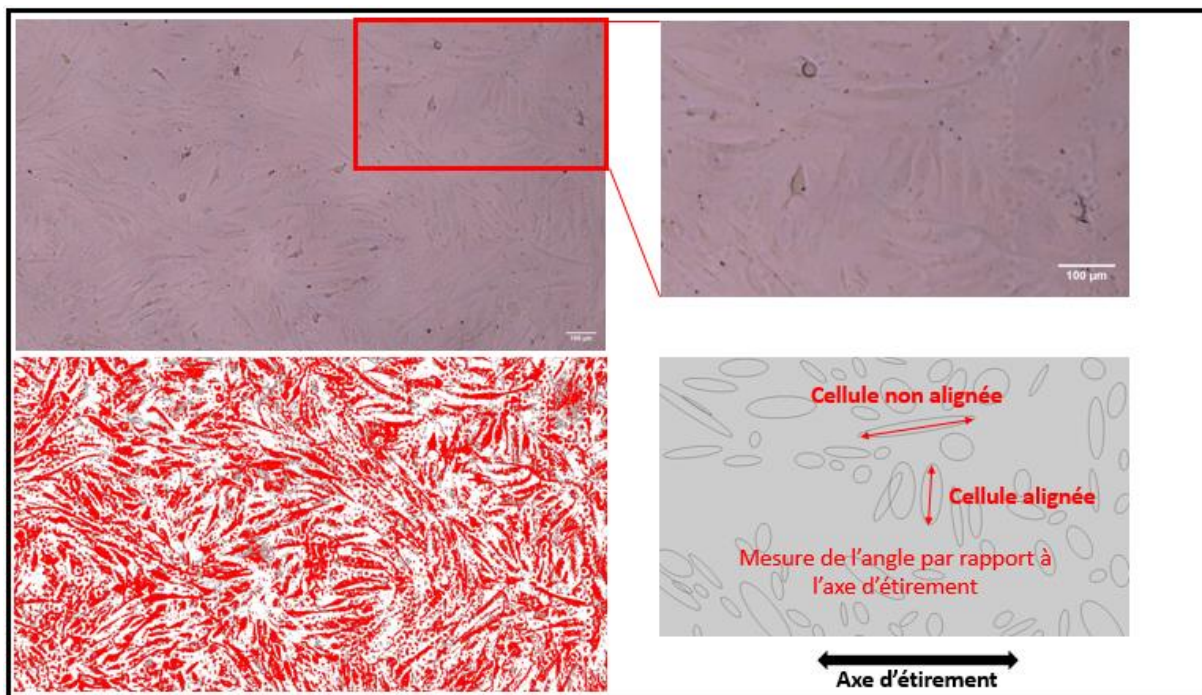


**Figure 46 : Système d'étirement des cellules.**

*Les cellules sont cultivées sur des chambres étirables en silicone préalablement coatées. Une fois placées sur le système d'étirement STREX dans l'incubateur, les chambres peuvent être étirées jusqu'à 20 % à la fréquence de 1 Hz.*



En réponse à l'étirement, différents paramètres peuvent être étudiés, comme les réponses calciques, la prolifération mais aussi l'alignement des cellules. En effet, des CMLAP étirées s'alignent perpendiculairement à l'axe d'étirement [Figure 47], et celui-ci peut être quantifié.



**Figure 47 : Mesure de l'alignement cellulaire.**

Exemple de photos de cellules musculaires lisses humaines cultivées sur des chambres étirables coatées au collagène I prises afin d'évaluer le pourcentage d'alignement des cellules. Une macro a été réalisée sur ImageJ-Fiji où le fond est soustrait et un seuillage est appliqué afin de détecter les cellules (en rouge). Une sélection automatique des cellules est réalisée grâce à leur taille et circularité. Les éventuels artéfacts sélectionnés sont exclus manuellement. Une ellipse est ensuite tracée pour chaque cellule sélectionnée permettant de déterminer son orientation. Les cellules formant un angle de  $90 \pm 30^\circ$  par rapport à l'axe d'étirement sont considérées comme étant alignées.

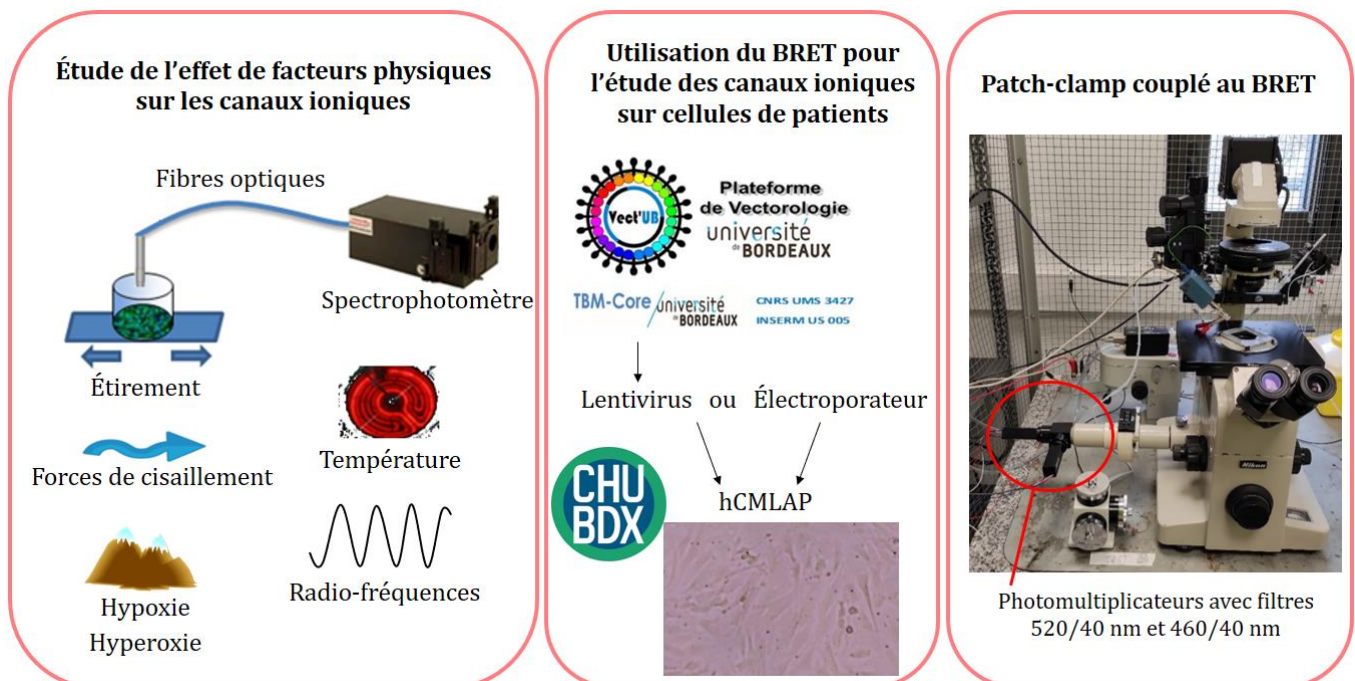
### 2.3. Utilisation de sondes à senseur ionique

Les sondes BRET, en plus de permettre l'étude de l'effet de divers facteurs physiques sur l'activation de canaux ioniques, permettent d'étudier certains aspects spécifiques à l'activation des canaux. Par exemple, pour les sondes de 2<sup>nd</sup>e génération, le senseur utilisé peut différer (comme les sondes à senseur calcique, potassique ou de force ionique développées par l'équipe de Yann Percherancier) permettant l'étude de concentrations ioniques spécifiques au niveau d'un canal d'intérêt. Ces constructions ont permis de mettre en évidence un biais de sélectivité ionique par le ligand pour TRPV1 [149]. En effet, divers agonistes (dont la capsaïcine) induisaient le passage de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{K}^+$  via TRPV1 sans distinction, alors que certains antagonistes (AMG517, AMG21629 et BCTC) inhibaient préférentiellement les influx calciques induits par la capsaïcine par rapport aux efflux potassiques induits par la capsaïcine. L'AMG517 a, par ailleurs, un effet d'agoniste partiel sur l'efflux de  $\text{K}^+$  par TRPV1 et induit une hyperpolarisation dépendante de TRPV1 dans les cellules HEK293T.

## 2.4. Perspectives d'utilisation du BRET

Lors de mes travaux de thèse, toutes les expériences de BRET ont été réalisées sur des cellules HEK293T transfectées avec les différentes constructions d'intérêt. Par la suite, il serait intéressant d'utiliser cette approche sur d'autres cellules dont les hCMLAP. En effet, grâce à une collaboration avec le CHU de Bordeaux, nous avons accès à des cellules de patients (artères pulmonaires issues de lobectomies ou de greffons pulmonaires). C'est pourquoi nous avons déjà fait produire par la plateforme de vectorologie de l'Université de Bordeaux des lentivirus mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4, afin de transduire les hCMLAP à notre disposition. Nous pourrions alors vérifier si les effets de l'hypoxie varient également selon la confluence de ces cellules, et étudier les effets de l'hypoxie aiguë sur des CMLAP. De plus, le laboratoire dispose d'un nouvel électroporateur (Nucleofector, Lonza), qui pourrait permettre de transfecter les hCMLAP plus facilement avec les différentes constructions [Figure 48].

Enfin, dans le cadre de l'étude de canaux ioniques, il serait intéressant de mettre en place un système permettant d'enregistrer des courants ioniques et des signaux de BRET en simultanément sur cellule unique. Ce système couplant les techniques de patch-clamp et de BRET (patch-BRET) permettrait d'étudier de nombreux mécanismes, notamment l'interaction de partenaires avec le canal lors de son activation avec les sondes intermoléculaires, ou encore le passage d'espèces ioniques au niveau du canal avec les sondes de 2<sup>nd</sup>e génération. Un poste de patch-clamp du laboratoire a récemment été équipé de photomultiplicateurs et de filtres adaptés pour la mesure du BRET [Figure 48] et est actuellement en cours d'optimisation pour l'enregistrement de signaux de BRET.



**Figure 48 : Perspectives pour l'utilisation du BRET.**

*BRET = transfert d'énergie en résonance de bioluminescence, hCMLAP = cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires humaines.*

# **CONCLUSION**

Ce travail de thèse a permis l'étude de deux aspects importants impliqués dans le développement de l'HTP que sont l'hypoxie et les contraintes mécaniques.

Nous avons pu mettre en évidence l'influence de la confluence cellulaire sur la réponse de TRPV4 en condition d'hypoxie. Nos résultats montrent l'importance des conditions de culture *in vitro* qui pourraient induire un biais lors des expérimentations. En particulier, la confluence cellulaire lors de l'étude de SAC pouvant moduler les contraintes mécaniques perçues par les cellules, mais aussi en condition d'hypoxie. Ces altérations peuvent ainsi entraîner une modification de la signalisation et des réponses cellulaires associées.

Au niveau vasculaire, Piezo1 endothélial participe à la relaxation au cours du développement de l'HTP de groupe 3, une pathologie qui implique à la fois l'hypoxie chronique, et une augmentation des contraintes mécaniques. Cette relaxation à 1 semaine d'hypoxie chronique pourrait contrebalancer la vasoconstriction des artères pulmonaires lors de la mise en place de la pathologie.

Ainsi, l'activation de SAC comme TRPV4 et Piezo1 en condition d'hypoxie en réponse à un stress mécanique peut jouer un rôle important dans la signalisation calcique et les réponses cellulaires associées. Ces changements peuvent entraîner une modification de la balance vasodilatation / vasoconstriction au niveau des artères pulmonaires au cours du développement de l'HTP. La façon dont TRPV4 est affecté par l'hypoxie et les contraintes mécaniques au niveau vasculaire pulmonaire reste à élucider. C'est pourquoi des études doivent être poursuivies sur des hCMLAP afin de comprendre les réponses médiées par TRPV4 notamment en réponse à l'étirement, et ce, en conditions de normoxie ou d'hypoxie.

Pour cela, les différentes constructions de BRET développées par notre consortium pourront être utilisées. En effet, la technique de BRET comme outil d'étude des canaux ioniques nous a permis d'évaluer différents paramètres grâce à ces différentes constructions. Les sondes 1G permettent d'étudier les changements de conformation des canaux, les sondes intermoléculaires permettent d'étudier les interactions avec une protéine d'intérêt, et les sondes 2G permettent l'étude d'une concentration ionique dans le nanoenvironnement du pore du canal. L'effet de différents facteurs physiques peut ainsi être évalué grâce à ces mesures de BRET en temps réel.

En conclusion, une meilleure compréhension des mécanismes d'activation et de régulation de TRPV4, notamment grâce aux différentes constructions de BRET, permettrait de mieux appréhender son rôle au niveau vasculaire, et son implication dans le développement de l'HTP.



# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Hatano S, Strasser T, Organization WH (1975) Primary pulmonary hypertension : report on a WHO meeting, Geneva, 15-17 October 1973. World Health Organization
2. Weitzenblum E (2003) CHRONIC COR PULMONALE. *Heart* 89:225–230
3. Alves JL, Oleas FG, Souza R (2017) Pulmonary Hypertension: Definition, Classification, and Diagnosis. *Semin Respir Crit Care Med* 38:561–570. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1606577>
4. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H (2009) Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J* 34:888–894. <https://doi.org/10.1183/09031936.00145608>
5. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, Carlsen J, Coats AJS, Escribano-Subias P, Ferrari P, Ferreira DS, Ghofrani HA, Giannakoulas G, Kiely DG, Mayer E, Meszaros G, Nagavci B, Olsson KM, Pepke-Zaba J, Quint JK, Rådegran G, Simonneau G, Sitbon O, Tonia T, Toshner M, Vachiery JL, Vonk Noordegraaf A, Delcroix M, Rosenkranz S, ESC/ERS Scientific Document Group (2022) 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* ehac237. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac237>
6. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R (2019) Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 53:. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
7. Ducret T, Guibert C, Marthan R, Savineau J-P (2008) Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium* 43:315–323. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.05.018>
8. Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, Ohnishi K, Masuda H, Dahan D, Takeya M, Guibert C, Marthan R (2012) Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. *J Vasc Res* 49:33–42. <https://doi.org/10.1159/000329594>
9. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M (2010) Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 121:2747–2754. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.927681>
10. Cussac L-A, Cardouat G, Tiruchellvam Pillai N, Campagnac M, Robillard P, Montillaud A, Guibert C, Gailly P, Marthan R, Quignard J-F, Savineau J-P, Ducret T (2019) TRPV4 channel mediates adventitial fibroblast activation and adventitial remodeling in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00084.2019>
11. Kim D, George MP (2019) Pulmonary Hypertension. *Med Clin North Am* 103:413–423. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.002>
12. Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by

- cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7583–7587. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7583>
13. Gai X, Wei Y, Zhang W, Wuren T, Wang Y, Li Z, Liu S, Ma L, Lu D, Zhou Y, Ge R (2015) Echinacoside induces rat pulmonary artery vasorelaxation by opening the NO-cGMP-PKG-BKCa channels and reducing intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *Acta Pharmacol Sin* 36:587–596. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.126>
  14. Loirand G, Pacaud P (2014) Involvement of Rho GTPases and their regulators in the pathogenesis of hypertension. *Small GTPases* 5:1–10. <https://doi.org/10.4161/sgtp.28846>
  15. Boutou AK, Pitsiou G (2020) Treatment of pulmonary hypertension with riociguat: a review of current evidence and future perspectives. *Expert Opin Pharmacother* 1–11. <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1727446>
  16. Bedan M, Grimm D, Wehland M, Simonsen U, Infanger M, Krüger M (2018) A Focus on Macitentan in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 123:103–113. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13033>
  17. Del Pozo R, Hernandez Gonzalez I, Escribano-Subias P (2017) The prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension: a clinical review. *Expert Rev Respir Med* 11:491–503. <https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1317599>
  18. Parpaite T, Cardouat G, Mauroux M, Gillibert-Duplantier J, Robillard P, Quignard J-F, Marthan R, Savineau J-P, Ducret T (2016) Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 468:111–130. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1704-6>
  19. Naruse K, Yamada T, Sokabe M (1998) Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *Am J Physiol* 274:H1532–1538. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1532>
  20. Bonnet S, Dumas-de-La-Roque E, Bégueret H, Marthan R, Fayon M, Dos Santos P, Savineau J-P, Baulieu E-E (2003) Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9488–9493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633724100>
  21. McCarron JG, Chalmers S, Bradley KN, MacMillan D, Muir TC (2006) Ca<sup>2+</sup> microdomains in smooth muscle. *Cell Calcium* 40:461–493. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.010>
  22. Guibert C, Ducret T, Savineau J-P (2008) Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 98:10–23. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.05.001>
  23. Gilbert G, Ducret T, Marthan R, Savineau J-P, Quignard J-F (2014) Stretch-induced Ca<sup>2+</sup> signalling in vascular smooth muscle cells depends on Ca<sup>2+</sup> store segregation. *Cardiovasc Res* 103:313–323. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu069>
  24. Christensen AP, Corey DP (2007) TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci* 8:510–521. <https://doi.org/10.1038/nrn2149>

25. Barbeau S, Gilbert G, Cardouat G, Baudrimont I, Freund-Michel V, Guibert C, Marthan R, Vacher P, Quignard J-F, Ducret T (2021) Mechanosensitivity in Pulmonary Circulation: Pathophysiological Relevance of Stretch-Activated Channels in Pulmonary Hypertension. 24
26. Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B (2005) Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* 1:85–92. <https://doi.org/10.1038/nchembio0705-85>
27. Ducret T, El Arrouchi J, Courtois A, Quignard J-F, Marthan R, Savineau J-P (2010) Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell Calcium* 48:251–259. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.011>
28. Hanukoglu I (2017) ASIC and ENaC type sodium channels: conformational states and the structures of the ion selectivity filters. *FEBS J* 284:525–545. <https://doi.org/10.1111/febs.13840>
29. Tang QY, Qi Z, Naruse K, Sokabe M (2003) Characterization of a functionally expressed stretch-activated BKca channel cloned from chick ventricular myocytes. *J Membr Biol* 196:185–200. <https://doi.org/10.1007/s00232-003-0637-8>
30. Leblanc N, Forrest AS, Ayon RJ, Wiwchar M, Angermann JE, Pritchard HAT, Singer CA, Valencik ML, Britton F, Greenwood IA (2015) Molecular and functional significance of Ca(2+)-activated Cl(-) channels in pulmonary arterial smooth muscle. *Pulm Circ* 5:244–268. <https://doi.org/10.1086/680189>
31. Bulley S, Neeb ZP, Burris SK, Bannister JP, Thomas-Gatewood CM, Jangsangthong W, Jaggar JH (2012) TMEM16A/ANO1 channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries. *Circ Res* 111:1027–1036. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.277145>
32. Emir TLR (2017) *Neurobiology of TRP Channels*, 2nd ed. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL)
33. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285–287. <https://doi.org/10.1038/224285a0>
34. Minke B, Wu C, Pak WL (1975) Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258:84–87. <https://doi.org/10.1038/258084a0>
35. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>
36. Nilius B, Watanabe H, Vriens J (2003) The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Pflugers Arch* 446:298–303. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1028-9>
37. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>



38. Geffeney S (2017) Sensory Mechanotransduction and Thermotransduction in Invertebrates. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 65–84
39. Katz B, Payne R, Minke B (2017) TRP Channels in Vision. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 27–63
40. Moore C, Liedtke WB (2017) Osmomechanical-Sensitive TRPV Channels in Mammals. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 85–94
41. Sidney A. S, Ranier R (2017) TRP Channels at the Periphery of the Taste and Trigeminal Systems. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 113–124
42. Yang P, Feng J, Luo J, Madison M, Hu H (2017) A Critical Role for TRP Channels in the Skin. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 95–111
43. Chubanov V, Kubanek S, Fiedler S, Mittermeier L, Gudermann T, Dietrich A (2017) Renal Functions of TRP Channels in Health and Disease. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 187–212
44. Seghers F, Yerna X, Zanou N, Devuyst O, Vennekens R, Nilius B, Gailly P (2016) TRPV4 participates in pressure-induced inhibition of renin secretion by juxtaglomerular cells. *J Physiol* 594:7327–7340. <https://doi.org/10.1113/JP273595>
45. Galdani R, Seghers F, Yerna X, Schakman O, Tajeddine N, Achouri Y, Tissir F, Devuyst O, Gailly P (2020) Mechanical activation of TRPV4 channels controls albumin reabsorption by proximal tubule cells. *Sci Signal* 13:eabc6967. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abc6967>
46. Philippaert K, Vennekens R (2017) The Role of TRP Channels in the Pancreatic Beta-Cell. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 229–250
47. Sawamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S (2017) TRP Channels in the Brain. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 295–322
48. Freichel M, Berlin M, Schürger A, Mathar I, Bacmeister L, Medert R, Frede W, Marx A, Segin S, Londoño JEC (2017) TRP Channels in the Heart. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 149–185
49. Wallace H (2017) Airway Pathogenesis Is Linked to TRP Channels. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton : CRC Press, 2017., pp 251–264
50. Negri S, Faris P, Berra-Romani R, Guerra G, Moccia F (2019) Endothelial Transient Receptor Potential Channels and Vascular Remodeling: Extracellular Ca<sup>2+</sup> Entry for

Angiogenesis, Arteriogenesis and Vasculogenesis. *Front Physiol* 10:1618. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01618>

51. Yang X-R, Lin M-J, McIntosh LS, Sham JSK (2006) 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* 290:L1267-1276. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00515.2005>
52. Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature Cell Biology* 2:695–702. <https://doi.org/10.1038/35036318>
53. Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B (2002) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277:47044–47051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208277200>
54. Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103:525–535. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00143-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00143-4)
55. Wissenbach U, Bödding M, Freichel M, Flockerzi V (2000) Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett* 485:127–134. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02212-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02212-2)
56. Plant TD, Strotmann R (2007) TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation. In: Liedtke WB, Heller S (eds) *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL)
57. Cheng W, Yang F, Takanishi CL, Zheng J (2007) Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties. *J Gen Physiol* 129:191–207. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709731>
58. Ma X, Cheng K-T, Wong C-O, O’Neil RG, Birnbaumer L, Ambudkar IS, Yao X (2011) Heteromeric TRPV4-C1 channels contribute to store-operated Ca(2+) entry in vascular endothelial cells. *Cell Calcium* 50:502–509. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.08.006>
59. Goldenberg NM, Wang L, Ranke H, Liedtke W, Tabuchi A, Kuebler WM (2015) TRPV4 Is Required for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Anesthesiology* 122:1338–1348. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000647>
60. Baratchi S, Almazi JG, Darby W, Tovar-Lopez FJ, Mitchell A, McIntyre P (2016) Shear stress mediates exocytosis of functional TRPV4 channels in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 73:649–666. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2018-8>
61. Darby WG, Potocnik S, Ramachandran R, Hollenberg MD, Woodman OL, McIntyre P (2018) Shear stress sensitizes TRPV4 in endothelium-dependent vasodilatation. *Pharmacol Res* 133:152–159. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.05.009>

62. Garcia-Elias A, Mrkonjić S, Jung C, Pardo-Pastor C, Vicente R, Valverde MA (2014) The TRPV4 channel. *Handb Exp Pharmacol* 222:293–319. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_12)
63. Thorneloe KS, Sulpizio AC, Lin Z, Figueroa DJ, Clouse AK, McCafferty GP, Chendrimada TP, Lashinger ESR, Gordon E, Evans L, Misajet BA, Demarini DJ, Nation JH, Casillas LN, Marquis RW, Votta BJ, Sheardown SA, Xu X, Brooks DP, Laping NJ, Westfall TD (2008) N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *J Pharmacol Exp Ther* 326:432–442. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.139295>
64. Rahman M, Mukherjee S, Sheng W, Nilius B, Janssen LJ (2016) Electrophysiological characterization of voltage-dependent calcium currents and TRPV4 currents in human pulmonary fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310:L603-614. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00426.2015>
65. Shibasaki K (2020) TRPV4 activation by thermal and mechanical stimuli in disease progression. *Lab Invest*. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0362-2>
66. Ottolini M, Daneva Z, Chen Y-L, Cope EL, Kasetti RB, Zode GS, Sonkusare SK (2020) Mechanisms underlying selective coupling of endothelial Ca<sup>2+</sup> signals with eNOS vs. IK/SK channels in systemic and pulmonary arteries. *J Physiol (Lond)* 598:3577–3596. <https://doi.org/10.1113/JP279570>
67. Song S, Yamamura A, Yamamura H, Ayon RJ, Smith KA, Tang H, Makino A, Yuan JX-J (2014) Flow shear stress enhances intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol, Cell Physiol* 307:C373-383. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00115.2014>
68. Dahan D, Ducret T, Quignard J-F, Marthan R, Savineau J-P, Estève E (2012) Implication of the ryanodine receptor in TRPV4-induced calcium response in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303:L824-833. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00244.2011>
69. Xia Y, Fu Z, Hu J, Huang C, Paudel O, Cai S, Liedtke W, Sham JSK (2013) TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 305:C704-715. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00099.2013>
70. Yao Z, Wang C (2019) A Novel Mechanism of Sildenafil Improving the Excessive Proliferation and H<sub>2</sub>S Production in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 74:355–363. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000714>
71. Mori A, Takeda K, Sakamoto K, Nakahara T (2019) Activation of transient receptor potential vanilloid 4 channels dilates rat retinal arterioles through nitric oxide- and BKCa channel-dependent mechanisms in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01707-1>
72. Kanugula AK, Adapala RK, Midha P, Cappelli HC, Meszaros JG, Paruchuri S, Chilian WM, Thodeti CK (2019) Novel noncanonical regulation of soluble VEGF/VEGFR2

- signaling by mechanosensitive ion channel TRPV4. *The FASEB Journal* 33:195–203. <https://doi.org/10.1096/fj.201800509R>
73. Yang X-R, Lin AHY, Hughes JM, Flavahan NA, Cao Y-N, Liedtke W, Sham JSK (2012) Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302:L555-568. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00005.2011>
  74. Martin E, Dahan D, Cardouat G, Gillibert-Duplantier J, Marthan R, Savineau J-P, Ducret T (2012) Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 464:261–272. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1136-5>
  75. Suresh K, Servinsky L, Jiang H, Bigam Z, Yun X, Kliment C, Huetsch J, Damarla M, Shimoda LA (2018) Reactive oxygen species induced Ca<sup>2+</sup> influx via TRPV4 and microvascular endothelial dysfunction in the SU5416/hypoxia model of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 314:L893–L907. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00430.2017>
  76. Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T (2010) Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PLoS ONE* 5:e11654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011654>
  77. Arora PD, Di Gregorio M, He P, McCulloch CA (2017) TRPV4 mediates the Ca<sup>2+</sup> influx required for the interaction between flightless-1 and non-muscle myosin, and collagen remodeling. *J Cell Sci* 130:2196–2208. <https://doi.org/10.1242/jcs.201665>
  78. Matthews BD, Thodeti CK, Tytell JD, Mammoto A, Overby DR, Ingber DE (2010) Ultra-rapid activation of TRPV4 ion channels by mechanical forces applied to cell surface beta1 integrins. *Integr Biol (Camb)* 2:435–442. <https://doi.org/10.1039/c0ib00034e>
  79. Wang Y, Fu X, Gaiser S, Köttgen M, Kramer-Zucker A, Walz G, Wegierski T (2007) OS-9 regulates the transit and polyubiquitination of TRPV4 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 282:36561–36570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703903200>
  80. Cuajungco MP, Grimm C, Oshima K, D'hoedt D, Nilius B, Mensenkamp AR, Bindels RJM, Plomann M, Heller S (2006) PACSINs bind to the TRPV4 cation channel. PACSIN 3 modulates the subcellular localization of TRPV4. *J Biol Chem* 281:18753–18762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602452200>
  81. Baratchi S, Keov P, Darby WG, Lai A, Khoshmanesh K, Thurgood P, Vahidi P, Ejendal K, McIntyre P (2019) The TRPV4 Agonist GSK1016790A Regulates the Membrane Expression of TRPV4 Channels. *Front Pharmacol* 10:6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00006>
  82. Shukla AK, Kim J, Ahn S, Xiao K, Shenoy SK, Liedtke W, Lefkowitz RJ (2010) Arresting a transient receptor potential (TRP) channel: beta-arrestin 1 mediates ubiquitination and functional down-regulation of TRPV4. *J Biol Chem* 285:30115–30125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141549>
  83. Chin D, Means AR (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10:322–328. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01800-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01800-6)



84. Yang C, Jas GS, Kuczera K (2004) Structure, dynamics and interaction with kinase targets: computer simulations of calmodulin. *Biochim Biophys Acta* 1697:289–300. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.032>
85. Zhu MX (2005) Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch* 451:105–115. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1427-1>
86. Kuchan MJ, Frangos JA (1994) Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol* 266:C628–636. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.3.C628>
87. Strotmann R, Semtner M, Kepura F, Plant TD, Schöneberg T (2010) Interdomain interactions control Ca<sup>2+</sup>-dependent potentiation in the cation channel TRPV4. *PLoS One* 5:e10580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010580>
88. Garcia-Elias A, Lorenzo IM, Vicente R, Valverde MA (2008) IP<sub>3</sub> receptor binds to and sensitizes TRPV4 channel to osmotic stimuli via a calmodulin-binding site. *J Biol Chem* 283:31284–31288. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800184200>
89. Strotmann R, Schultz G, Plant TD (2003) Ca<sup>2+</sup>-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal calmodulin binding site. *J Biol Chem* 278:26541–26549. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302590200>
90. Phelps CB, Wang RR, Choo SS, Gaudet R (2010) Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *J Biol Chem* 285:731–740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052548>
91. Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B (2002) Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* 277:13569–13577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200062200>
92. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330:55–60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>
93. Zhao Q, Zhou H, Chi S, Wang Y, Wang J, Geng J, Wu K, Liu W, Zhang T, Dong M-Q, Wang J, Li X, Xiao B (2018) Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel. *Nature* 554:487–492. <https://doi.org/10.1038/nature25743>
94. Zhao Q, Zhou H, Li X, Xiao B (2019) The mechanosensitive Piezo1 channel: a three-bladed propeller-like structure and a lever-like mechanogating mechanism. *FEBS J* 286:2461–2470. <https://doi.org/10.1111/febs.14711>
95. Lhomme A, Gilbert G, Pele T, Deweirdt J, Henrion D, Baudrimont I, Campagnac M, Marthan R, Guibert C, Ducret T, Savineau J-P, Quignard J-F (2019) Stretch-activated Piezo1 Channel in Endothelial Cells Relaxes Mouse Intrapulmonary Arteries. *Am J Respir Cell Mol Biol* 60:650–658. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0197OC>
96. Ranade SS, Qiu Z, Woo S-H, Hur SS, Murthy SE, Cahalan SM, Xu J, Mathur J, Bandell M, Coste B, Li Y-SJ, Chien S, Patapoutian A (2014) Piezo1, a mechanically activated ion

- channel, is required for vascular development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:10347–10352. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409233111>
97. Wang S, Chennupati R, Kaur H, Iring A, Wettschureck N, Offermanns S (2016) Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. *J Clin Invest* 126:4527–4536. <https://doi.org/10.1172/JCI87343>
  98. Liao J, Lu W, Chen Y, Duan X, Zhang C, Luo X, Lin Z, Chen J, Liu S, Yan H, Chen Y, Feng H, Zhou D, Chen X, Zhang Z, Yang Q, Liu X, Tang H, Li J, Makino A, Yuan JX-J, Zhong N, Yang K, Wang J (2021) Upregulation of Piezo1 (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1) Enhances the Intracellular Free Calcium in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells From Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patients. *Hypertension* 77:1974–1989. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16629>
  99. Place TL, Domann FE, Case AJ (2017) Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radical Biology and Medicine* 113:311–322. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003>
  100. Allen CB, Schneider BK, White CW (2001) Limitations to oxygen diffusion and equilibration in in vitro cell exposure systems in hyperoxia and hypoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 281:L1021–L1027. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.4.L1021>
  101. Li R, Jia Z, Trush MA (2016) Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex)* 1:9–21. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>
  102. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 94:909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>
  103. Fuhrmann DC, Brüne B (2017) Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol* 12:208–215. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.012>
  104. Dard L, Blanchard W, Hubert C, Lacombe D, Rossignol R (2020) Mitochondrial functions and rare diseases. *Mol Aspects Med* 71:100842. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.100842>
  105. Kim KS, Yoo HY, Park KS, Kim JK, Zhang Y-H, Kim SJ (2012) Differential effects of acute hypoxia on the activation of TRPV1 by capsaicin and acidic pH. *J Physiol Sci* 62:93–103. <https://doi.org/10.1007/s12576-011-0185-4>
  106. Nishio N, Taniguchi W, Sugimura YK, Takiguchi N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Yamada H, Miyazaki N, Yoshida M, Nakatsuka T (2013) Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. *Neuroscience* 247:201–212. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.023>
  107. Kim HJ, Yoo HY, Jang JH, Lin HY, Seo EY, Zhang YH, Kim SJ (2016) Wall stretch and thromboxane A2 activate NO synthase (eNOS) in pulmonary arterial smooth muscle cells via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Akt-dependent phosphorylation. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 468:705–716. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1778-1>

108. Ristoiu V, Shibasaki K, Uchida K, Zhou Y, Ton B-HT, Flonta M-L, Tominaga M (2011) Hypoxia-induced sensitization of transient receptor potential vanilloid 1 involves activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and PKC. *Pain* 152:936–945. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.02.024>
109. Gore A, Muralidhar M, Espey MG, Degenhardt K, Mantell LL (2010) Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease. *J Immunotoxicol* 7:239–254. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2010.492254>
110. Rajput VD, Harish null, Singh RK, Verma KK, Sharma L, Quiroz-Figueroa FR, Meena M, Gour VS, Minkina T, Sushkova S, Mandzhieva S (2021) Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology (Basel)* 10:267. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
111. Ottolenghi S, Sabbatini G, Brizzolari A, Samaja M, Chiumello D (2020) Hyperoxia and oxidative stress in anesthesia and critical care medicine. *Minerva Anestesiol* 86:64–75. <https://doi.org/10.23736/S0375-9393.19.13906-5>
112. Brugniaux JV, Coombs GB, Barak OF, Dujic Z, Sekhon MS, Ainslie PN (2018) Highs and lows of hyperoxia: physiological, performance, and clinical aspects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 315:R1–R27. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00165.2017>
113. Dias-Freitas F, Metelo-Coimbra C, Roncon-Albuquerque R (2016) Molecular mechanisms underlying hyperoxia acute lung injury. *Respir Med* 119:23–28. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2016.08.010>
114. Dumas de la Roque E, Smeralda G, Quignard J-F, Freund-Michel V, Courtois A, Marthan R, Muller B, Guibert C, Dubois M (2017) Altered vasoreactivity in neonatal rats with pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia: Implication of both eNOS phosphorylation and calcium signaling. *PLoS One* 12:e0173044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173044>
115. Mori Y, Takahashi N, Kurokawa T, Kiyonaka S (2017) TRP channels in oxygen physiology: distinctive functional properties and roles of TRPA1 in O<sub>2</sub> sensing. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 93:464–482. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.028>
116. Jaasma MJ, Jackson WM, Keaveny TM (2006) The Effects of Morphology, Confluency, and Phenotype on Whole-Cell Mechanical Behavior. *Ann Biomed Eng* 34:759–768. <https://doi.org/10.1007/s10439-005-9052-x>
117. Amoozadeh Y, Anwer S, Dan Q, Venugopal S, Shi Y, Branchard E, Liedtke E, Ailenberg M, Rotstein OD, Kapus A, Szász K (2018) Cell confluence regulates claudin-2 expression: possible role for ZO-1 and Rac. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 314:C366–C378. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00234.2017>
118. Pavel M, Renna M, Park SJ, Menzies FM, Ricketts T, Füllgrabe J, Ashkenazi A, Frake RA, Lombarte AC, Bento CF, Franze K, Rubinsztein DC (2018) Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. *Nat Commun* 9:2961. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05388-x>
119. Koizumi T, Hikiji H, Shin WS, Takato T, Fukuda S, Abe T, Koshikiya N, Iwasawa K, Toyo-oka T (2003) Cell Density and Growth-dependent Down-regulation of Both

- Intracellular Calcium Responses to Agonist Stimuli and Expression of Smooth-surfaced Endoplasmic Reticulum in MC3T3-E1 Osteoblast-like Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278:6433–6439. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210243200>
120. Kaya AI, Onaran HO, Özcan G, Ambrosio C, Costa T, Balli S, Ugur Ö (2012) Cell contact-dependent functional selectivity of  $\beta$ 2-adrenergic receptor ligands in stimulating cAMP accumulation and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 287:6362–6374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301820>
  121. Belacel-Ouari M, Zhang L, Hubert F, Assaly R, Gerbier R, Jockers R, Dauphin F, Lechêne P, Fischmeister R, Manoury B, Leblais V (2017) Influence of cell confluence on the cAMP signalling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cellular Signalling* 35:118–128. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.03.025>
  122. Kavaliauskiene S, Nymark C-M, Bergan J, Simm R, Sylvänne T, Simolin H, Ekroos K, Skotland T, Sandvig K (2014) Cell density-induced changes in lipid composition and intracellular trafficking. *Cell Mol Life Sci* 71:1097–1116. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1441-y>
  123. Corvera S, DiBonaventura C, Shpetner HS (2000) Cell Confluence-dependent Remodeling of Endothelial Membranes Mediated by Cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* 275:31414–31421. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001708200>
  124. Lakk M, Hoffmann GF, Gorusupudi A, Enyong E, Lin A, Bernstein PS, Toft-Bertelsen T, MacAulay N, Elliott MH, Križaj D (2021) Membrane cholesterol regulates TRPV4 function, cytoskeletal expression, and the cellular response to tension. *Journal of Lipid Research* 62:100145. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100145>
  125. Farhat E, Devereaux MEM, Pamerter ME, Weber J-M (2020) Naked mole-rats suppress energy metabolism and modulate membrane cholesterol in chronic hypoxia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 319:R148–R155. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00057.2020>
  126. Sharma D, Barhwal KK, Biswal SN, Srivastava AK, Bhardwaj P, Kumar A, Chaurasia OP, Hota SK (2019) Hypoxia-mediated alteration in cholesterol oxidation and raft dynamics regulates BDNF signalling and neurodegeneration in hippocampus. *J Neurochem* 148:238–251. <https://doi.org/10.1111/jnc.14609>
  127. Parpaite T (2015) Rôle de l'environnement cellulaire sur les canaux sensibles à l'étirement dans l'hypertension pulmonaire. Theses, Université de Bordeaux
  128. Dick AS, Ivanovska J, Kantores C, Belcastro R, Keith Tanswell A, Jankov RP (2013) Cyclic stretch stimulates nitric oxide synthase-1-dependent peroxynitrite formation by neonatal rat pulmonary artery smooth muscle. *Free Radic Biol Med* 61:310–319. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.027>
  129. Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B, Bouvier M (2006) Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci Chapter 5:Unit 5.23*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0523s34>



130. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85–100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
131. Förster T (1946) Energy migration and fluorescence. 1946. *J Biomed Opt* 17:011002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.1.011002>
132. Wilson T, Hastings JW (1998) Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:197–230. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.197>
133. Harvey EN (1919) STUDIES ON BIOLUMINESCENCE : IX. CHEMICAL NATURE OF CYPRIDINA LUCIFERIN AND CYPRIDINA LUCIFERASE. *J Gen Physiol* 1:269–293. <https://doi.org/10.1085/jgp.1.3.269>
134. England CG, Ehlerding EB, Cai W (2016) NanoLuc: A Small Luciferase is Brightening up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug Chem* 27:1175–1187. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00112>
135. Coutant EP, Gagnot G, Hervin V, Baatallah R, Goyard S, Jacob Y, Rose T, Janin YL (2020) Bioluminescence Profiling of NanoKAZ/NanoLuc Luciferase Using a Chemical Library of Coelenterazine Analogues. *Chemistry* 26:948–958. <https://doi.org/10.1002/chem.201904844>
136. Jiang T, Du L, Li M (2016) Lighting up bioluminescence with coelenterazine: strategies and applications. *Photochem Photobiol Sci* 15:466–480. <https://doi.org/10.1039/c5pp00456j>
137. Barbeau S, Joushomme A, Chappe Y, Cardouat G, Baudrimont I, Freund-Michel V, Guibert C, Marthan R, Berger P, Vacher P, Percherancier Y, Quignard J-F, Ducret T (2022) Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia. 23
138. Garcia-Elias A, Lorenzo IM, Vicente R, Valverde MA (2008) IP3 receptor binds to and sensitizes TRPV4 channel to osmotic stimuli via a calmodulin-binding site. *J Biol Chem* 283:31284–31288. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800184200>
139. Vellino S, Oddou C, Rivier P, Boyault C, Hiriart-Bryant E, Kraut A, Martin R, Coute Y, Knölker H-J, Valverde MA, Albigès-Rizo C, Destaing O (2021) Cross-talk between the calcium channel TRPV4 and reactive oxygen species interlocks adhesive and degradative functions of invadosomes. *J Cell Biol* 220:e201910079. <https://doi.org/10.1083/jcb.201910079>
140. Chappe Y, Michel P, Joushomme A, Barbeau S, Pierredon S, Baron L, Garenne A, Poullietier De Gannes F, Hurtier A, Mayer S, Lagroye I, Quignard J-F, Ducret T, Compan V, Franchet C, Percherancier Y (2021) High-throughput screening of TRPV1 ligands in the light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer technique. *Mol Pharmacol* MOLPHARM-AR-2021-000271. <https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000271>
141. Porto Ribeiro T, Barbeau S, Baudrimont I, Vacher P, Freund-Michel V, Cardouat G, Berger P, Guibert C, Ducret T, Quignard J-F (2022) Piezo1 Channel Activation Reverses Pulmonary Artery Vasoconstriction in an Early Rat Model of Pulmonary Hypertension: The Role of Ca<sup>2+</sup> Influx and Akt-eNOS Pathway. *Cells* 11:2349. <https://doi.org/10.3390/cells11152349>

142. Joseph JG, Liu AP (2020) Mechanical Regulation of Endocytosis: New Insights and Recent Advances. *Adv Biosys* 4:1900278. <https://doi.org/10.1002/adbi.201900278>
143. López-Hernández T, Haucke V, Maritzen T (2020) Endocytosis in the adaptation to cellular stress. *CST* 4:230–247. <https://doi.org/10.15698/cst2020.10.232>
144. Angulo-Urarte A, van der Wal T, Huveneers S (2020) Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862:183316. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183316>
145. Lakk M, Križaj D (2021) TRPV4-Rho signaling drives cytoskeletal and focal adhesion remodeling in trabecular meshwork cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 320:C1013–C1030. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00599.2020>
146. Bilton RL, Booker GW (2003) The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF $\alpha$ ) regulation. *Eur J Biochem* 270:791–798. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03446.x>
147. Dayan F, Bilton RL, Laferrière J, Trottier E, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM (2009) Activation of HIF-1 $\alpha$  in exponentially growing cells via hypoxic stimulation is independent of the Akt/mTOR pathway. *J Cell Physiol* 218:167–174. <https://doi.org/10.1002/jcp.21584>
148. Deweirdt J, Ducret T, Quignard J-F, Freund-Michel V, Lacomme S, Gontier E, Muller B, Marthan R, Guibert C, Baudrimont I (2022) Effects of FW2 Nanoparticles Toxicity in a New In Vitro Pulmonary Vascular Cells Model Mimicking Endothelial Dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 22:14–28. <https://doi.org/10.1007/s12012-021-09679-6>
149. Chappe YL, Pierredon S, Joushomme A, Molle P, Garenne A, Canovi A, Barbeau S, Poulletier De Gannes F, Hurtier A, Lagroye I, Ducret T, Quignard J-F, Compan V, Percherancier Y (2022) Genetically-encoded BRET probes shed light on ligand bias-induced variable ion selectivity in TRPV1 and P2X5/7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119:e2205207119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2205207119>

# **ANNEXES**

## Publications

T. Hof, **S. Barbeau\***, D. Benoist\*, T. Ducret, R. Guinamard, O. Bernus, S. Chaigne. *Physiopathological roles of TRPV4 channel in the cardiac tissue*. Revue (en préparation).

Y. Chappe, S. Pierredon, A. Joushomme, P. Molle, A. Garenne, A. Canovi, **S. Barbeau**, F. Poullétier De Gannes, A. Hurtier, I. Lagroye, T. Ducret, J-F. Quignard, V. Compan, Y. Percherancier. *Genetically-Encoded Bret Probes Enlight Ligand Bias-Induced Variable Ion Selectivity in Trpv1 and P2X5/7*. PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences) 2022.

T. Porto-Ribeiro, **S. Barbeau**, I. Baudrimont, P. Vacher, V. Freund-Michel, G. Cardouat, P. Berger, C. Guibert, T. Ducret, J-F. Quignard. *Piezo1 channel activation reverses pulmonary artery vasoconstriction in an early rat model of pulmonary hypertension: the role of Ca<sup>2+</sup> influx and Akt-eNOS pathway*. Cells 2022.

**S. Barbeau**, A. Joushomme\*, Y. Chappe\*, G. Cardouat, I. Baudrimont, V. Freund-Michel, C. Guibert, R. Marthan, P. Berger, P. Vacher, Y. Percherancier, J-F. Quignard, T. Ducret. *Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia*. Biomolecules 2022.

**S. Barbeau**, G. Gilbert, G. Cardouat, I. Baudrimont, V. Freund-Michel, C. Guibert, R. Marthan, P. Vacher, J-F. Quignard, T. Ducret. *Mechanosensitivity in pulmonary circulation: pathophysiological relevance of stretch-activated channels in pulmonary hypertension*. Revue, Biomolecules 2021.

Y. Chappe, P. Michel, A. Joushomme, **S. Barbeau**, S. Pierredon, L. Baron, A. Garenne, F. Poullétier De Gannes, A. Hurtier, S. Mayer, I. Lagroye, J-F. Quignard, T. Ducret, V. Compan, C. Franchet, Y. Percherancier. *High-throughput screening of TRPV1 ligands in the light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer technique*. Molecular pharmacology 2021.

## Article de vulgarisation

**S. Barbeau**, T. Porto Ribeiro, G. Gilbert, G. Cardouat, I. Baudrimont, V. Freund-Michel, C. Guibert, R. Marthan, P. Vacher, J-F. Quignard\*, T. Ducret\*. *Implication des canaux mécanosensibles Piezo1 et TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire*. Revue des Maladies Respiratoires 2022.



## Congrès nationaux / internationaux

### Communications orales

**S. Barbeau**, A. Joushomme\*, Y. Chappe\*, G. Cardouat, I. Baudrimont, V. Freund-Michel, C. Guibert, R. Marthan, P. Berger, P. Vacher, Y. Percherancier, J-F. Quignard, T. Ducret. *TRPV4 channel activity in response to hypoxia is affected by cell density*. 16<sup>th</sup> International meeting of the European Calcium Society, août 2022 (Cork, Irlande).

### Communications affichées (poster)

**S. Barbeau**, A. Joushomme\*, Y. Chappe\*, G. Cardouat, I. Baudrimont, V. Freund-Michel, C. Guibert, R. Marthan, P. Berger, P. Vacher, Y. Percherancier, J-F. Quignard, T. Ducret. *TRPV4 channel activity in response to hypoxia is affected by cell density*. 31<sup>st</sup> Ion Channels Meeting, septembre 2022 (Sète, France).

**S. Barbeau**, T. Porto-Ribeiro, E. Billoir, C. Guibert, T. Ducret, J-F. Quignard. *Targeting Piezo1 channels to reverse pulmonary artery vasoconstriction in rat model of pulmonary hypertension*. Journées de Recherche Respiratoire, octobre 2021 (Brest, France). (Prix meilleure présentation poster)

## Journées scientifiques locales

### Communications orales

**S. Barbeau**, A. Joushomme\*, Y. Chappe\*, G. Cardouat, I. Baudrimont, V. Freund-Michel, C. Guibert, R. Marthan, P. Berger, P. Vacher, Y. Percherancier, J-F. Quignard, T. Ducret. *TRPV4 channel activity in response to hypoxia is affected by cell density*. Journée Scientifique du Département Sciences et Technologies pour la Santé, novembre 2022 (Pessac, France). (Prix meilleure présentation)

**S. Barbeau**, A. Joushomme, Y. Chappe, J-F. Quignard, Y. Percherancier, T. Ducret. *Effects of hypoxia on TRPV4 channel using Bioluminescence Resonance Energy Transfer*. Journée de l'école doctorale de Bordeaux, mai 2021 (en visioconférence).

**S. Barbeau**, A. Joushomme, Y. Chappe, Y. Percherancier, J-F. Quignard, T. Ducret. *Electrophysiological characterization of TRPV4 BRET probes*. Journée Scientifique du Département Sciences et Technologies pour la Santé (Bordeaux), novembre 2020 (en visioconférence). (Prix meilleure présentation flash poster)

**S. Barbeau**, T. Ducret, R. Marthan, J-F. Quignard. *Piezo1 and TMEM63 Stretch-Activated Channels in pulmonary arteries*. Journée Scientifique du Département Sciences et Technologies pour la Santé, octobre 2019 (Pessac, France). (Présentation flash poster)

## **Communications affichées (poster)**

**S. Barbeau**, A. Joushomme, Y. Chappe, Y. Percherancier, J-F. Quignard, T. Ducret. *Influence of cell confluence on TRPV4 channel activity in response to hypoxia*. Journée Scientifique du Département Sciences et Technologies pour la Santé, novembre 2021 (Pessac, France). (Prix poster)

**S. Barbeau**, A. Joushomme, Y. Chappe, Y. Percherancier, J-F. Quignard, T. Ducret. *Electrophysiological characterization of TRPV4 BRET probes*. Journée Scientifique du Département Sciences et Technologies pour la Santé (Bordeaux), novembre 2020 (en visioconférence).

**S. Barbeau**, T. Ducret, R. Marthan, J-F. Quignard. *Piezol1 and TMEM63 Stretch-Activated Channels in pulmonary arteries*. Journée Scientifique du Département Sciences et Technologies pour la Santé, octobre 2019 (Pessac, France).

## **Étude de l'importance de la confluence cellulaire sur l'activité des canaux TRPV4 en condition d'hypoxie : apport de la technique de transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET)**

**Résumé :** TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) est un canal polymodal faisant partie des canaux mécanosensibles (ou canaux SAC pour Stretch-Activated Channels). En tant que canal cationique non sélectif perméable aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ , TRPV4 est impliqué dans de nombreux phénomènes physiopathologiques, et notamment au niveau de la circulation pulmonaire où il participe au développement de l'hypertension pulmonaire (HTP). De plus, des études antérieures ont montré que son activité est augmentée lorsque les cellules sont cultivées en condition d'hypoxie chronique *in vitro*, entraînant une dérégulation de l'homéostasie calcique pouvant mener à une prolifération et une migration des cellules, des phénomènes impliqués dans l'HTP. D'autres études ont également mis en évidence que la confluence cellulaire modifie la rigidité membranaire des cellules. Ainsi, la densité cellulaire à laquelle sont cultivées les cellules, pourrait être cruciale dans la modulation des SAC et notamment de TRPV4. Grâce à différentes approches, nous avons donc étudié l'influence de la confluence cellulaire sur la modulation de l'activité de TRPV4 en réponse à l'hypoxie sur des cellules HEK293T transfectées avec TRPV4. Pour cela, nous avons enregistré les courants unitaires grâce à la technique du patch-clamp (configuration cellule attachée) et mesuré les réponses calciques grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes (Fura-2 LR AM et Fluo-4 AM) après stimulation des cellules avec du GSK1016790A, un agoniste sélectif de TRPV4. Nous avons également utilisé une construction BRET (sonde mNeonG-Calflux-nLuc-TRVP4) nous permettant d'évaluer la concentration calcique directement dans le nanoenvironnement du canal. Nous avons ensuite vérifié la localisation de TRPV4 à la membrane par imagerie confocale, biotinylation de surface et BRET avec une construction nous permettant d'évaluer la localisation du canal à la membrane plasmique (sonde TRPV4-nLuc + mNeonG-CAAX). Nos résultats montrent que l'activité de TRPV4 lors d'une exposition *in vitro* à l'hypoxie (1 %  $\text{O}_2$  pendant 48 h) est modulée par la confluence cellulaire. Ainsi, à faible confluence, l'activité de TRPV4 est augmentée en hypoxie, alors qu'à forte confluence, elle est fortement inhibée. Cette diminution de l'activation de TRPV4 peut s'expliquer par l'internalisation du canal observée en hypoxie à forte densité cellulaire. Ainsi, ces résultats mettent en évidence l'importance des conditions de culture des cellules, notamment la confluence cellulaire, qui pourraient moduler les réponses physiologiques et biaiser les résultats obtenus lors d'expérimentations *in vitro*.

**Mots-clés :** BRET, Calcium, Canaux mécanosensibles, Confluence cellulaire, Hypoxie, Patch-clamp, Rigidité membranaire, TRPV4

---

## **Study of the importance of cell confluence on TRPV4 channel activity in hypoxic condition: input of Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)**

**Abstract:** TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) is a polymodal channel among stretch-activated channels (SAC). As a non-selective cationic channel permeable to  $\text{Ca}^{2+}$  ions, TRPV4 is involved in various pathophysiological phenomena, especially in pulmonary circulation where it contributes to the development of pulmonary hypertension (PH). It has been shown that its activity is increased in cells conditioned to *in vitro* chronic hypoxia, inducing a dysregulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis leading to cell proliferation and migration, which are phenomena involved in PH. Other studies demonstrated that cell confluence modifies membrane rigidity. Thus, cell density at which cells are cultured could be crucial in the modulation of SAC including TRPV4. Thanks to various approaches, we studied the influence of cell confluence on TRPV4 activity modulation in response to hypoxia in HEK293T cells transfected with TRPV4. Indeed, we recorded unitary currents in patch-clamp (cell-attached mode), and measured calcium response thanks to fluorescent probes (Fura-2 LR AM and Fluo-4 AM) after stimulation with GSK1016790A, a TRPV4 selective agonist. We also used a BRET probe (mNeonG-Calflux-nLuc-TRPV4) allowing us to study calcium concentration directly in the nanoenvironment of the channel. We then evaluated TRPV4 localization to membrane with confocal microscopy, cell surface biotinylation and BRET with a probe allowing us to assess plasma membrane localization of TRPV4 (TRPV4-nLuc + mNeonG-CAAX). Our results show that TRPV4 activity in response to hypoxia *in vitro* exposure (1 %  $\text{O}_2$  for 48 h) depends on cell confluence. Indeed, at low confluence level, TRPV4 response is increased in hypoxia, whereas at high confluence level, TRPV4 response is strongly inhibited. This diminution of TRPV4 activation can be explained by an internalization of the channel observed in hypoxia at high cell density. Thus, this highlights the importance of cell culture conditions, namely cell confluence, which could modulate physiological responses and bias results obtained during *in vitro* experimentations.

**Keywords:** BRET, Calcium, Cell confluence, Hypoxia, Membrane rigidity, Patch-clamp, Stretch-activated channels, TRPV4

---

**Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux – INSERM U1045**

Université de Bordeaux, France.