



Mécanotransduction endothéliale in vitro : Recherche de signatures protéiques en condition de flux physiologique et pathologique et mise en évidence de l'implication de la sous-unité NaV β 3

Léa Réthoré

► To cite this version:

Léa Réthoré. Mécanotransduction endothéliale in vitro : Recherche de signatures protéiques en condition de flux physiologique et pathologique et mise en évidence de l'implication de la sous-unité NaV β 3. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2023. Français. $\langle$ NNT : 2023ANGE0089 $\rangle$. $\langle$ tel-05084630 $\rangle$

HAL Id: tel-05084630

<https://theses.hal.science/tel-05084630v1>

Submitted on 26 May 2025

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « Biologie Cellulaire, Biologie du Développement »

Par

Léa RETHORE

« Mécanotransduction endothéliale *in vitro* : Recherche de protéines signatures en condition de flux physiologique et pathologique et mise en évidence de l'implication de la sous-unité Na ν β 3 »

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 22 Mai 2023

Unité de recherche : Laboratoire MitoVasc – équipe CarMe – UMR CNRS 6015, INSERM U1083

Rapporteurs avant soutenance :

Valérie NIVET-ANTOINE
Sébastien ROGER

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université Paris Cité
Professeur des Universités, Université de Tours

Composition du Jury :

Examineurs : Claire PEGHAIRE
Jean-François QUIGNARD

Maître de conférences, Université de Bordeaux
Professeur des Universités, Université de Bordeaux

Dir. de thèse : Daniel HENRION
Co-enc. de thèse : Claire LEGENDRE
Co-enc. de thèse : Christian LEGROS

Directeur de Recherche, Université d'Angers
Maître de conférences, Université d'Angers
Professeur des Universités, Université d'Angers

L’auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l’attribuant de la manière indiquée par l’auteur (mais pas d’une manière qui suggérerait qu’il approuve votre utilisation de l’œuvre).
- Vous n’avez pas le droit d’utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n’avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l’adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d’utilisation (attribution, pas d’utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

∴ Parce que la thèse, ce sont des experts

Premièrement, je tiens à remercier **Valérie NIVET-ANTOINE** et **Sébastien ROGER**, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse et d'avoir consacré du temps pour évaluer ce travail. Je remercie également **Claire PEGHAIRE** et **Jean-François QUIGNARD** d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinateurs.

Je remercie la **Fondation pour la Recherche Médicale** de m'avoir accordé un financement de 6 mois pour continuer mes travaux de thèse et assurer la rédaction de ce manuscrit, et d'avoir fait confiance à ce projet innovant et original. Je remercie également la **SFR ICAT** pour le soutien financier attribué à la nouvelle collaboration entreprise avec l'équipe protéomique.

Je souhaite également remercier **Anne-Clémence VION** et **Jean-François QUIGNARD** d'avoir acceptés d'être membres de mon comité de suivi individuel et de m'avoir conseillée et encouragée chaque année.

Je remercie **Guy LENAERS** de m'avoir permise de faire sa thèse au sein du laboratoire MitoVasc.

Je remercie **Daniel HENRION** de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, et de m'avoir permis de réaliser cette thèse sur un nouveau sujet. Merci pour votre disponibilité, votre soutien et les échanges enrichissants.

∴ Parce que la thèse, ce sont des heures passées dans une nouvelle maison : le labo

Merci à l'ensemble de l'**équipe Carme**, pour votre convivialité et sympathie, à tous ceux croisés en réunion, dans les couloirs, ou au café ...

Mention spéciale pour :

Carole, que serait le labo sans toi, je te remercie pour ta patience, ta disponibilité et plus particulièrement pour ta bienveillance.

Sophie, merci pour tes conseils et ton soutien, et ces balades sportives du midi.

Agnès, merci de m'avoir initiée à la biomol dès mes premiers mois de thèse, et merci de m'avoir accompagnée pour respirer de l'air « pur » angevin.

Emilie, merci ton soutien scientifique, pour ta bonne humeur, les anecdotes qui donnent le sourire, et les échanges floral et végétal.

Louis, merci pour tous ces conseils et astuces techniques (j'espère avoir enfin intégré celle de la pissette d'éthanol) et merci pour ces mercredis midi énigmatiques.

Sylvain et **Flavien**, merci pour les échanges scientifiques et les « tchin » d'avant match.

Anne-Laure et **Linda**, vous avez été d'une aide inestimable. Pas si facile pour moi de déléguer mais j'avais entièrement confiance en vous. Merci pour votre investissement professionnel presque quotidien depuis bientôt 2 ans. Merci aussi pour votre soutien moral, et d'avoir mis la main à la pâte, mais attention le gâteau n'est pas encore cuit.

Aux membres pérennes ou furtifs du bureau : Merci, pour ces discussions scientifiques, ces questions sur les protocoles et ces vérifications infinies de calculs ... Merci aussi pour ces réflexions sur l'avenir ou le sens de la vie, la destination des prochaines vacances tant rêvées ... **Lucie** et **Manue**, le bureau n'est plus le même depuis que vous n'êtes plus là, vos sourires et votre bonne humeur matinale me manquent, je pense à vous chaque matin ! **Harmonie**, **Christina**, **Jade**, **Clara** et **Alexis**, merci pour votre bonne humeur et votre patience ; et bravo à vous de m'avoir supportée durant ces derniers mois.

A mes collègues devenues bien plus :

Aglaé, au top du top tous les jours, de la coiffure aux chaussures en passant par la tenue vestimentaire, un top-modèle. Non seulement un modèle de mode mais aussi un exemple de générosité et de bienveillance. Merci pour ton sourire quotidien et ta joie de vivre, tu es un vrai rayon de soleil ! Un grand

merci d'avoir été là dans les bons moments comme dans les passages plus difficiles. Tu es devenue bien plus qu'une simple collègue pour moi (et pas seulement parce qu'on a dormi ensemble chez Lucie).

Coralynne, par où commencer, un grand merci pour les retours en pédibus ou taxis, pour ta motivation pour les ventes de chaussures ou de plantes, pour cette pause découverte du salon de thé, pour la recette du parmentier de canard, et pour tous les bons moments partagés ensemble. Merci pour ton partage de connaissances scientifiques, tu es toujours de bons conseils et ta mémoire infinie m'impressionne. Un grand merci pour ta présence quotidienne au labo, tu cours partout mais reste disponible pour écouter mes plaintes et tracas. Merci d'avoir été une oreille attentive et une épaule solide, je ne serais pas arrivée jusqu'ici sans toi. Merci pour tes qualités personnelles : simplicité, générosité, patience, bienveillance ... Je n'oublierai jamais toutes ces heures tardives passées ensemble à refaire nos journées et le monde ; ni mon pneu crevé .. Merci pour ton amitié

∴ Parce que la thèse, c'est une équipe en or

Un grand merci à toute l'équipe Canaux ioniques du labo : **Christian, César, Hélène, Claire, Jennifer**, les stagiaires et doctorants. Vous aviez bien compris que j'aimais la compétition et les challenges. Faire une communication orale en anglais dans un congrès international, dans les 2 premières semaines de ma thèse, a été le premier. Je vous remercie de m'avoir fait confiance pour porter ce projet. Merci pour la préparation des congrès et oraux divers et variés, merci pour ces réunions vos réflexions scientifiques parfois déstabilisantes mais toujours enrichissantes et constructives. Merci à **Clara** (#HCN) / **Romain** (#NALCN) / **Eliska**, les stagiaires de l'équipe canaux ioniques pour ces réflexions électrophysiologiques qui font du bien.

Christian, merci de m'avoir fait confiance pour refaire fonctionner le poste de patch-clamp, et pour les heures passées à l'analyse des datas des GH3. Merci pour ton temps, tes conseils précieux et réflexions pertinentes. Merci aussi de m'avoir donnée l'opportunité de partager mes connaissances avec les étudiants de l'IUT pendant ces 4 années.

Claire, pas seulement une encadrante exceptionnelle, tu es la personne qui m'a tout appris, aussi bien au niveau technique que de la communication, tu es ma « maman du labo ». Je tiens à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée pour développer ce projet passionnant ; d'avoir toujours pris le temps de m'écouter, de répondre à mes questions, de m'encourager quand je t'envoie un SOS ; merci d'avoir cherché avec moi les solutions, merci pour tes conseils, merci d'avoir « semer les graines et d'attendre qu'elles germent », merci d'avoir « lancer des pierres pour former cette montagne ». Merci aussi pour ta bonne humeur, pour tous les cafés partagés, pour toutes les discussions sur les chaussures pailletées ou les pantalons paperbag ... Mille mercis !

∴ Parce que la thèse, ce sont des collaborations

Je tiens à remercier les collaborateurs de l'équipe CRCINA (ICO) : **Catherine GUETTE, Benjamin BARRE, François GUILLONNEAU, Alice BOISSARD, Cécile HENRY**, pour leur aide, leur disponibilité, leur investissement, leurs réflexions dans ce projet initié.

Je remercie l'**équipe MitoLab**, des doctorants aux chercheurs passionnés, de m'avoir changé les idées et un peu pris la tête avec leurs délires du fusion/fission de petits aliens verts et difformes mieux connus sous le nom de mitochondries.

∴ Parce que la thèse, ce sont aussi des docteurs, déjà passés par là

Valentine, un grand merci pour toutes les discussions et échanges scientifiques, mais aussi pour tous les petits potins, et les points mode.

Pauline, merci pour tes conseils, encouragements et ton soutien, et toutes tes commandes de pommes !

Joohee, merci d'être toi, merci pour cette blague mexicaine dont toi seule est l'interprète. Merci pour ta patience et d'avoir été mon modèle dès les premiers mois de thèse. Maintenant je peux le dire, tu m'as montré la voie, mais aussi le chemin sétois, tu as été mon exemple scientifique, merci !

Jade et Tristan, depuis la préparation du concours de l'ED, vous avez toujours été là pour les réflexions scientifiques ou les moments festifs hors du temps, et les soirées match, je vous dis un grand merci !

∴ Parce que la thèse, ce sont aussi des voyages et des rencontres

Merci **Carlotta TURNATURI**, pour ces discussions scientifiques, ces soirées italiennes, pour cette collocation mémorable en chambre d'hôtel tourangeoise au congrès du GRRC.

Merci **Magalie LAMBERT**, pour cette balade les pieds dans l'eau (froide) sous un ciel orageux qui nous a fait évacuer le stress de ces quelques jours basques. Merci simplement pour ta présence et ton soutien au congrès de la NSFA.

Merci **Aude LEMETTRE**, quelques heures de train et une petite semaine d'électrophysie remplie de U=RI auront suffi pour faire de ces quelques jours sétois ensoleillés une belle rencontre. A bientôt à Tours !

Merci l'école d'électrophysie Montpellier E2M, les profs et les participants de l'édition 2023, c'était génial ! **Jean-Yves LE GUENNEC, Marie DEMION, Elodie, Emilie, Jamie** : merci pour votre accueil chaleureux et ensoleillé, pour vos partages de connaissances et cette semaine d'apprentissage intensif.

∴ Parce que pendant la thèse, il y a eu des moments off

Je souhaite remercier tout particulièrement ma **famille**, pour leur présence, visible ou invisible, à tous ceux qui un jour ou un autre m'ont soutenu, présents ou dans les étoiles. Merci pour tous les moments partagés, les éclats de rire, les souvenirs, les repas à rallonge, les parties interminables de belote, tarot ou tactic ... « Peu importe ce qu'il y a sur la table, ce qui compte c'est ceux qui sont autour » (Le sens de la famille – Grand Corps Malade). Merci d'avoir été autour de moi et d'avoir cru en moi.

A ma **maman**, ma mère-veilleuse, merci pour ton amour, merci d'être toi et merci d'être là, tu es mon exemple, ma force au quotidien.

A mon **frère** Thomas, merci pour ton amour, ta sincérité et ton soutien taquin.

Flo, bien plus qu'une rencontre au laboratoire, ce stage aura marqué le début de notre histoire. Depuis cette date et après avoir survécu à la distance et à la Covid-19, je veux te dire merci d'avoir été présent chaque jour, de m'avoir soutenue malgré mon caractère. Merci pour ta patience et ta douceur.

A ses amis, et aux membres de sa famille : **Christine, Loïc, Marine** et **Fabien, Maëva**, et ceux que j'ai rencontrés, merci de m'avoir accueillie à bras ouverts, merci pour votre soutien et votre présence.

A **Marie**, ma jumelle d'enfance, parce qu'on a bien changé depuis, et **Valentin**, merci pour ces journées, ces soirées, et repas cocooning. Et merci pour cette heureuse nouvelle : Tata pour la première fois !

A la **GR**, ou gymnastique rythmique, sport unique et ingrat, ou en moins de quelques centièmes de secondes tout peut basculer vers le meilleur ou vers le pire. Merci à ce sport d'exister, de m'avoir appris la gestion du stress, l'esprit d'équipe et de compétition, la rigueur, et la persévérance, et aussi à avoir un jugement impartial. Plus particulièrement merci à mon club de cœur **GRSP**, pour ces dimanches de compétition pailletés et week-ends intenses, riches en émotion et en souvenirs, où se mélangent nostalgie, joie, tristesse, peur, stress, et amour.

∴ Parce que la thèse, ça a été la COVID-19

A toi la **COVID-19**, en qui la veille du confinement je ne croyais pas, qui nous a fait peur et a rythmé nos vies pendant plusieurs années, qui m'a empêché de profiter de mes premiers mois de thèse au labo, qui a stoppé cours à mes expériences et à mon apprentissage pratique, qui m'a clouée au lit une semaine avant un congrès. A toi je ne te dirais pas merci, mais j'aimerais dire bravo à tous ceux qui se sont battus et qui ont survécu, et on y est arrivés malgré toi !

∴ Parce que la thèse, c'est un bébé qui naît, murit, grandi

A toi, **β3, SCN3B, Navβ3**, sur lequel je me suis acharnée, qui m'a poussée à bout, parfois, tous les jours, qui m'a menée par le bout du nez, mais sans qui la vie aurait été fade. A toi, qui a rythmé ces années de thèse, jour et nuit je pensais, et pense encore à toi. J'ai appris à t'apprivoiser pour mieux te découvrir et te connaître, même si tu es discret et parfois transparent ou même invisible. Tu m'as marquée et tu resteras gravé dans ma mémoire.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	4
TABLE DES TABLEUX	6
INTRODUCTION	7
1. L'endothélium	7
1.1. L'endothélium artériel : constituant du vaisseau.....	7
1.2. L'endothélium : senseur mécanique du vaisseau – importance du shear stress	8
1.2.1. Contraintes de cisaillement	9
1.3. Rôle physiologique des contraintes de cisaillement	11
1.3.1. Vasomotricité des artères de résistance	11
1.3.2. Tonus myogénique.....	11
1.3.3. Dilatation flux-dépendante.....	11
1.3.4. Voies de signalisation dépendantes de l'endothélium	12
a) Voie du NO.....	12
b) Voie de l'EDHF	13
c) Voie de la PGI ₂	13
1.4. Réponses pathologiques de l'endothélium (exemple de l'athérosclérose et de la dysfonction endothéliale)	14
1.4.1. Flux oscillatoire perturbé et athérosclérose	14
1.4.2. Stress oxydatif et dysfonction endothéliale	14
1.4.3. Recrutement leucocytaire et modulation de l'inflammation	15
2. Mécanosensibilité / Mécanotransduction des contraintes de cisaillement.....	17
2.1. Mécanosenseurs vasculaires.....	17
2.1.1. Concepts de la mécanosensibilité des protéines membranaires mécanosensibles	18
2.1.2. Mécanosenseurs du pôle apical.....	19
a) Glycocalyx.....	20
b) Cils primaires.....	20
c) Protéines G hétérotrimériques et Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	21
d) Canaux ioniques	23
e) Cavéoles	25
f) Récepteurs Tie	25
2.1.3. Mécanosenseurs du pôle jonctionnel	26
a) PECAM-1	26
b) PECAM-1, VEGFR2, VE-Cadhérine	27
2.1.4. Mécanosenseurs du pôle basal	28
2.2. Mécanotransducteurs : facteur de transcription mécanosensibles.....	29
2.2.1. KLF2 et KLF4	30
2.2.2. Nrf2.....	31
2.2.3. YAP/TAD/TEAD	32
2.2.4. HIF-1α	33
2.2.5. NF-κB et AP-1.....	34
2.3. Voies de signalisation	35
2.3.1. PI3K/AKT	36
2.3.2. MAP Kinases	37
2.3.3. Protéines kinases	37
2.3.4. Protéines Rho	37
2.3.5. Protéines d'adhésion focale : FAK	38
2.3.6. NO	38
2.4. Effets du shear stress sur les fonctions cellulaires endothéliales.....	39
2.4.1. Polarité	40
2.4.2. Alignement.....	41
2.4.3. Apoptose.....	42
2.4.4. Prolifération.....	42

2.4.5.	Migration	43
2.4.6.	Perméabilité	43
2.4.7.	Autophagie endothéliale	44
3.	Canaux sodiques dépendants du potentiel	48
3.1.	Gènes et structure	48
3.2.	Expression et distribution tissulaire/cellulaire	50
3.2.1.	Modifications post-traductionnelles des sous-unités Navβ	52
	a) Glycosylation	52
	b) Sialylation	52
	c) Phosphorylation	53
	d) Palmitoylation	53
3.3.	Fonction canalaire/canonique	53
3.3.1.	Conformations des canaux Nav et propriétés électrophysiologiques	54
3.3.2.	Classification pharmacologique	55
3.3.3.	Fonction canalaire dans les cellules non excitables	56
3.3.4.	Fonction canalaire dans les cellules cancéreuses	56
3.3.5.	Fonction canalaire et sous-unités Navβ	56
3.4.	Fonctions non canoniques – implication des sous-unités Navβ	57
3.4.1.	Navβ et molécules d'adhésion cellulaire	58
3.4.2.	Navβ et signalisation par protéolyse intramembranaire régulée (RIP pour <i>regulated intramembrane proteolysis</i>)	60
3.4.3.	Navβ et développement	62
3.5.	Canalopathies et physiopathologies associées aux sous-unités Navβ	63
3.5.1.	Arythmies cardiaques	64
3.5.2.	Epilepsie	64
3.5.3.	Douleur	65
3.5.4.	Maladies neurodégénératives	66
3.5.5.	Cancer	66
3.6.	Canaux Nav dans les cellules vasculaires	67
3.6.1.	Expression et fonction des canaux Nav dans les CMLV	67
3.6.2.	Mises en évidence et caractérisation électrophysiologique dans les CE	68
3.6.3.	Relation entre activité des canaux Nav et fonction des CE	69
3.6.4.	Mécanosensibilité des canaux Nav	70
OBJECTIFS		72
RÉSULTATS		73
1.	Étude 1 : Implication de la sous-unité Navβ3 dans la mécanotransduction endothéliale	73
2.	Étude 2 : Les HUVEC présentent des signatures protéiques distinctes en réponse à un flux laminaire athéroprotecteur ou oscillatoire athéropone	101
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		116
1.	Partie 1 – Implication de la sous-unité Navβ3 dans la mécanotransduction endothéliale	116
1.1.	Validation du modèle	116
1.1.1.	Les HUVEC et TeloHAEC s'alignent dans le sens du flux et activent la voie de signalisation athéroprotectrice lorsqu'elles sont exposées à un flux physiologique.	116
1.1.2.	Limites des modèles cellulaires utilisés	116
1.2.	Canaux Nav endothéliaux et flux laminaire	117
1.2.1.	Les sous-unités α et β des canaux Nav sont exprimées dans les CE vasculaires.	117
1.2.2.	L'expression des sous-unités α et β des canaux Nav dans les CE vasculaires est différenciellement régulée par un flux laminaire physiologique.	117
1.2.3.	Navβ3 et réponse au flux vasculaire	119
	a) Quel est le rôle de Navβ3 dans la cellule endothéliale ?	119
	b) Où Navβ3 est localisée dans la cellule endothéliale ?	121
	c) Navβ3 est-elle exprimée sous la forme totale ou clivée dans la cellule endothéliale ?	122
	d) Comment Navβ3 est-elle régulée, quels sont les facteurs de transcription impliqués ? ...	123

e) Navβ3, en contribuant à la mécanotransduction endothéliale, est-elle un nouveau candidat pour l'athéroprotection comme elle l'est pour la protection du rythme cardiaque ?	124
2. Partie 2 – Les HUVEC présentent des signatures protéiques distinctes en réponse à un flux laminaire athéroprotecteur ou oscillatoire athéropone	126
2.1. Effet du flux sur le phénotype endothélial	126
2.2. Identification de protéines différentiellement régulées (DRP) par le flux	127
2.2.1. DRP augmentées par un LSS et réprimées par un OSS : marqueur de l'athéroprotection ? ...	128
a) Aquaporine-1 (AQP1)	128
b) Intégrine β4 (ITGB4)	129
c) Galectine-9 (LGALS9)	129
d) Ephrine B1 (EFNB1)	129
2.2.2. DRP réprimées par un LSS et augmentées par un OSS : marqueur de la physiopathologie de l'athérosclérose ?	130
a) Inhibitor of DNA binding 3 (ID3)	130
b) EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1 (EFEMP1)	130
c) Pentraxine 3 (PTX3)	131
CONCLUSION GÉNÉRALE	132
BIBLIOGRAPHIE	133
ANNEXES	161

ABREVIATIONS

3-MA : 3-Methyladenine
 A β : β -amyloid protein
 ACh : acétylcholine
 AF : adhésions focales
 AICD : APP Intracellular Domain
 AMPc : adénosine monophosphate cyclique
 AMPK : AMP-activated protein kinase
 ANXA2 : annexine A2
 APP : amyloid precursor protein
 AQP1 : aquaporine-1
 ARE : éléments de réponse antioxydant
 ATF : activating transcription factor
 Atg : autophagy related gene
 ATP : adénosine triphosphate
 B₂Rs : récepteurs à la bradykinine B₂
 BACE1 : β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1
 BECN1 : bécline 1
 BH₄ : tétrahydrobioptérine
 BOEC : blood outgrowth endothelial cells
 Ca²⁺ : calcium
 CAM : molécules d'adhésion cellulaire
 CAMKII : protéine kinase Ca²⁺/calmoduline dépendante
 Cav : canaux calciques dépendant du potentiel
 CAV : cavéolines
 CE : cellules endothéliales
 ChIP : immunoprécipitation de chromatine
 CHL : Chinese hamster lung
 Cl⁻ : chlore
 CMA : pour Chaperone-Mediated Autophagy
 CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires
 CMV : cytomégalo virus
 Cq : Cycle quantitative
 CSK : cytosquelette
 CTGF : facteur de croissance du tissu conjonctif
 CTL : control
 CVD : cardiovascular diseases
 Cyr61 : inducteur angiogénique riche en cystéine 61
 DAG : diacylglycérol
 DDA : Data Dependant Analysis
 DIA : Data Independant Analysis
 DIA-PASEF : data independent acquisition parallel accumulation serial fragmentation
 DRG : ganglions de la racine dorsale
 DRP : differentially regulated proteins ou protéines régulées différenciellement
 EAE : encéphalomyélite allergique expérimentale
 EBM-2 : endothelial basal medium 2

EBM-MV2 : endothelial basal medium from microvascular vessels
 EC : endothelial cells
 ECD : ExtraCellular Domain
 ECG : électrocardiogramme
 ECM : extracellular matrix
 EDCF : endothelium derived constricting factor
 EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
 EDRF : endothelium derived relaxing factor
 EFEMP1 : EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1
 EFNB1 : éphrine B1
 EFNB2 : éphrine B2
 EGM-2 : endothelial growth medium 2
 EGM-MV2 : endothelial growth medium from microvascular vessels 2
 ER : endothelial reticulum
 ERK : extracellular signal regulated kinases
 ET-1 : endothéline 1
 eNOS : oxyde nitrique synthase endothélial
 FAK : Protéines d'adhésion focale
 FC : fold change
 FDR : False Discovery Rate
 FFL : force from lipid
 FT : Flow Through
 GAG : glycosaminoglycanes
 GC : guanylate cyclase
 GDP : guanosine diphosphate
 GLUT1 : voir SLC2A1
 GMPc : guanosine monophosphate cyclique
 GO : Gene Ontology
 GPCR : G protein-coupled receptors
 GTP : guanosine triphosphate
 H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
 H₁R : récepteur à l'histamine H₁
 HAEC : human aortic endothelial cells
 HIF-1 α : Hypoxia-inducible Factor 1 α
 HK2 : hexokinase 2
 HMGB1 : high-mobility group box-1
 HMOX1 : Heme oxygenase 1
 HO-1 : hème oxygenase-1
 HO $\cdot$: radical hydroxyle
 HOCl : acide hypochloreux
 HSC70 : heat shock cognate 70 protein
 HUVEC : cellule endothéliale de veine ombilicale humaine
 Hz : Hertz
 IAP : protéines inhibitrices de l'apoptose

ICAM-1 : molécule d'adhérence intercellulaire 1
 ICD : IntraCellular Domain
 ICO : Institut de Cancérologie de l'Ouest
 ID3 : Inhibitor of DNA binding 3
 IFN- γ : interféron- γ
 Ig : immunoglobulines
 Ig-CAM : molécules d'adhésion cellulaires de type immunoglobuline
 IK_{Ca} et SK_{Ca} : canaux K⁺ dépendants du calcium
 IL : interleukines
 IP3 : inositol triphosphate
 IP : immunoprécipitation
 IRF3 : interferon regulatory factor
 ITIM : immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs
 ITG5A : Integrin Subunit Alpha 5
 ITGB4 : intégrine β 4
 JNK : c-jun N-terminal kinases
 JUP : Junction Plakoglobin
 K⁺ : potassium
 Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1
 KLF : Krüppel-like factor
 KO : knock out
 LAMP2A : lysosome-associated membrane protein type 2A
 LC3 : Light Chain 3
 LDL : low density lipoprotein
 LGALS9 : galectine-9
 LIMMA : Linear Models for Microarray Data
 LSS : laminar shear stress
 LTE : épilepsie du lobe temporal
 MAP : mitogen-activated protein
 MAPK : MAP kinases
 MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1
 M-CSF : macrophage colony-stimulating factor
 MEC : matrice extracellulaire
 MMP2 : matrix metalloproteinase-2
 MMTS : S-Methyl methanethiosulfonate
 MSTF : mechanosensitive transcription factor
 MTOC : Microtubule Organizing Center
 mTOR : mammalian target of rapamycin
 NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
 NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 NADPH oxydase ou NOX : nicotinamide dinucléotide phosphate oxydase
 Na_v : canaux Na⁺ dépendants de potentiel
 NCBI : National Center for Biotechnology Information
 NCX : échangeur Na⁺/Ca²⁺
 ND : Not Detected
 NICD : Notch-1 Intracellular Domain
 NQO1 : NAD(P)H quinone oxydoréductase 1
 NO : oxyde nitrique
 Nrf2 : nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
 O₂ : dioxygène
 O₂⁻ : l'anion superoxyde
 ONOO⁻ : peroxydinitrite
 OSS : oscillatory shear stress
 Pa : Pascal
 PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
 PANX1 : pannexine 1
 PBS : phosphate buffered saline
 PC : polycystine
 PCA : Principal component analysis
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PDK1 : pyruvate déshydrogénase kinase
 PDH : pyruvate déshydrogénase
 PECAM-1 : Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1
 PEI : Polyethylenimine
 PFKFB3 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2.6-biphosphatase-3
 PGI₂ : prostacycline
 PI16 : peptidase inhibitor 16
 PI3K : phosphoinositide 3-kinase
 PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
 PIP3 : phosphatidylinositol-3-phosphate
 PKA : protéine kinase A
 PKB : protéine kinase B
 PKC : protéines kinases C
 Pkd2 : polycystin-2
 PLA₂ : phospholipase A2
 PLC : phospholipase C
 PPARs : peroxisome proliferator-activated receptors
 PTPN11 : Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
 PTP1B : protein tyrosine phosphatase 1B
 PTX3 : Pentraxine 3
 Rb : protéine du rétinoblastome
 RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
 RE : réticulum endoplasmique
 RIP : regulated intramembrane proteolysis
 ROS : espèces réactives de l'oxygène
 RTqPCR : Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction
 S1PR : récepteur à la sphingosine-1-phosphate
 SAM : Significance Analysis MicroArray
 SELE : E-sélectine
 SEM : standard error of the mean
 SIRT1 : sirtuine 1
 SLC2A1 : solute carrier family 2
 SNC : système nerveux central
 SOD : superoxyde dismutase

SSRE : shear stress responsive element
TAD : transcriptional activation domain
TBP : Tata-box protein
TeloHAEC : cellule endothéliale d'aorte humaine
immortalisée
THBS1 : thrombospondine 1
TIMS : Timed Ion Mobility Spectrometry
TIMS TOF : Timed Ion Mobility Spectrometry Time
Of Flight
TKR : tyrosine kinase receptors
TLR : toll-like receptor
TNF α : tumor necrosis factor
TRP : Transient Receptor Potential

TRPC1 : Transient Receptor Potential Cation Channel
Subfamily C Member 1
TRPP2 : Transient receptor potential polycystic 2
TRPV4 : Transient Receptor Potential Vanilloid 4
TTX : tétrodotoxine
UBC : Ubiquitin C
VCAM-1 : molécule d'adhérence des cellules
vasculaires 1
VEGFR : récepteurs du VEGF
V_m : Potentiel membranaire
vs : versus
VTD : vératridine
YAP : Yes-associated protein

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique de la structure de la paroi artérielle	7
Figure 2 : Représentation schématique des forces médiées par le flux sanguin sur la paroi artérielle	8
Figure 3 : Représentation schématique des effets du shear stress au niveau de bifurcations artérielles	10
Figure 4 : Représentation hypothétique de l'évolution temporelle des évènements contribuant à la dilatation flux-dépendante et des voies de signalisation mises en jeu	12
Figure 5 : Représentation schématique du découplage de la eNOS	15
Figure 6 : Représentation schématique des mécanosenseurs impliqués dans la réponse au shear stress de la CE	17
Figure 7 : Représentation schématique des concepts de la mécanosensibilité des protéines membranaires	18
Figure 8 : Représentation schématique de l'effet du shear stress sur un cil primaire de la CE	21
Figure 9 : Représentation schématique des voies de signalisation des RCPG mécanosensibles	23
Figure 10 : Représentation schématique de l'architecture homotrimérique de Piezo1 murin.	24
Figure 11 : Représentation schématique de l'effet du shear stress sur PECAM-1 au niveau jonctionnel.	27
Figure 12 : Représentation schématique de l'effet du shear stress sur le complexe jonctionnel mécanosensible.	27
Figure 13 : Représentation schématique du lien entre une intégrine, la MEC et le cytosquelette d'actine	29
Figure 14 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress laminaire ou oscillatoire sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la mécanotransduction	30
Figure 15 : Représentation schématique de la cascade de signalisation induite par un shear stress laminaire induisant une augmentation de l'expression de KLF2 et KLF4. Figure adaptée de (Q. Zheng et al. 2022).	31
Figure 16 : Représentation schématique de la voie de signalisation de Nrf2 induite par le shear stress	32
Figure 17 : Représentation schématique de la voie YAP/TAZ/TEAD en réponse à un shear stress laminaire ou oscillatoire	33
Figure 18 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress oscillatoire sur la voie de HIF-1 α	34
Figure 19 : Représentation schématique de la voie de signalisation de NF- κ B et AP-1 induite par le shear stress	35
Figure 20 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress laminaire sur la voie PI3K/AKT	36
Figure 21 : Représentation schématique de la mécanotransduction médiée par les FAK	38
Figure 22 : Représentation schématique de la production de NO médiée par le shear stress	39
Figure 23 : Représentation schématique de la distribution des organites pendant un flux laminaire	41
Figure 24 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress laminaire sur la prolifération des CE	43
Figure 25 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress perturbé sur la perméabilité des CE	44
Figure 26 : Représentation schématique des trois types d'autophagie	45
Figure 27 : Structure des sous-unités α et β des canaux Nav	49
Figure 28 : Schéma des différents états conformationnels des canaux Nav	54
Figure 29 : Caractérisation électrophysiologique du courant I_{Na} des cellules GH3b6	55
Figure 30 : Fonction d'adhésion cellulaire des sous-unités Nav β	59
Figure 31 : Clivage protéolytique des sous-unités Nav β	61

Figure 32 : Schéma des sites de mutations des sous-unités Nav β	63
Figure 33 : Représentations schématiques de l'implication des canaux Nav dans la signalisation des CE	70

Table des tableaux

Tableau 1 : Résumé des différents gènes et isoformes des sous-unités α et β des canaux Nav chez les mammifères et leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX), et leur distribution tissulaire..	50
Tableau 2 : Liste des interactants décrits pour les sous-unités Nav β .	60
Tableau 3 : Résumé des mutations dans les gènes des sous-unités Nav β et des pathologies cardiaques associées.	64
Tableau 4 : Résumé des mutations dans les gènes des sous-unités Nav β et des formes d'épilepsie associées. .	65
Tableau 5 : Liste des 7 DRP dont l'expression est augmentée (AQP1, LGALS9, EFNB1 et ITGB4) ou diminuée (ID3, EFEMP1 et PTX3) par un LSS.	128

INTRODUCTION

1. L'endothélium

L'endothélium vasculaire est retrouvé dans les artères, veines et vaisseaux lymphatiques, et représente une surface totale extrêmement importante, estimée entre 280 et 350 m² (Pries et Kuebler 2006) soit autant que celle de l'intestin ou qu'un cours de tennis (Helander et Fändriks 2014). Considérée au départ comme une simple barrière séparant le sang des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), il est maintenant reconnu que l'endothélium joue un rôle primordial dans la physiologie vasculaire.

1.1. L'endothélium artériel : constituant du vaisseau

Les artères sont composées de trois tuniques concentriques de cellules (figure 1) (Mulvany et al. 1996).

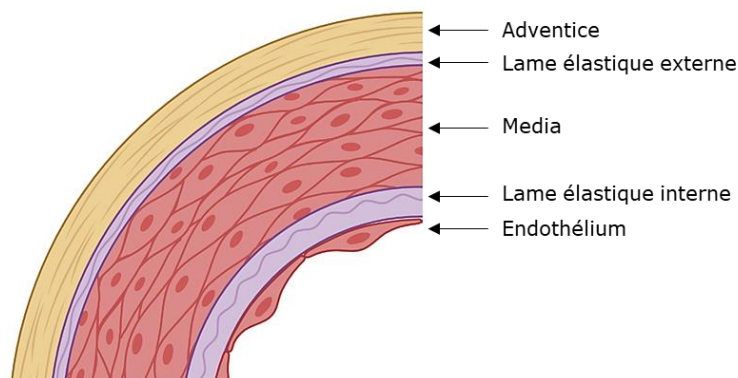


Figure 1 : Représentation schématique de la structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle est composée de l'adventice, d'une lame élastique externe, de la média, d'une lame élastique interne, et de l'endothélium, de l'extérieur vers l'intérieur. Figure modifiée de Servier Medical Art.

La couche la plus externe des artères, nommée l'**adventice** (figure 1), relie de façon souple et solide les vaisseaux aux tissus environnants. L'adventice est principalement composée de fibres de collagène, de fibroblastes et de matrice extracellulaire, et est traversée par deux réseaux. Le *vasa nervorum*, constitué de nerfs et terminaisons nerveuses, intervient dans la régulation du tonus vasculaire. Ces terminaisons sont pour la plupart majoritairement sympathiques mais peuvent s'avérer pour certaines parasympathiques. Le *vasa vasorum*, constitué de vaisseaux sanguins et lymphatiques de très petit calibre, assure l'apport du sang et des métabolites à la paroi artérielle.

Séparée de l'adventice par une lame élastique externe, la **média** est composée principalement de CMLV organisées en couches circulaires (figure 1), permettant la contraction des artères lors du tonus vasculaire régulée par les forces mécaniques, les fibres nerveuses et médiateurs chimiques, et participant ainsi activement à la vasoréactivité de l'artère. La média contient aussi des fibres d'élastine et de collagène dont la proportion varie selon le type d'artères déterminant ainsi l'élasticité et la rigidité des artères, soit la capacité de distension de la paroi artérielle en fonction de la pression sanguine, également appelée **compliance du vaisseau**. De ce fait, la média des artères de conductance comme l'aorte contient beaucoup d'élastine, les rendant très compliantes. En revanche, les artères de résistance contenant moins d'élastine, sont moins compliantes. L'endothélium, en lien

étroit avec les CMLV, peut aussi intervenir dans cette capacité à se distendre en sécrétant diverses molécules (cf paragraphe 1.3.4. Voies de signalisation dépendantes de l'endothélium).

Séparée de la média par une lame élastique interne, l'intima, ou l'**endothélium**, est la couche luminale du vaisseau, constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) quel que soit le calibre de l'artère (figure 1). Ces CE reposent sur une lame basale et un tissu conjonctif, permettant son maintien et son étanchéité. Du fait de leur localisation sur la couche interne du vaisseau, les CE sont stratégiquement situées, entre le sang et les tissus, et représentent ainsi la première barrière pour les molécules, les cellules ou les agents pathogènes circulant dans la circulation sanguine. Cependant, l'endothélium vasculaire n'est pas seulement une simple barrière anatomique mais a un rôle de capteur et de transducteur de signaux et représente une surface d'échange importante entre le sang et les tissus. Cette fonction lui confère un rôle crucial dans l'hémostase, la réponse inflammatoire et immunitaire, le transport de métabolites, l'angiogenèse, le contrôle du tonus vasculaire et par conséquent le maintien de la **vasomotricité vasculaire** c'est-à-dire la capacité des vaisseaux à réagir à leur environnement en changeant leur diamètre (Rubanyi 1993). L'endothélium contrôle l'ensemble de ces fonctions par la libération et la reconnaissance de substances biologiquement actives, à la fois des agonistes et antagonistes, comme des vasodilatateurs ou des vasoconstricteurs, des molécules pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires (Rubanyi 1993; Vanhoutte 1999). Outre ces médiateurs chimiques, les CE sont également constamment exposées au flux sanguin et aux forces hémodynamiques qui en résultent et sont donc également très sensibles à ces médiateurs mécaniques.

1.2. L'endothélium : senseur mécanique du vaisseau – importance du shear stress

Le flux sanguin génère trois types de forces hémodynamiques sur les vaisseaux (figure 2) : la pression (ou pressure en anglais), ressentie par les CMLV, qui ne sera pas abordée ici), l'étirement cyclique (ou tensile strain en anglais, ressenti par les CE et les CMLV, qui ne sera pas abordée ici), et les contraintes de cisaillement ou **shear stress** (ressenti par les CE). Les CE sont capables de percevoir ces signaux extérieurs mécaniques et de les traduire en signaux biochimiques intracellulaires influençant des voies de signalisation complexes, et permettant une réponse adaptée aussi bien cellulaire que tissulaire. C'est ce que l'on appelle la mécanotransduction.

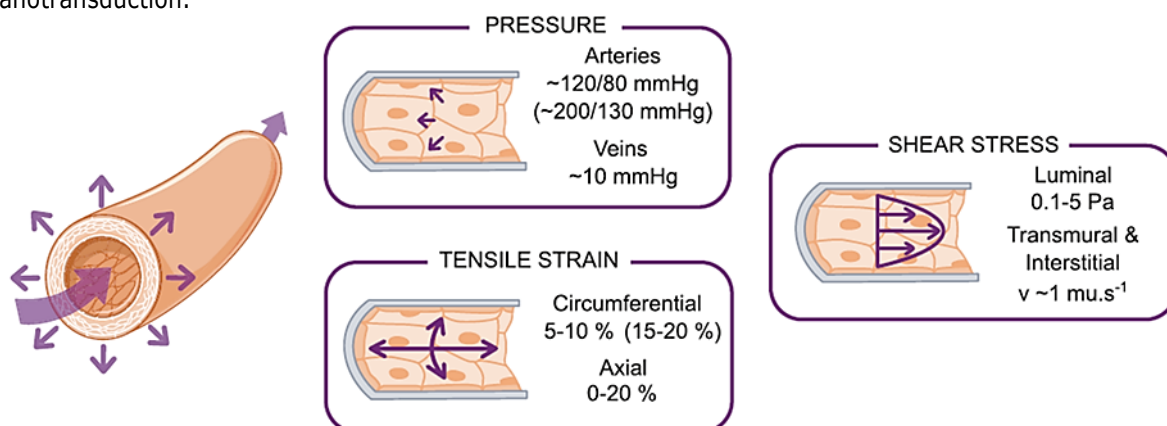


Figure 2 : Représentation schématique des forces méditées par le flux sanguin sur la paroi artérielle. Les CE sont sujettes majoritairement aux contraintes de cisaillement ou shear stress, et à l'étirement cyclique (ou tensile strain), tandis que les CMLV ressentent principalement la pression (ou pressure). Les valeurs physiologiques et pathologiques (entre parenthèses) sont indiquées dans les encadrés (1 Pascal (Pa) équivaut à 10 dyn/cm²). Figure adaptée de (Dessalles et al. 2021).

1.2.1. Contraintes de cisaillement

Les contraintes ou forces de cisaillement (également appelées shear stress) exercées par le sang circulant sont ressenties majoritairement par les CE car ces forces ont une intensité trop faibles pour être transmises jusqu'aux CMLV (Ballermann et al. 1998).

Ces contraintes de cisaillement (τ) correspondent aux **forces de friction tangentielle à la paroi vasculaire** exercées par le flux sanguin, et en particulier sur l'endothélium artériel (figure 2). Elles sont déterminées selon la loi de Poiseuille (pour un flux laminaire) par $\tau = 4 \mu Q / \pi r^3$ avec le débit (Q) (en cm^3/min) et la viscosité (μ) du sang ainsi que par le rayon (r) (en cm) du vaisseau. Le shear stress s'exprime en Pascal (Pa) ou dynes/cm² (1 Pa = 10 dynes/cm²). Lors d'un flux pulsatile, la formule devra prendre en compte de la fréquence des pulses (exprimée en hertz). Cette équation met en valeur, qu'une faible variation du diamètre du vaisseau entrainera une forte augmentation ou diminution des contraintes de cisaillement (à débit constant), que la viscosité du sang (dépendante de la concentration en globules rouges) modulera également directement cette force. Cette contrainte est donc le senseur idéal des modifications physiques et hématologiques du vaisseau.

La valeur moyenne physiologique de cette contrainte, dans une artère linéaire chez l'Homme, est comprise entre 1 et 6 Pa, soit 10 et 60 dynes/cm² (Dewey et al. 1981; Chatterjee 2018). Dans des conditions physiologiques de contraintes de cisaillement, soit ~20 dynes/cm², les CE adoptent une morphologie particulière, elles s'allongent et s'orientent dans la direction de l'écoulement sanguin. Alors qu'en condition de faibles contraintes de cisaillement, soit inférieures ou égales à 5 dynes/cm², ou lors d'un flux oscillatoire perturbé (aussi qualifié de turbulent), les cellules ne peuvent s'aligner (Remuzzi et al. 1984) (figure 3A).

La valeur de la contrainte de cisaillement est donc dépendante de la **structure du vaisseau**. En effet, localement, les vaisseaux peuvent être courbés ou présenter des irrégularités et obstructions qui vont modifier le flux sanguin. Ainsi, dans des zones où les artères sont droites et uniformes, les contraintes de cisaillement sont laminaires, le sang circule en lignes parallèles à l'endothélium (figure 3A). Un flux laminaire peut être observé dans les gros troncs artériels, les artères de résistance et les artérioles. Au contraire, dans les zones où les artères bifurquent ou se courbent fortement, au niveau des embranchements de collatérales par exemple, le flux est plus faible (entre 0 et 10 dynes/cm²) et oscillatoire perturbé (Malek, Alper, et Izumo 1999; M. A. Gimbrone et al. 2000) (figure 3A). Un flux de faible intensité ou oscillatoire est propice à l'infiltration des lipoprotéines de basse densité (LDL pour low density lipoprotein en anglais) favorisant la formation de plaques d'athérome (figure 3B) (cf paragraphe 1.4.1. Flux oscillatoire perturbé et athérosclérose).

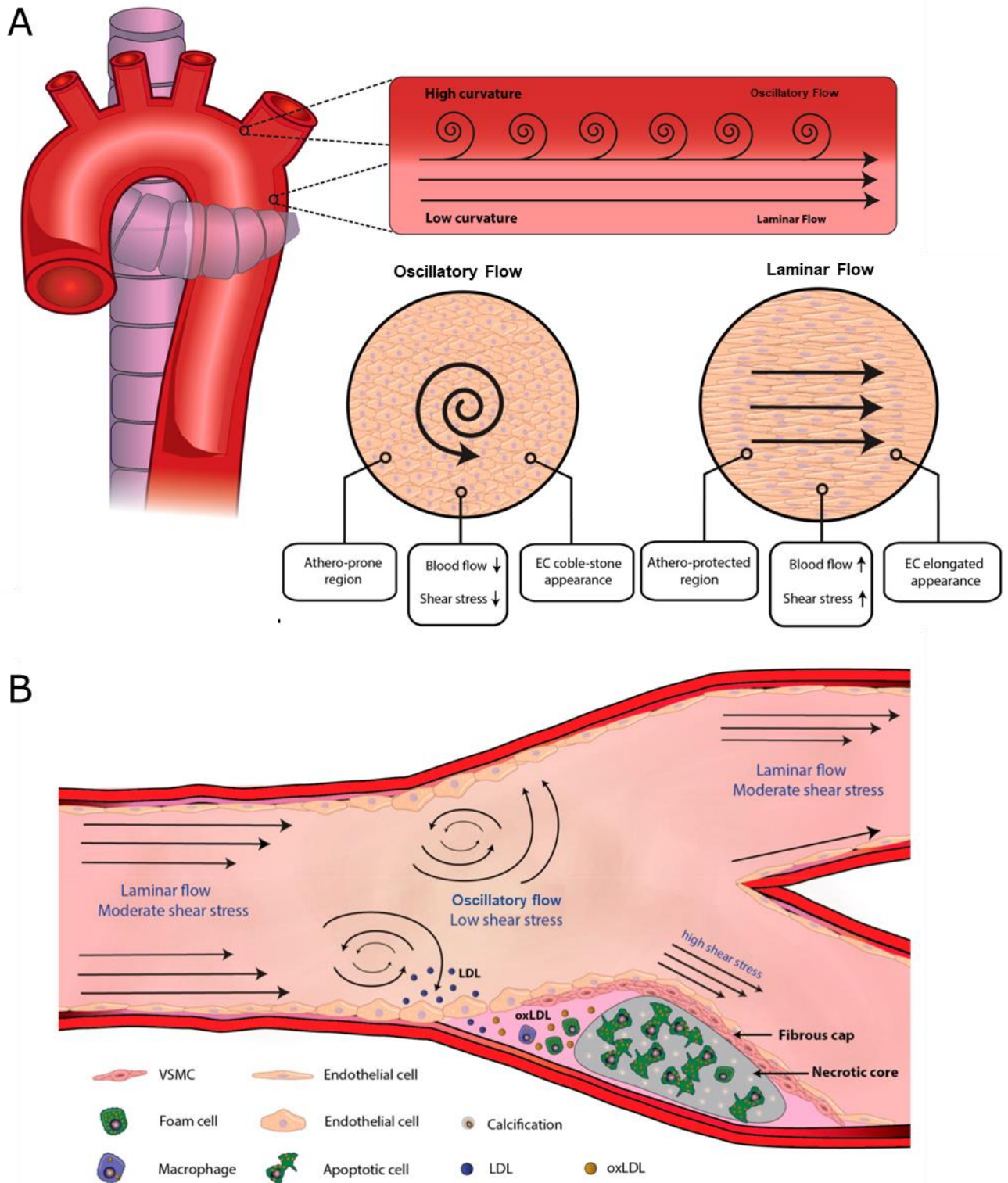


Figure 3 : Représentation schématique des effets du shear stress au niveau de bifurcations artérielles
 (A) Dans les segments droits des artères, le flux laminaire conduit à un shear stress physiologique engendrant une forme allongée caractéristique d'un phénotype quiescent des CE. Un shear stress inférieur ou oscillatoire au niveau de la paroi externe du vaisseau fait que les CE adoptent une apparence « pavée ». Un flux oscillatoire se produit aux bifurcations et aux points de branchement où la courbure artérielle est plus élevée en raison de la séparation du flux. (B) Un flux laminaire perturbé ou un flux oscillatoire réduit le shear stress et favorise la dysfonction endothéliale ainsi que l'infiltration de LDL, qui constitue la première étape de la formation d'une plaque d'athérome. Au contraire, les zones à faible courbure soumises à une contrainte de cisaillement plus élevée sont dites « protégées de l'athérome ». Figure adaptée de (Jebari-Benslaiman et al. 2022)

1.3. Rôle physiologique des contraintes de cisaillement

Les variations des paramètres hémodynamiques, comme la modification de pression, de l'étirement cyclique, et des contraintes de cisaillement ou shear stress, influencent la réactivité et la structure des artères. La vasomotricité, capacité des vaisseaux à réagir à leur environnement en changeant leur diamètre, est une caractéristique spécifique des artères de résistance.

1.3.1. Vasomotricité des artères de résistance

Les artères de résistance, appelées artères « de petit calibre » correspondent aux artères ayant un diamètre inférieur à 500 µm chez l'Homme, et se trouvent à proximité des organes périphériques. Pour compenser les variations de pression et de flux sanguin, les artères de résistance ont la capacité de moduler leur diamètre très rapidement, contrairement aux artères de conductance, ou artères « de gros calibre », situées proche du cœur, qui ont pour rôle d'amortir la pulsativité du cœur et d'assurer un flux sanguin continu grâce à l'élasticité de leurs parois et à une dilatation passive.

La vasomotricité des artères de résistance, ou l'**équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation**, constitue une balance entre deux fonctions : le tonus myogénique et la dilatation dépendante du flux, médiées en partie par les cellules vasculaires de la paroi des artères. De nombreux acteurs sont impliqués dans ces réponses vasomotrices dont des canaux ioniques sur lesquels nous nous sommes focalisés.

1.3.2. Tonus myogénique

Une augmentation de pression au niveau de la paroi artérielle entraîne une **réponse vasoconstrictrice** locale appelée tonus myogénique. Au niveau cellulaire, l'augmentation de pression artérielle induit un étirement pariétal, détecté par différents canaux ioniques membranaires (comme les TRP (Transient Receptor Potential)) présents à la surface des CMLV, entraînant une dépolarisation membranaire puis (via l'activation de canaux calciques dépendant du potentiel (Cav) entre autres) une augmentation de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire favorisant l'activation de protéines contractiles (par la phosphorylation des chaînes légères de la myosine), induisant *in fine* la contraction du vaisseau.

Dans la microcirculation, des variations aiguës de la pression peuvent être compensées par le tonus myogénique. En revanche, des variations chroniques de la pression artérielle sont à l'origine d'un remodelage de la paroi artérielle et d'une altération de la réactivité artérielle, favorisant l'hypertension artérielle, le facteur de risque majeur du développement de maladies cardiovasculaires.

1.3.3. Dilatation flux-dépendante

Des variations locales du débit sanguin induisent une **réponse vasodilatatrice** locale nommée dilatation flux-dépendante (ou dilatation induite par le flux ou dilatation médiée par le flux). Contrairement au tonus myogénique impliquant principalement les CMLV, la dilatation flux-dépendante est possible grâce à l'activation des CE.

La dilatation flux-dépendante a été largement étudiée dans les artères à l'aide de la technique d'artériographie, avec laquelle les effets du débit peuvent être différenciés en gardant la pression intravasculaire constante grâce à l'ajustement des pressions d'entrée et de sortie (Kuo, Davis, et Chilian 1990). Les mécanismes sous-jacents à la dilatation flux-dépendante ont été étudiés dans les artères ainsi que dans les CE en culture (figure 4).

L'augmentation locale du débit sanguin induit une augmentation des contraintes de cisaillement, qui déclenche de multiples processus de signalisation intracellulaire dans l'endothélium (figure 4), entraînant une hyperpolarisation des CE, la production de métabolites dérivés des CE tels que l'oxyde nitrique (NO) ou la prostacycline (PGI₂) qui diffusent vers la couche de CMLV, permettant l'inhibition du tonus myogénique (Laughlin et al. 2012).

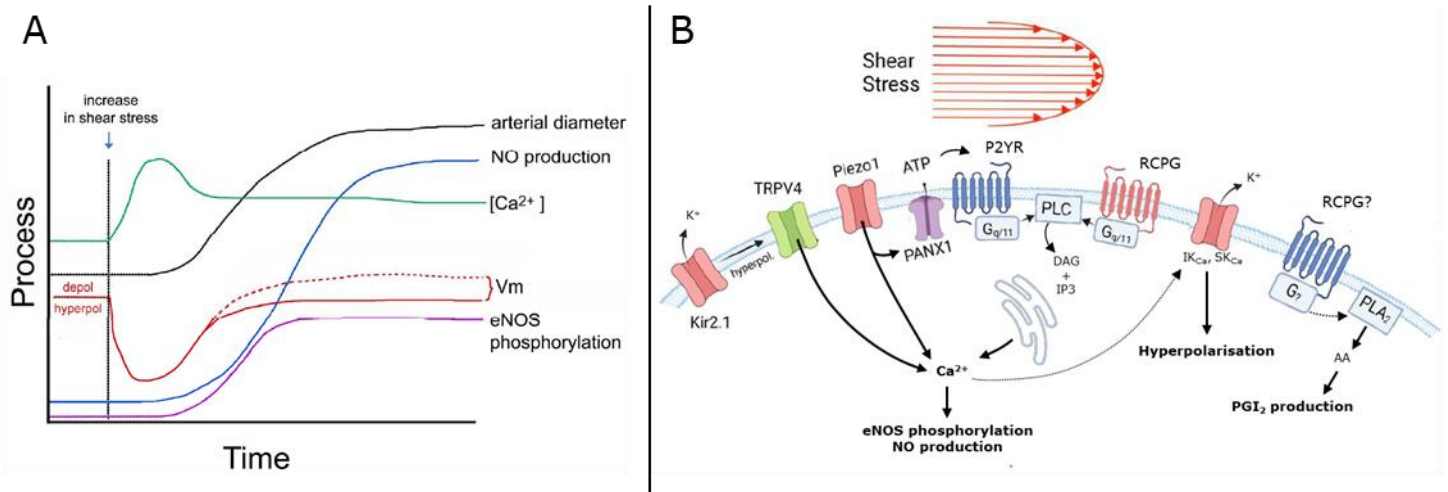


Figure 4 : Représentation hypothétique de l'évolution temporelle des événements contribuant à la dilatation flux-dépendante et des voies de signalisation mises en jeu

(A) Potentiel membranaire (Vm) : hyperpolarisation initiale par les canaux Kir2.1 suivie d'une dépolarisation secondaire (ligne rouge pointillée) due à l'activation d'un canal Cl⁻ activé par le Ca²⁺. [Ca²⁺] : concentration en Ca²⁺ intracellulaire issue de la libération initiale de Ca²⁺ à partir des réserves du réticulum endoplasmique (RE), suivie d'une entrée soutenue de Ca²⁺ à travers divers canaux ioniques perméables au Ca²⁺. Ces événements se produisent en parallèle et aboutissent à la phosphorylation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), la production de NO ainsi qu'une hyperpolarisation et la production de PGI₂ (B). Tous ces mécanismes se combinent pour diminuer la concentration en Ca²⁺ intracellulaire dans les CMLV afin d'augmenter le diamètre artériel et inhiber le tonus myogénique. Figure modifiée de (M. J. Davis et al. 2023).

1.3.4. Voies de signalisation dépendantes de l'endothélium

En réponse à une augmentation de débit, trois voies de signalisation de l'endothélium sont mises en jeu faisant intervenir des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF pour endothelium derived relaxing factor) : la voie du NO, la voie du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) et la voie de la prostacycline (PGI₂) (Guzman, Abe, et Zarins 1997), opposés aux facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF pour endothelium derived constricting factor) comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'endothéline 1 (ET-1).

a) Voie du NO

Les forces de cisaillement activent différents canaux mécanosensibles présents à la surface des CE (Piezo1, TRP), induisant un influx de Ca²⁺ dans les CE (figure 4). Parallèlement, la fixation de facteurs circulants comme l'acétylcholine (ACh) et la bradykinine sur leurs récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) respectifs induit l'activation de la phospholipase C (PLC), avec pour conséquence la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP3) (Nollert, Eskin, et McIntire 1990; Bhagyalakshmi et al. 1992) (figure 4). L'IP3 se lie aux récepteurs de l'IP3 et induit une libération rapide de Ca²⁺ à partir des réserves du réticulum endoplasmique (RE). L'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire active l'isoforme endothéliale de l'oxyde nitrique synthase (eNOS), une

enzyme régulée par le complexe Ca^{2+} /calmoduline (Fleming et Busse 1999; Fulton, Gratton, et Sessa 2001; Yingzi Zhao, Vanhoutte, et Leung 2015) entraînant la production de NO (figure 4). Les forces de cisaillement activent également un complexe mécanosensible au pôle jonctionnel des CE (PECAM-1 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), récepteur 2 du VEGF (VEGFR2), VE-cadhérine) activant la voie de signalisation de Src/PI3K (phosphoinositide 3-kinase) /AKT, qui phosphoryle la eNOS de manière indépendante du Ca^{2+} (Yingzi Zhao, Vanhoutte, et Leung 2015; Baratchi et al. 2017). Le NO produit par les CE diffuse au travers de la membrane plasmique et active la guanylate cyclase (GC) des CMLV. La production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) favorise la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine et la diminution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire des CMLV, aboutissant à la relaxation des CMLV.

b) Voie de l'EDHF

La voie du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), est activée par les contraintes de cisaillement, mais est encore mal décrite. Son activation est dépendante de la présence de Ca^{2+} intracellulaire, et peut être induite par les RCPG tels que les récepteurs muscariniques par exemple. L'activation de la voie de l'EDHF par le shear stress résulte en une hyperpolarisation des CE *via* l'efflux de potassium (K^+) par les canaux K^+ dépendants du calcium (IK_{Ca} et SK_{Ca}) (figure 4). L'hyperpolarisation est transmise aux CMLV *via* les jonctions myoendothéliales, microdomaines constitués par une projection endothéliale, engendrant une inhibition des canaux Ca_v et par conséquent une diminution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire des CMLV et la relaxation du muscle lisse.

Cependant, cette voie de l'EDHF semble plus répandue dans des conditions pathologiques que dans des conditions physiologiques (Schmidt et de Wit 2020).

c) Voie de la PGI_2

Le shear stress active également la voie de la PGI_2 , qui par l'action de plusieurs enzymes, transforme les phospholipides membranaires en acide arachidonique puis en prostaglandines dans la CE (figure 4). La PGI_2 agit au niveau des CMLV en activant l'adénylate cyclase entraînant la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui *via* l'activation de la protéine kinase A (PKA), permet la recapture du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique et donc la réduction de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire des CMLV, aboutissant à une vasorelaxation.

La dilatation flux-dépendante est nécessaire pour compenser les variations aiguës de débit sanguin. Après le début des variations de flux, la dilatation artérielle aurait un retard d'environ 6 à 15 secondes, ce qui correspond à l'activation des processus intracellulaires qui conduisent à la production de NO endothélial (M. J. Davis et al. 2023). Cependant, des variations chroniques du débit sanguin peuvent entraîner des perturbations des forces de cisaillement et favoriser le recrutement de cellules immunitaires, caractéristiques des pathologies comme l'athérosclérose.

1.4. Réponses pathologiques de l'endothélium (exemple de l'athérosclérose et de la dysfonction endothéliale)

L'implication des forces hémodynamiques dans le développement des maladies cardiovasculaires s'est avérée une composante clé dans la pathologie de l'athérosclérose, affectant à la fois l'apparition et la progression de la maladie.

1.4.1. Flux oscillatoire perturbé et athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie caractérisée par le dépôt de plaques (plaques d'athérome) essentiellement composées de lipides (cholestérol) dans la paroi des artères. A terme, ces plaques peuvent entraîner des lésions de la paroi artérielle, conduire à l'obstruction des vaisseaux ou encore céder et entraîner des embolies (Jebari-Benslaiman et al. 2022). L'installation de plaques d'athérome sont principalement situées dans les zones où le flux est perturbé (Michael A. Gimbrone et García-Cardena 2016; Jebari-Benslaiman et al. 2022) c'est-à-dire au niveau des ramifications et courbures des artères (figure 3) (Mulvany et al. 1996). Ce flux perturbé crée des gradients temporels et spatiaux, qui se traduisent par un indice oscillatoire plus élevé ou une contrainte de cisaillement plus faible. Le flux perturbé favorise l'infiltration des LDL dans l'intima des vaisseaux, d'une part parce que les LDL restent plus longtemps dans cette zone, et d'autre part parce que le flux turbulent induit *via* l'activation des mécanosenseurs une perturbation de l'intégrité endothéliale (Chistiakov, Orekhov, et Bobryshev 2017; Jebari-Benslaiman et al. 2022) avec un état cellulaire qui devient instable et la mise en place d'un environnement inflammatoire (figure 3) (Baeyens et al. 2016; Gordon, Schimmel, et Frye 2020; Jebari-Benslaiman et al. 2022).

Les signaux d'initiation de l'athérosclérose à la suite de la modification du flux sont la génération d'un stress oxydatif et un découplage de la eNOS ce qui a pour conséquence une perturbation de la fonction de la CE. Un recrutement des cellules immunitaires *via* l'expression de cytokines pro-inflammatoires et molécules d'adhésion à la surface des CE s'opère dans un deuxième temps.

1.4.2. Stress oxydatif et dysfonction endothéliale

La perturbation de la fonction de la CE appelée également dysfonction endothéliale est caractérisée par une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium associée à une diminution de la production de facteurs vasorelaxants tels que le NO, la PGI₂ et l'EDHF, ainsi qu'une augmentation des facteurs vasoconstricteurs tels que les ROS et l'ET-1. Cette dysfonction s'accompagne de lésions causées par des facteurs pro-thrombotiques (par exemple l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 ou PAI-1) et pro-inflammatoires (cytokines par exemple). Même si les mécanismes à l'origine de la dysfonction endothéliale sont complexes et peuvent être multifactoriels, il est maintenant bien reconnu que l'inflammation et le stress oxydatif contribuent à la diminution de la biodisponibilité du NO.

En effet, les CE vasculaires sont capables de produire de nombreux ROS. Ces radicaux libres : l'anion superoxyde (O₂⁻), le radical hydroxyle (HO·), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le peroxynitrite (ONOO⁻) et l'acide hypochloreux (HOCl) sont des dérivés réactifs du métabolisme du dioxygène (O₂). Les principales sources de production de ROS dans la CE sont la nicotinamide dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase ou NOX) au niveau de la mitochondrie et le découplage de la eNOS (Birukov 2009). Le découplage de la eNOS intervient en absence de la

tétrahydrobioptérine (BH₄) et/ou d'un apport insuffisant en arginine. Dans ces conditions, les sous-unités oxygénases de la eNOS fonctionnent indépendamment et produisent simultanément du NO et de l'anion superoxyde (figure 5).

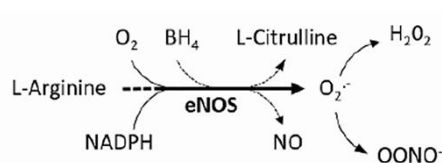


Figure 5 : Représentation schématique du découplage de la eNOS

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; BH₄ : tétrahydrobioptérine ; NO : monoxyde d'azote ; eNOS : NO synthase endothéliale ; O₂⁻ : anion superoxyde ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; OONO⁻ : peroxynitrite. Figure adaptée de (Birukov 2009).

Dans des conditions physiologiques, la production de ROS est compensée par leur élimination par des enzymes anti-oxydantes (superoxydes dismutases ou SOD) dont le rôle est de convertir l'O₂⁻ en H₂O₂. Dans des conditions pathologiques, un déséquilibre apparaît entre la production de NO et la génération de ROS. Cela conduit à un état de stress oxydatif, qui peut être lié à une production excessive de ROS (implication du découplage de la eNOS) et/ou une diminution de l'activité anti-oxydante (SOD) (Harrison et al. 2003).

Le stress oxydatif permet la synthèse de cytokines pro-athérogéniques c'est-à-dire propice à l'installation des plaques d'athérome avec la production de TNFα (tumor necrosis factor) et des interleukines IL-1 et IL-6, et de molécules d'adhésion incluant la molécule d'adhérence intercellulaire 1 (ICAM-1) et la molécule d'adhérence des cellules vasculaires 1 (VCAM-1), et de chimiokines comme MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), *via* l'activation de la voie NF-κB. Ces médiateurs inhibent l'activité de l'eNOS et par conséquent la production de NO, et contribuent à l'adhésion des leucocytes en particulier les monocytes, en parallèle d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, facilitant ainsi la transmigration des leucocytes dans la paroi artérielle et le remodelage vasculaire (figure 3) (Touyz et Schiffrin 2004; van Buul et Hordijk 2004).

1.4.3. Recrutement leucocytaire et modulation de l'inflammation

En parallèle du stress oxydatif, la composante inflammatoire se met en place d'une part par le recrutement des monocytes puis par l'activation de l'immunité adaptative. Le roulement des monocytes sur l'endothélium est médié par des molécules de la famille des sélectines (P-sélectine et E-sélectine SELE) ainsi que par VCAM-1 qui fixe l'intégrine α₄β₁ présente sur les monocytes (van Buul et Hordijk 2004). L'adhérence forte des monocytes à l'endothélium est médiée par leur interaction avec les chimiokines présentes à la surface de l'endothélium comme MCP-1 par exemple, et avec les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 présentées à la surface membranaire des CE (van Buul et Hordijk 2004). La transmigration des monocytes est permise par une augmentation de la perméabilité membranaire, et fait intervenir l'interaction homophile entre PECAM-1 des monocytes et des CE. Ce processus de migration s'effectue grâce à des chimiokines qui ont été préalablement sécrétées en réponse aux signaux pro-inflammatoires (van Buul et Hordijk 2004). Après l'activation de l'endothélium, les CE produisent le facteur hématopoïétique M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) qui permet la transdifférenciation des monocytes en macrophages. Les macrophages internalisent et accumulent les LDL oxydés *via* des récepteurs dont CD36, et se transforment en cellules spumeuses et nécrotiques. L'association des LDL oxydés au récepteur CD36 et au récepteur TLR (toll-like receptor) présents à la surface des macrophages, activent l'inflammasome

NLRP3 (complexe de protéines cytosoliques du système immunitaire inné) responsables de l'activation de la caspase-1, clivant la cytokine pro-inflammatoire pro-IL-1 β en IL-1 β , contribuant ainsi à l'expansion de l'inflammation (Jebari-Benslaiman et al. 2022). Concernant l'immunité adaptative, l'activation de l'endothélium permet l'infiltration des lymphocytes T dans l'endothélium et l'activation des lymphocytes T helper (auxiliaires) de type Th1 qui produisent l'interféron- γ (IFN- γ), facteur pro-athérogénique c'est-à-dire propice à la formation de plaques d'athéromes.

Les forces hémodynamiques participent également de manière prépondérante à l'athérogenèse par le fait que la détection des forces mécaniques par des mécanosenseurs, puis l'activation des voies de signalisation et de facteurs de transcription conduit à l'expression de divers gènes endothéliaux qui ont un rôle clé dans la balance athéroprotecteur/athéroprone (J. Zhou, Li, et Chien 2014; Baeyens et al. 2016; Jebari-Benslaiman et al. 2022).

2. Mécanosensibilité / Mécanotransduction des contraintes de cisaillement

Afin de convertir les signaux mécaniques des contraintes de cisaillement en signaux biochimiques intracellulaires influençant les fonctions cellulaires, les CE possèdent de nombreux capteurs, appelés mécanosenseurs, qui transmettent le signal au niveau intracellulaire *via* des mécanotransducteurs incluant des facteurs de transcription mécanosensibles et plusieurs voies de signalisation.

2.1. Mécanosenseurs vasculaires

A la surface des CE, les mécanosenseurs sont capables de détecter et de répondre aux stimuli des contraintes de cisaillement (résumés à la figure 6) (Givens et Tzima 2016). Bien qu'ils soient mécanosensibles dans la mesure où ils modifient leur expression et/ou modulent la signalisation en aval, définir si ces protéines sont des capteurs directs de la contrainte de cisaillement n'est pas évident, et le nombre de mécanosenseurs n'est pas clairement défini. De plus, la manière dont seraient activés ces mécanosenseurs oppose deux concepts/théories (cf 2.1.1. Concepts de la mécanosensibilité des protéines membranaires mécanosensibles). À la suite de l'activation de l'un de ces capteurs, un réseau complexe de plusieurs voies de signalisation intracellulaires est déclenché dans un processus connu sous le nom de mécanotransduction. Ces voies sont activées simultanément et/ou interagissent entre elles. Elles conduisent à la régulation de plusieurs facteurs de transcription, qui se lient aux éléments sensibles au stress de cisaillement (SSRE : shear stress responsive element) positifs ou négatifs dans les promoteurs des gènes mécanosensibles, induisant ou réprimant respectivement l'expression des gènes. Le rôle des principaux capteurs mécaniques et de leurs mécanismes d'action sont détaillés ci-dessous en fonction de leur localisation sur la membrane plasmique.

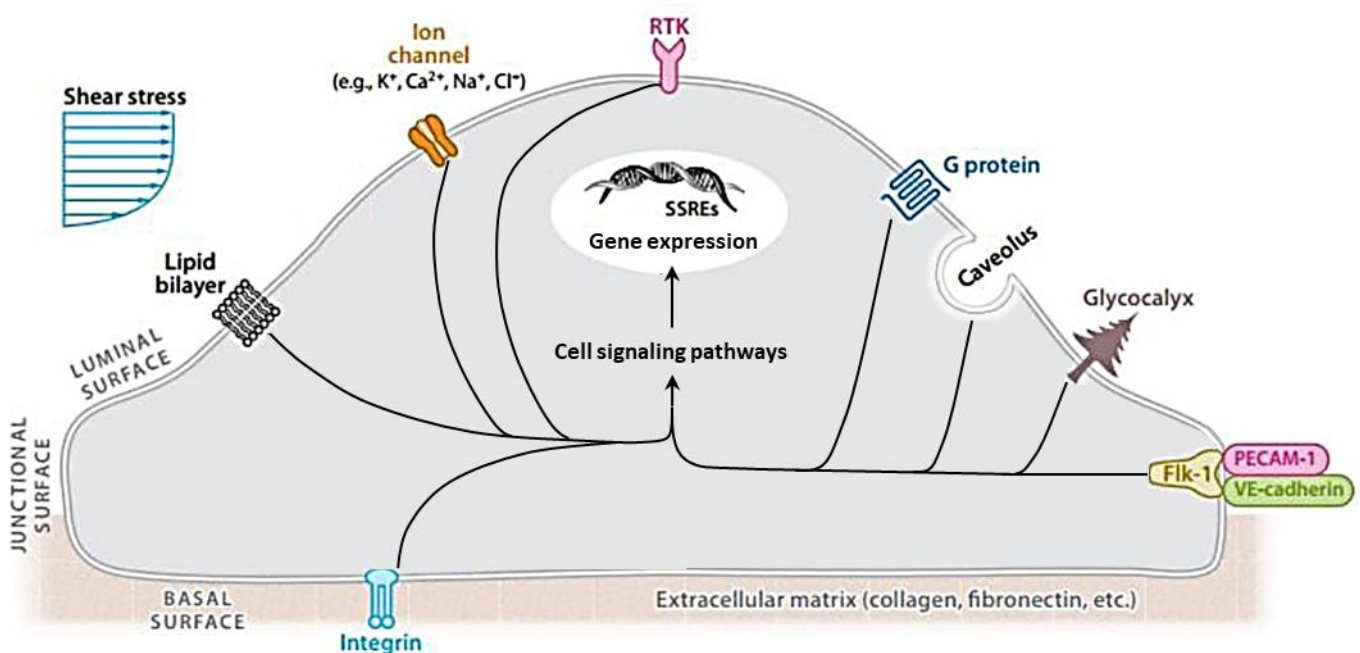


Figure 6 : Représentation schématique des mécanosenseurs impliqués dans la réponse au shear stress de la CE. Ces senseurs peuvent être divisés en plusieurs classes selon leur localisation membranaire : à la surface luminale, jonctionnelle, et basale. Figure modifiée de (Simmons, Kumar, et Jo 2016).

2.1.1. Concepts de la mécanosensibilité des protéines membranaires mécanosensibles

Deux hypothèses majeures ont été proposées pour le mécanisme moléculaire de l'activation mécanosensible des protéines membranaires (figure 7) : l'une implique des forces intrinsèques à la bicouche lipidique et l'autre implique l'attachement du canal au cytosquelette ou à d'autres composants (M. J. Davis et al. 2023).

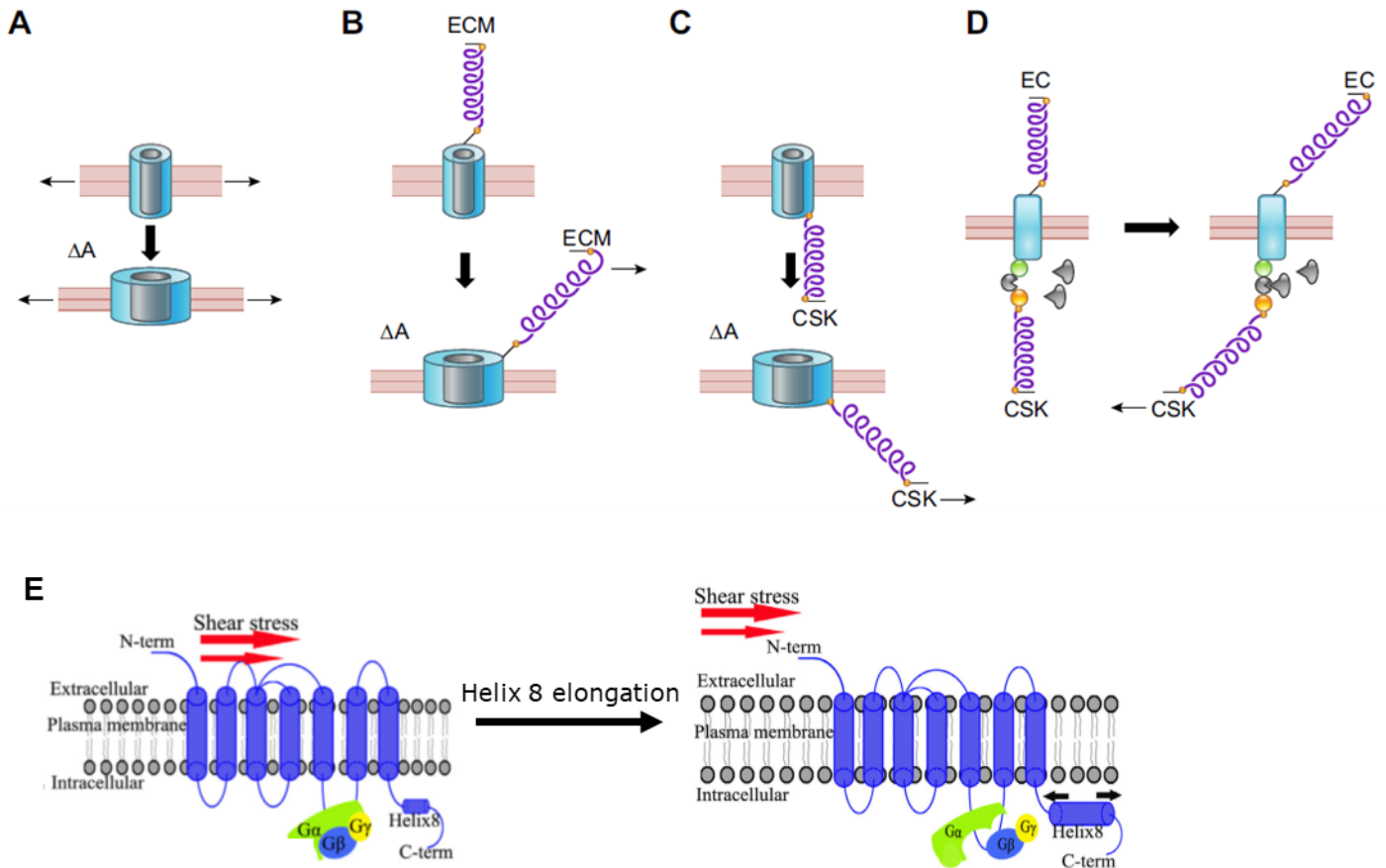


Figure 7 : Représentation schématique des concepts de la mécanosensibilité des protéines membranaires
A) Les changements de la tension membranaire (ΔA). B) La tension appliquée au canal ionique *via* le modèle d'une attache à la matrice extracellulaire (ECM). C) La tension appliquée au canal ionique *via* le modèle d'une attache au cytosquelette (CSK). D) La tension appliquée à d'autres protéines membranaires *via* le modèle d'une attache à la ECM et au CSK. E) Le shear stress induit un changement conformationnel des RCPG mécanosensibles engendrant une elongation de l'hélice 8 et par conséquent l'activation du RCPG. Figure adaptée de (M. J. Davis et al. 2023; Y. Hu 2022).

Il est bien établi que certains canaux (par exemple, Piezo1, K₂P) conservent la mécanosensibilité lorsqu'ils sont dans la bicouche lipidique en l'absence de sous-unités accessoires, de composants du cytosquelette et de la matrice extracellulaire (MEC) (Syeda et al. 2016). L'hypothèse de la « **force des lipides** » (FFL pour force from lipid) est définie par l'activation mécanosensible d'un canal ionique par une tension accrue de la bicouche phospholipidique, décrivant comment la force est transmise des lipides aux protéines (Teng et al. 2015). Les interactions des groupes de tête polaires phospholipidiques et des queues aliphatiques internes créent des forces push-pull (pousser-tirer) anisotropes (selon la direction) relativement importantes, auxquelles les protéines intégrées dans la membrane sont constamment exposées.

À l'interface lipide-eau de chaque bicouche, une grande tension superficielle tire vers l'extérieur sur une protéine membranaire intégrée, tandis qu'au plan médian de la bicouche, les forces de compression latérales poussent

vers l'intérieur (Gullingsrud et Schulten 2004; Wiggins et Phillips 2005; Morris et Juranka 2007; Cox, Bavi, et Martinac 2019). Les structures cristallines des canaux MscL bactériens et K₂P montrent que les changements de tension de la membrane peuvent modifier l'activation du canal (Vásquez et al. 2008; Brohawn, Su, et MacKinnon 2014) : la tension appliquée à la bicouche la fait « s'amincir », augmentant la surface (ΔA) du canal et l'ouverture du pore (figure 7A) (Perozo, Cortes, et al. 2002; Perozo, Kloda, et al. 2002). Ainsi, les changements de tension peuvent modifier les interactions de la protéine du canal avec les lipides pour modifier leur activation (Morris et Juranka 2007; Flegler et al. 2021).

Malgré les preuves de la théorie FFL, de nombreux canaux se comportent différemment dans les cellules natives ou après reconstitution en bicouches lipidiques. Par exemple, les canaux Piezo1 sont activés mécaniquement lorsqu'ils sont étudiés dans des bicouches, mais ils perdent leur propriété d'inactivation rapide (Syeda et al. 2016), probablement en raison de la perturbation de leur association normale avec STOML3, une protéine d'échafaudage membranaire. Bien que le cytosquelette assure la stabilité de la bicouche membranaire (Teng et al. 2015), il a été démontré que des protéines telles que la β -spectrine et l'ankyrine qui relient la membrane plasmique au cytosquelette, ainsi que l'actine reliant les éléments du cytosquelette entre eux, peuvent être critiques pour la transmission de la force aux protéines mécanosensibles dans d'autres systèmes (Hayakawa, Tatsumi, et Sokabe 2008; W. Zhang et al. 2015; Li Fraine et al. 2017). Ces observations et bien d'autres suggèrent que les attaches entre les protéines du canal et les protéines de la MEC (figure 7B), ou entre les canaux et les composants du cytosquelette (figure 7C), peuvent être essentielles pour conférer une mécanosensibilité normale à un canal ionique. L'attache peut servir de multiplicateur de force, agissant comme un levier à travers lequel les canaux mécanosensibles avec une faible sensibilité peuvent répondre à des forces faibles mais physiologiquement pertinentes (Poole, Moroni, et Lewin 2015). Dans ce modèle appelé la « **force des filaments** » (ou tether model), les protéines du cytosquelette et/ou de la MEC se connectent aux canaux ioniques mécanosensibles, transmettant directement ou indirectement la force pour activer les canaux mécanosensibles. Les filaments d'attache peuvent interagir directement avec les protéines des canaux, ou s'ancrer aux protéines auxiliaires imposant indirectement une tension sur les canaux (Cox, Bavi, et Martinac 2019; Chuang et Chen 2022).

Un autre mécanisme par lequel les forces mécaniques pourraient déclencher un canal ionique est à travers les attaches du cytosquelette et/ou la MEC qui entraînent l'exposition de domaines intracellulaires cachés lors de l'application de la force, permettant aux domaines intracellulaires du canal d'interagir avec des protéines cytoplasmiques telles que les kinases pour modifier l'activité du canal par phosphorylation par exemple (figure 7D). Bien que ce dernier mécanisme n'ait pas encore été décrit pour un canal ionique mécanosensible, sa pertinence est intéressante pour d'autres protéines comme des intégrines ou des protéines du cytosquelette (par exemple PECAM-1 ou au niveau des adhésions focales, (cf paragraphes 2.1.2 Mécanosenseurs du pôle jonctionnel et 2.1.3 Mécanosenseurs du pôle basal).

2.1.2. Mécanosenseurs du pôle apical

Au pôle apical des CE, différents éléments sont des senseurs du shear stress et sont indispensables à la transduction du signal mécanique en signaux biochimiques intracellulaires. Il s'agit du glycocalyx, des cils primaires, des protéines G hétérotrimériques et des RCPG, des canaux ioniques, des cavéoles, et des récepteurs Tie.

a) Glycocalyx

Situé à la surface apicale de l'endothélium vasculaire, et constamment exposé au flux sanguin, le glycocalyx a un rôle de senseur des contraintes de cisaillement (Barakat 2008). Le glycocalyx est un **maillage de polymères complexe et dynamique** qui se compose de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes (GAG) et de glycoprotéines, ainsi que de protéines plasmatiques adhérentes. L'importance du glycocalyx dans la réponse au shear stress a été démontrée par des expériences d'inhibition de différentes glycoprotéines, comme les heparin-sulfates ou les hyaluronan-sulfates. Leur inhibition empêche la production de NO induite par de fortes contraintes de cisaillement (Florian et al. 2003; Pahakis et al. 2007) et réduit l'expression de gènes inflammatoires (Huangfu et al. 2003; Grundmann et al. 2009; Potter et al. 2015). Le glycocalyx régule également le remodelage du cytosquelette d'actine (Thi et al. 2004). En effet, la dégradation des glycoprotéines (par digestion enzymatique des protéoglycanes heparan-sulfates (avec de l'heparinase III)) induit une perte de l'alignement en réponse aux fortes contraintes de cisaillement suite à un défaut de réorganisation de l'actine (Thi et al. 2004; Yao, Rabodzey, et Dewey 2007).

b) Cils primaires

Les cils primaires sont des **extensions cellulaires cytoplasmiques** de 3 à 5 cm de long, structurées par des faisceaux microtubulaires. Des preuves embryonnaires suggèrent un besoin de certaines protéines nécessaires à la formation de cils primaires comme les protéines de transport intraflagellaire Ift81, polycystin-2 (Pkd2) indispensables au bon développement du système vasculaire (Garcia-Gonzalez et al. 2010; Kallakuri et al. 2015). La présence de cils primaires dans l'endothélium vasculaire semble être régulée par le type et l'intensité des forces de cisaillement. Les cils primaires sont principalement retrouvés où les débits de flux sont faibles (1 dyne/cm²) (comme lors de l'embryogenèse (Goetz et al. 2014)) ou perturbés et sont pour la plupart absents dans les zones à débit élevé (15 dynes/cm²) (Egorova et al. 2012; Van der Heiden et al. 2008). En effet, il semblerait qu'un flux laminaire élevé physiologique (15 dynes/cm²) cause un désassemblage rapide des cils primaires des CE (Iomini et al. 2004) (figure 8). Ainsi, le fait que les cils primaires soient présents dans les zones à faible débit suggère qu'ils auraient un rôle d'amplificateur des signaux de cisaillement (Hierck et al. 2008). Les cils primaires endothéliaux intègrent les forces de cisaillement en mettant en place une signalisation précoce du Ca²⁺ entraînant la production de NO (Nauli et al. 2008). Pour cela, les cils primaires possèdent deux polycystines PC1, un RCPG, et PC2 (ou TRPP2 pour Transient receptor potential polycystic 2 en anglais) un canal Ca²⁺ (AbouAlaiwi et al. 2009). Suite à la flexion du cil primaire sous l'influence des forces de cisaillement, PC1 détecte ces forces mécaniques et active de manière constitutive les protéines Gi/o, conduisant à l'association physique et l'activation de PC2, ce qui permet l'entrée de Ca²⁺ et la production de NO (Deane et Ricardo 2007) (figure 8). L'interaction entre PC1 et PC2 réprime l'activation constitutive des protéines Gi/o de PC1 (Delmas et al. 2002).

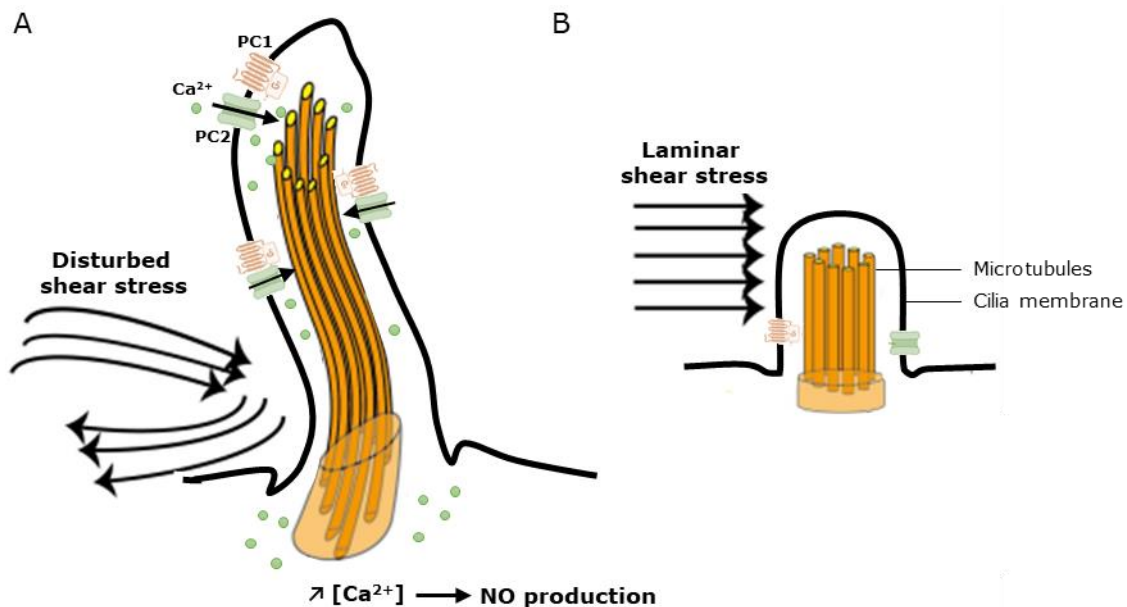


Figure 8 : Représentation schématique de l'effet du shear stress sur un cil primaire de la CE

A) Un shear stress perturbé active PC1 qui interagit et active PC2 induisant un influx de Ca^{2+} résultant en la production de NO. B) Sous un shear stress laminaire, les cils primaires deviennent plus petits et se désassemblent. Figure modifiée de (Z.-M. Wang et al. 2021).

c) Protéines G hétérotrimériques et Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des protéines membranaires composées de sept domaines transmembranaires, associées à une protéine G hétérotrimérique constituée de trois sous-unités ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$) à l'état inactif. L'activation d'un RCPG par son ligand spécifique induit un changement conformationnel, permettant au RCPG d'agir comme un facteur d'échange de nucléotide guanine ; la protéine G associée est alors activée en échangeant le GDP (guanosine diphosphate) lié à la protéine G contre un GTP (guanosine triphosphate). La sous-unité α de la protéine G liée au GTP ($G\alpha$ -GTP) se dissocie des sous-unités β et γ ($G\beta\gamma$) pour activer différents effecteurs et voies de signalisation intracellulaires selon le type de la sous-unité α (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$).

Les **protéines G hétérotrimériques** participent à la signalisation du shear stress, en tant que senseur et transducteur, indépendamment de l'activation des RCPG, et peuvent également former des complexes mécanosensibles avec des senseurs connus. Parmi les protéines G hétérotrimériques, la protéine $G_{q/11}$ est celle dont l'implication dans la réponse au shear stress a été le plus décrite. En effet, la protéine $G_{q/11}$ est activée par les forces de cisaillement et ce indépendamment de l'activation des RCPG (dela Paz, Melchior, et Frangos 2017). De plus, l'extinction de $G_{q/11}$ par siRNA augmente le temps nécessaire pour l'influx Ca^{2+} à la suite du shear stress (AbouAlaiwi et al. 2009; M. E. McCormick et al. 2015). La protéine $G_{q/11}$ peut agir comme une protéine G sur les RCPG comme sur la brakinine B_2 ou le récepteur 3 à la sphingosine-1-phosphate ($S1PR_3$) (Chachisvilis, Zhang, et Frangos 2006; dela Paz, Melchior, et Frangos 2017). Enfin, le rôle mécanosenseur de la protéine $G_{q/11}$ peut aussi être lié à son association avec PECAM-1 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), un mécanosenseur au pôle jonctionnel, et la localisation de ce complexe semble être dépendante du type de flux (Otte et al. 2009).

Les **récepteurs couplés aux protéines G** (ou RCPG) sont aussi considérés comme des mécanosenseurs. Les forces de cisaillement induisent des modifications de la tension et la fluidité membranaire (théorie FFL cf paragraphe 2.1.1. Concepts de la mécanosensibilité des protéines membranaires mécanosensibles) affectant la conformation des RCPG de façon dynamique, indépendamment de la fixation du ligand, suggérant que les RCPG

sont impliqués dans la transduction primaire du signal mécanique en signaux biochimiques intracellulaires dans les CE (Chachisvilis, Zhang, et Frangos 2006; Y. Hu 2022).

Ainsi, les récepteurs à la bradykinine B_2 (**B₂Rs**) exprimés de manière abondante dans les CE vasculaires (C. D. Figueroa et al. 2001) sont activés par le shear stress, indépendamment de la fixation de la bradykinine, puissant vasodilatateur (Leeb-Lundberg et al. 2005), et traduisent ce signal mécanique *via* un changement conformationnel du récepteur et l'activation de la protéine $G_{q/11}$ (Chachisvilis, Zhang, et Frangos 2006).

Le récepteur 1 à la sphingosine-1-phosphate (**S1PR₁**) fortement exprimé également dans les CE vasculaires (Kono et Proia 2015) est un composant crucial de la signalisation biomécanique dans les CE. Il est activé par les contraintes de cisaillement laminaires de manière indépendante de son ligand (Jung et al. 2012). S1PR₁ activé se lie à une protéine $G_{i/o}$ nécessaire pour la transduction du signal de nombreuses voies sensibles aux forces de cisaillement, telles que l'activation de la voie PI3K/AKT et la eNOS, favorisant la vasorelaxation (Y. Hu 2022) (figure 9).

Dans les CE des artères de résistance où il est fortement exprimé, **GPR68** fonctionne comme un capteur de débit et est également un composant important de transduction du signal (J. Xu et al. 2018). La contrainte de cisaillement et d'autres facteurs (pH bas, niveau d'acidification extracellulaire, degré d'étirement de la membrane, polymérisation de l'actine du cytosquelette) peuvent activer GPR68 (Wei et al. 2018; J. Xu et al. 2018). En tant que récepteur couplé à la protéine $G_{q/11}$, l'activation de GPR68 peut provoquer le clivage de PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en IP3 et DAG *via* la PLC et induire la libération des stocks de Ca^{2+} (J. Xu et al. 2018) (figure 9), pouvant déclencher rapidement des cascades de signalisation dans les CE, y compris l'activation des canaux ioniques K^+ dépendants du Ca^{2+} (IK_{Ca} , SK_{Ca}), la libération de l'EDHF et la synthèse de NO (Grgic et al. 2009) (figure 4) (cf paragraphe 1.3.4 Voies de signalisation dépendantes de l'endothélium).

Le récepteur à l'histamine H_1 (**H₁R**) est exprimé dans divers tissus de l'organisme (Shiroishi et Kobayashi 2017) et il est fortement exprimé dans les CE, où son niveau d'expression est supérieur à celui dans les cellules musculaires lisses (Hide et al. 1988). Tout comme pour le récepteur à la bradykinine ou à la sphingosine-1-phosphate, les contraintes de cisaillement peuvent activer H₁R dans les CE de manière indépendante de l'agoniste. Cela contribue à l'activation de la protéine $G_{q/11}$ et tout comme dans la signalisation de GPR68, cela entraîne un clivage de PIP2 en IP3 et DAG *via* la PLC. L'IP3 peut favoriser la libération de Ca^{2+} du RE, activant la eNOS pour produire le NO (figure 9) et provoquant une vasodilatation induite par le flux (Ebeigbe et Talabi 2014; Erdogmus et al. 2019) (figure 4) (cf paragraphe 1.3.4 Voies de signalisation dépendantes de l'endothélium). De plus, H₁R active la phospholipase A2 (PLA₂) *via* une protéine $G_{i/o}$, donnant lieu à la production de NO et de PGI₂ (Y. Hu 2022) (figure 9). La présence et l'élongation de l'hélice fonctionnelle 8 (H8) sur la protéine H₁R (originellement non mécanosensible) en réponse à la tension exercée sur la bicouche lipidique par le shear stress et de l'augmentation de la perméabilité membranaire (théorie FFL), semblent lui conférer une mécanosensibilité (figure 7E). L'hélice H8 est considérée comme le motif structural essentiel pour conférer aux RCPG une mécanosensibilité (Erdogmus et al. 2019; Y. Hu 2022).

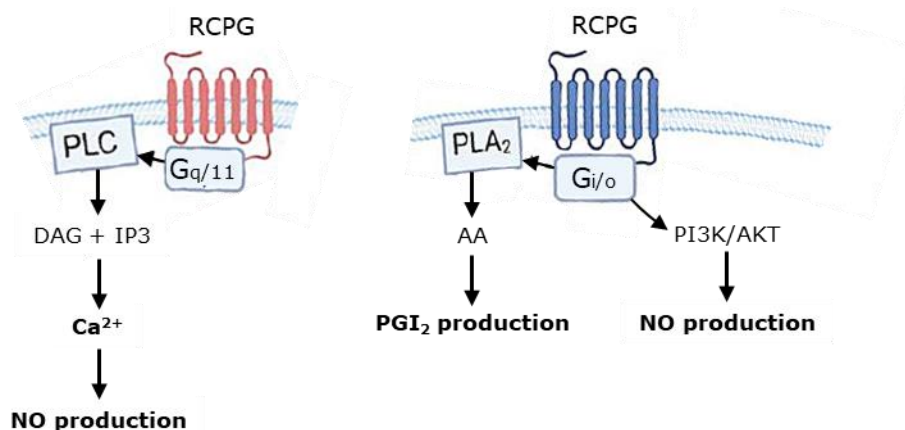


Figure 9 : Représentation schématique des voies de signalisation des RCPG mécanosensibles. La voie $G_{q/11}$ est majoritaire dans la réponse au shear stress mais la voie $G_{i/o}$ est retrouvée dans la voie de signalisation $S1PR_1$ et $H1R$. Figure modifiée de (Y. Hu 2022).

Pour résumé, l'ensemble des travaux décrit ci-dessus montrent que les RCPG et les protéines G sont fortement impliquées dans la mécanotransduction des forces de cisaillement et peuvent être des mécanosenseurs couplés ou à part entière.

d) Canaux ioniques

Plusieurs canaux ioniques sont des capteurs des forces de cisaillement dans les CE, et ils sont décrits pour induire la réponse la plus rapide parmi tous les mécanosenseurs à la suite de ces contraintes.

Le canal potassique endothélial **Kir2.1** est sensible aux forces de cisaillement lorsqu'il est exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis* (Hoger et al. 2002), ou dans les CE mésentériques (Fancher et Levitan 2020). Le shear stress induit une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux potassiques qui conduit à une activation du courant sortant K^+ dans les CE (Fang et al. 2005), résultant en une hyperpolarisation membranaire (Fang et al. 2006). Celle-ci est nécessaire au maintien du potentiel de membrane des CE et joue un rôle dans la vasorelaxation dépendante de l'endothélium, notamment par la régulation de la production de NO (Ahn et al. 2017). L'hyperpolarisation membranaire en réponse au shear stress est capable de faire fonctionner la driving-force pour faire entrer du Ca^{2+} en intracellulaire (Olesen 1988 ; Nakache 1988), induisant une dépolarisation impliquant des canaux chlore Cl^- (Barakat 1999).

Le canal calcique **TRPV4** (ou Transient Receptor Potential Vanilloid 4) est sensible à de multiples stimuli, notamment la chaleur, les esters de phorbol, l'acide arachidonique, le choc hypotonique et les contraintes de cisaillement (Gao, Wu, et O'Neil 2003; Hiroyuki Watanabe, Davis, et al. 2002; Hiroyuki Watanabe, Vriens, et al. 2002; Hiroyuki Watanabe et al. 2003). TRPV4 régule la vasodilatation dépendante du flux dans les artères carotides, les artères mésentériques du rat et les artérioles (Köhler et al. 2006; Hartmannsgruber et al. 2007; Earley et al. 2009; Mendoza et al. 2010), en influençant la production de NO des CE (Cabral et Garvin 2014) ce qui suggère son importance dans le système vasculaire. TRPV4 forme également un complexe hétérotrimérique sensible au flux avec TRPP2 (PC2 retrouvé dans les cils primaires) et TRPC1 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 1) (Du et al. 2014).

Les canaux ioniques mécanosensibles **Piezo1** et **Piezo2** ont été découverts en 2010 par Bertrand Coste lors de son postdoctorat chez Ardem Patapoutian (Coste et al. 2010). L'étude de ces canaux est l'objet de recherches

intensives (plus de 2 000 publications depuis 2010 ; 53 en 2010 et 360 en 2022) et la découverte de ces récepteurs sensibles aux forces mécaniques de faible intensité comme le toucher ou le shear stress a fait l'objet du Prix Nobel de Médecine en 2021. Les gènes des canaux Piezo ont été retrouvés dans les plantes et les animaux (dont les protozoaires) mais pas dans les bactéries. La plupart des vertébrés ont deux gènes : *Piezo1* et *Piezo2*, codant pour deux grandes protéines de 2500 à 2800 acides aminés respectivement (Parpaite et Coste 2017). Les canaux Piezo contiennent entre 24 et 36 domaines transmembranaires. Piezo1 est un complexe homotrimérique de 900 KDa formant un canal ionique qui a une configuration en forme de triskèle (figure 10). Ce complexe est tellement de haut poids moléculaire que la membrane plasmique est déformée et prend une forme de dôme (figure 10). Piezo1 conduit sélectivement des cations : Na^+ K^+ Ca^{2+} et Mg^{2+} , avec une préférence pour le Ca^{2+} ; tandis que Piezo2 a une conductance cationique non-sélective.

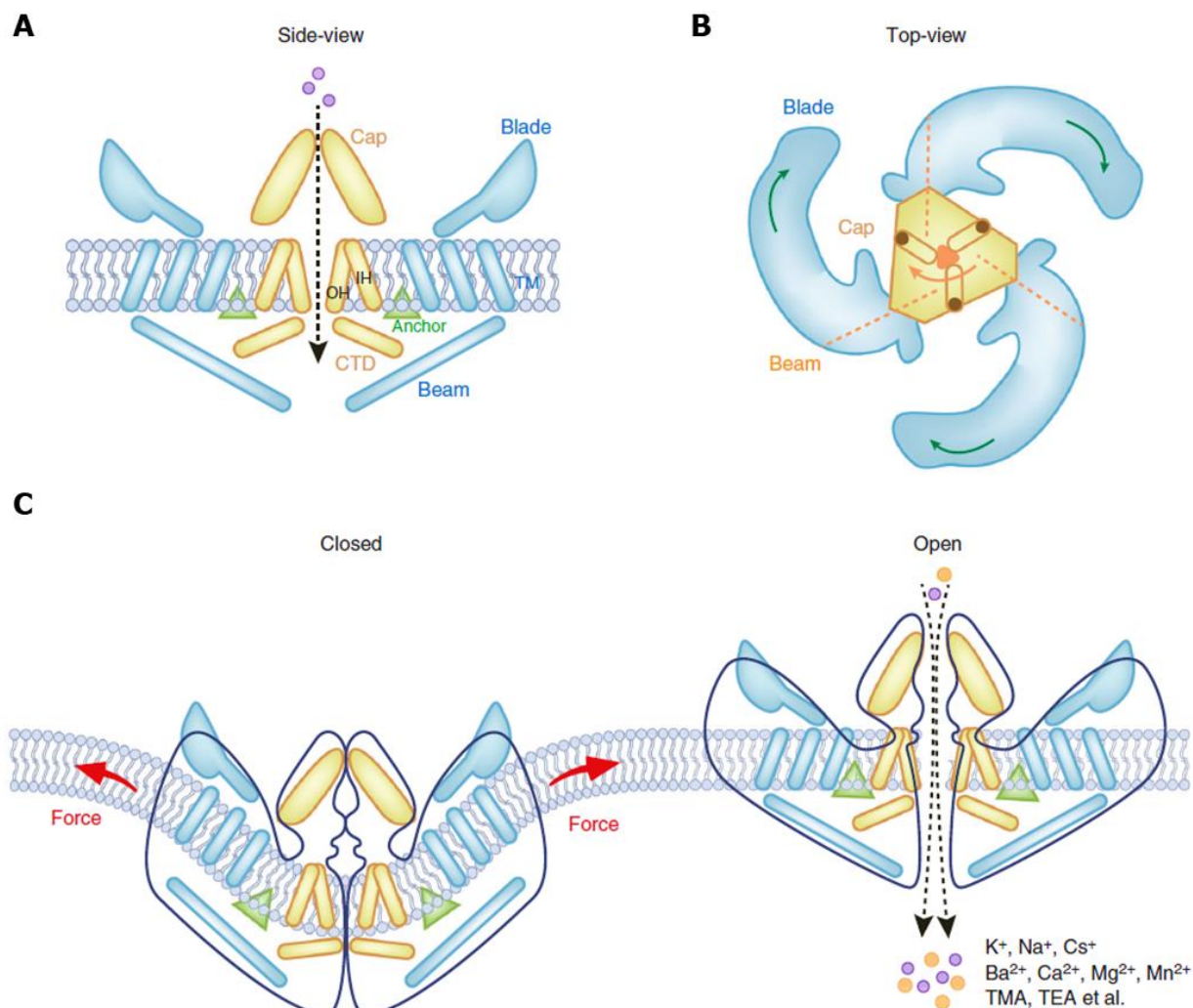


Figure 10 : Représentation schématique de l'architecture homotrimérique de Piezo1 murin.

A) Vue latérale du canal Piezo1 composé du pore (jaune) et d'un module de mécanotransduction (bleu). Le pore est formé par la structure Cap extracellulaire, la partie transmembranaire et le domaine intracellulaire C-terminal (CTD). Le module de mécanotransduction périphérique comprend une longue structure en forme de faisceau (Beam), une lame périphérique (blade) et un domaine d'ancrage unique (anchor). Le domaine d'ancrage formé est relié au CTD par la paire d'hélices intérieures (IH) et d'hélices extérieures (OH), qui maintiennent l'intégrité du canal. B) Vue de dessus du canal Piezo1. Les grands domaines de lames extracellulaires peuvent courber la membrane plasmique et les trois lames sont assemblées en trimères fonctionnels. C) Les protéines Piezo1 de mammifères peuvent être directement contrôlées par l'étirement de la membrane et former un dôme. Les canaux Piezo sont des canaux mécanosensibles cationiques non sélectifs, perméables aux ions alcalins (K^+ , Na^+ et Cs^+), aux cations divalents (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+}) et à plusieurs cations organiques (tétraméthylammonium (TMA), tétraéthylammonium (TEA)). Figure modifiée de (L. Qin et al. 2021).

Chez les mammifères, les canaux Piezo sont exprimés dans un grand nombre de tissus, et contribuent à la mécanotransduction dans de nombreux organes. Si Piezo1 n'est pas exprimé dans les neurones sensoriels, Piezo2 est présent dans les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale (DRG) et les cellules de Merkel (cellules neuroendocrines d'origine épidermique), où il est le principal senseur du toucher léger et de la proprioception (sens de la position de corps et de ses mouvements). Piezo1 est très exprimé dans les poumons, la vessie et la peau, et a été identifié comme senseur des forces mécaniques dans les CE, cellules urothéliales et rénales. Dans les CE, Piezo1 agit comme un senseur du flux sanguin et est nécessaire à l'alignement des CE dans la direction du flux (J. Li et al. 2014; Ranade et al. 2014). De plus, les souris knock-out *Piezo1* ne parviennent pas à développer un système cardiovasculaire fonctionnel et présentent une létalité embryonnaire (14^{ème} jour embryonnaire) (J. Li et al. 2014; Ranade et al. 2014). À la suite d'une stimulation par des forces de cisaillement, la tension membranaire des CE change et résulte en une modification de la structure de Piezo1 et en son activation (théorie FFL même si la théorie de la force des filaments n'est pas exclue, cf paragraphe 2.1.1. Concepts de la mécanosensibilité des protéines membranaires mécanosensibles). L'ouverture de Piezo1 induit un courant cationique (Syeda et al. 2016; Cox et al. 2016). L'influx calcique stimule la libération d'ATP (adénosine triphosphate) par le récepteur à la pannexine 1 (PANX1) ce qui conduit à l'activation du récepteur purinergique P2Y2 couplé à la protéine G $\alpha_{q/11}$ induisant *via* l'activation des récepteurs à l'IP3 du RE, la libération de Ca²⁺ dans le cytosol entraînant la production de NO ; provoquant ainsi une vasodilatation (S. Wang et al. 2016) (figure 4B).

e) Cavéoles

Les **cavéoles** sont des invaginations de la membrane plasmique enrichies en glycosphingolipides et en cholestérol et sont abondantes dans les CE de mammifères (Shihata et al. 2016). Les cavéoles qui fonctionnent comme des plateformes de signalisation mobiles sont constituées de protéines de la famille des cavéolines (CAV-1 et CAV-2) et des cavines (cavin-1 à 3) (Ariotti et Parton 2013; Echarri et Del Pozo 2015). CAV-1 agit comme une protéine chaperonne, régulant l'internalisation des cavéoles en stabilisant les cavéoles au niveau de la membrane plasmique, tandis que le rôle de CAV-2 varie en fonction du type de cellule et de tissu (Ariotti et Parton 2013). Il a été émis l'hypothèse que CAV-1 fonctionne comme le régulateur principal de la signalisation de la membrane plasmique en réponse au stress mécanique, y compris aux forces de cisaillement (Echarri et Del Pozo 2015). De nombreux canaux cationiques et pompes ioniques sont également localisés dans les cavéoles et CAV-1 est un déterminant important de la signalisation calcique dans les CE (Echarri et Del Pozo 2015). Le shear stress induit une réorganisation (augmentation de la densité) des cavéoles (Boyd et al. 2003) permettant de contrôler la perméabilité membranaire (Marmon et al. 2009; H. Wu et al. 2016) et de réguler le cytosquelette d'actine, de par l'interaction de CAV-1 avec les intégrines $\beta 1$ *via* p190RhoGAP (une protéine activant la RhoA GTPase) et la RhoA GTPase (B. Yang et al. 2011; Zeng et Tarbell 2014). De plus, l'expression de CAV-1 contrôle la production de NO, ce qui suggère que les cavéoles contribueraient à l'activation de la eNOS en réponse à de fortes contraintes de cisaillement et à la relaxation des vaisseaux (J. Yu et al. 2006; Sowa 2012) (cf paragraphe 2.3.6 NO).

f) Récepteurs Tie

Un des membres des récepteurs tyrosine kinases de la famille Tie est également impliqué dans la détection des forces de cisaillement (Chen-Konak et al. 2003; Porat et al. 2004). **Tie1**, une tyrosine kinase avec des domaines 1 de type immunoglobuline et de type EGF, est exprimée exclusivement dans les CE et particulièrement retrouvée

dans les régions exposées à des contraintes de cisaillement perturbées (Chen-Konak et al. 2003; Woo et al. 2011). *In vitro*, un shear stress laminaire régule à la baisse son expression, tandis que le shear stress perturbé augmente l'activité du promoteur Tie1 (Chen-Konak et al. 2003). La suppression de Tie1 augmente l'activation d'eNOS et entraîne une diminution des signaux inflammatoires en réponse au flux laminaire *in vitro* (Chen-Konak et al. 2003). De plus, les souris knock-out *Tie* présentent une létalité embryonnaire précoce (13-14^{ème} jour embryonnaire) dues à un dysfonctionnement des CE vasculaires (Puri et al. 1995). Chez les souris *ApoE*^{-/-} *Tie1*^{+/-} la diminution de l'expression de Tie1 dans l'endothélium engendre une réduction de la progression de l'athérosclérose en comparaison avec les souris *ApoE*^{-/-} *Tie1*^{+/+} (Woo et al. 2011). Ces données montrent que la formation de plaques d'athérome n'est pas exclusivement due au fait que le flux perturbé permet aux LDL de persister et de s'infiltrer dans la zone où le flux est perturbé, mais bien que les plaques d'athérome sont également formées grâce à l'implication de mécanosenseurs comme Tie qui permet de réguler de manière critique la réponse endothéliale à un shear stress.

2.1.3. Mécanosenseurs du pôle jonctionnel

Au pôle jonctionnel, les CE possèdent un complexe protéique mécanosensible composé de PECAM-1, VEGFR2 et la VE-Cadhérine, qui permet la communication avec les protéines du cytosquelette et assure l'intégrité membranaire (Dorland et Huveneers 2017).

a) PECAM-1

PECAM-1 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) ou CD31, est une molécule d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines (Ig). Cette glycoprotéine membranaire est abondante et constitutivement exprimée au niveau des jonctions intercellulaires sur l'endothélium vasculaire (Newman et al. 1990). En raison des spécificités de ses résidus extracellulaires et intracellulaires, PECAM-1 est considérée à la fois comme une protéine d'adhésion et une protéine de signalisation (Lertkietmongkol et al. 2016). En effet, PECAM1 peut former des interactions cis-homophiles (avec elle-même de façon parallèle) et trans-homophiles (avec elle-même de façon opposée) intercellulaires grâce à ses domaines Ig extracellulaires (L. Jiang et al. 2016). Cette fonction d'adhésion est nécessaire au maintien de l'intégrité vasculaire et pour résister aux forces mécaniques du shear stress (Bagi et al. 2005; Y. Liu et al. 2006; Caligiuri 2020). PECAM-1 est également considérée comme une protéine de signalisation puisqu'elle possède des sites de phosphorylation (sérine 702) et deux résidus tyrosine intracytoplasmiques ou motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs) qui, une fois phosphorylés en réponse à un shear stress, régulent le recrutement de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 (ou PTPN11 pour Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11) conduisant à l'activation de la voie PI3K/AKT (Osawa et al. 2002; Tourdot et al. 2013) (figure 11). Même si PECAM-1 est préférentiellement localisée au niveau jonctionnel, PECAM-1 est importante pour le remodelage du cytosquelette en réponse au shear stress *via* la régulation de l'expression d'intégrines au niveau basal (Z. Chen et Tzima 2009; Dorland et Huveneers 2017). En effet, les souris déficientes en *Pecam-1* présentent des niveaux réduits d'intégrine $\beta 1$ active, responsables de l'activation réduite de RhoA et de l'assemblage des fibronectines en aval. Ainsi, PECAM-1 agit donc comme un mécanosenseur « individuel » mais elle est également un composant crucial du complexe mécanosensible jonctionnel PECAM-1, VEGFR2 et VE-Cadhérine.

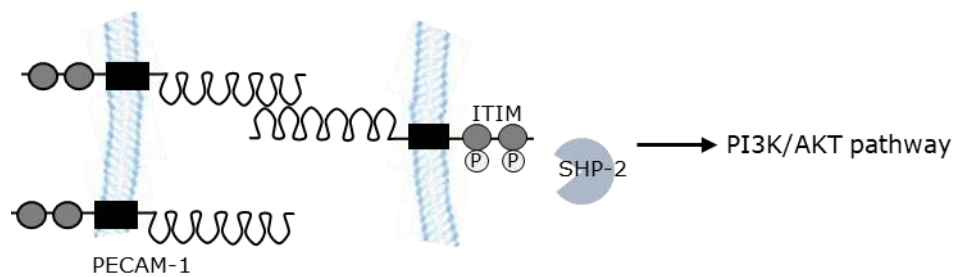


Figure 11 : Représentation schématique de l'effet du shear stress sur PECAM-1 au niveau jonctionnel. Le shear stress induit la phosphorylation des motifs ITIM de PECAM-1, permettant le recrutement de SHP-2 engendrant l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT.

b) PECAM-1, VEGFR2, VE-Cadhérine

PECAM-1 peut donc s'associer à d'autres protéines jonctionnelles pour former un complexe avec la VE-Cadhérine et les récepteurs 2 et 3 du VEGF (VEGFR2 et VEGFR3) (Dejana et al. 2009; Lertkietmongkol et al. 2016). Dans ce modèle, le shear stress induit une augmentation de la tension à travers PECAM-1, médiée par une association avec la vimentine (Conway et Schwartz 2015). Après la phosphorylation de PECAM-1, l'activation de la kinase Src prend place et en réponse phosphoryle et active **VEGFR2**, qui à son tour stimule la voie de signalisation PI3K-AKT (Tzima et al. 2005) (figure 12). Le domaine transmembranaire de la **VE-Cadhérine** est nécessaire au recrutement de VEGFR2 et à la formation du complexe mécanosenseur (Coon et al. 2015). La VE-Cadhérine est nécessaire à l'alignement des cellules dans la direction du flux, et l'activation des intégrines (Tzima et al. 2005; Dorland et Huveneers 2017) (figure 12).

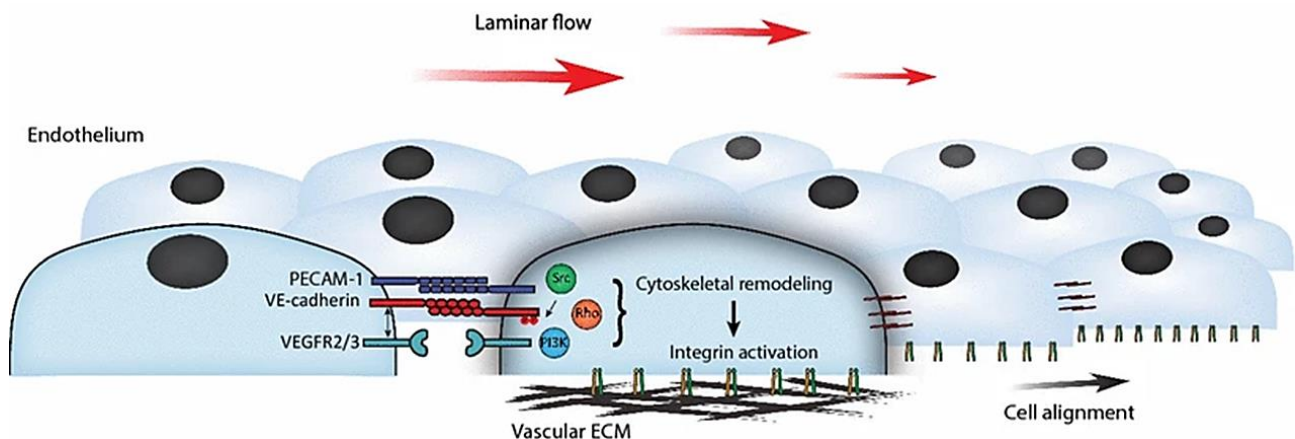


Figure 12 : Représentation schématique de l'effet du shear stress sur le complexe jonctionnel mécanosensible. Le shear stress laminaire est perçu par le complexe mécanosenseur au niveau jonctionnel composé de PECAM-1, de la VE-Cadhérine et du VEGFR2/3. L'activation de la voie de signalisation contrôlée par Src, Rho, et PI3K intervient dans le remodelage du cytosquelette et l'activation des intégrines au niveau basal, permettant l'alignement des cellules dans le sens du flux. Figure issue de (Dorland et Huveneers 2017).

Plus récemment, une étude a identifié le **VEGFR3** comme un nouveau composant de ce complexe (Coon et al. 2015). Dans ce modèle, la VE-cadhérine, en aval de PECAM-1, agit comme un adaptateur pour la transmission du signal mécanique aux VEGFR2 et 3. Les composants de ce complexe semblent être particulièrement importants dans la détection de l'intensité des contraintes de cisaillement et dans la mise en place du remodelage vasculaire. En effet, les souris *Pecam-1* ^{-/-} présentent des défauts de remodelage vasculaire dans un modèle de ligature carotidienne partielle (Z. Chen et Tzima 2009). Il semble que la phosphorylation de la VE-cadhérine sur Y658 soit

modulée par l'intensité du shear stress (Orsenigo et al. 2012) et que cette phosphorylation soit cruciale pour la détection du flux à travers le complexe jonctionnel (Conway et Schwartz 2015). De plus, l'expression de VEGFR3 a également été modulée par l'intensité du shear stress, et le niveau d'expression de VEGFR3 s'est avéré participer à la détection du shear stress. Une expression élevée de VEGFR3 est corrélée à une sensibilité plus élevée au shear stress, tandis qu'une faible expression de VEGFR3 diminue la sensibilité au shear stress. Ainsi, l'expression de VEGFR3 et de ses partenaires semblent être déterminante dans la régulation du remodelage vasculaire en réponse au flux (Baeyens et al. 2016). Cependant, aucun travail n'a montré un rôle de ce complexe dans la réponse au flux pathologique et la mise en place des plaques d'athérome.

2.1.4. Mécanosenseurs du pôle basal

En plus de l'exigence du complexe jonctionnel pour la détection des contraintes de cisaillement, les **adhésions focales** (AF) qui assurent l'ancrage des CE à la membrane basale semblent être importantes dans la mécanosensibilité (Ando et Yamamoto 2013). Les AF sont de grands complexes multiprotéiques reliant les intégrines à la MEC, qui assurent la transmission des stimuli mécaniques à la cellule (Chistiakov, Orekhov, et Bobryshev 2017). Les AF contiennent une variété de protéines adaptatrices telles que la taline, la tensine, la filamine et l' α -actinine qui sont impliquées dans la liaison des intégrines avec l'actine du cytosquelette (Zaidel-Bar et Geiger 2010) et une variété de protéines kinases qui assurent la transmission du signal (cf paragraphe 2.3.5 Protéines d'adhésion focale : FAK) (figure 13).

Les **intégrines** associées aux AF servent de mécanotransducteurs des contraintes de cisaillement sur l'actine du cytosquelette et assurent les communications entre les AF adjacentes, la MEC et les récepteurs membranaires (Jalali et Chien 2001) (figure 13). Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une sous-unité α souvent responsable de la liaison avec les protéines extracellulaires, et d'une sous-unité β qui recrute les protéines régulatrices intracellulaires (Vicente-Manzanares, Choi, et Horwitz 2009). Chez les mammifères, on dénombre 19 sous-unités α et 8 sous-unités β , formant en combinaison jusqu'à 25 couples différents (Humphries 2000). Chacune des sous-unités possède un domaine extracellulaire qui se lie directement avec des protéines de la MEC (collagène, fibrinogène, vitronectine, laminine) et un domaine cytoplasmique qui interagit avec le cytosquelette *via* des protéines aux sites d'AF (comme la vinculine, taline, α -actine) (Florian et al. 2003; Janoštiak et al. 2014; Baratchi et al. 2017) (figure 13).

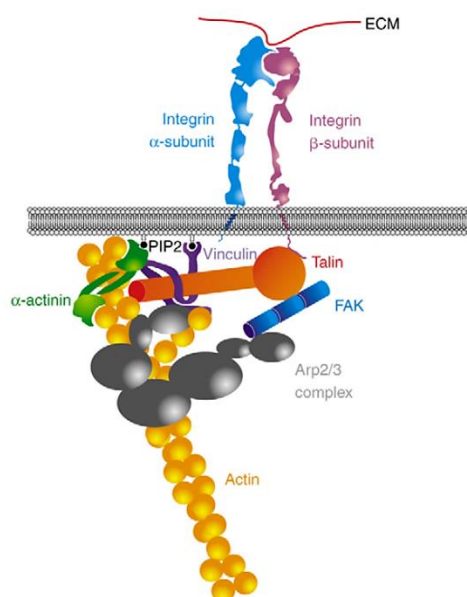


Figure 13 : Représentation schématique du lien entre une intégrine, la MEC et le cytosquelette d'actine. Les intégrines représentées par les sous-unités α (bleu) et β (violet) peuvent se lier directement au domaine de la tête de taline (orange). La taline se lie à l'actine (jaune) ainsi qu'à d'autres composants de liaison, comme la vinculine (violet). La vinculine se lie directement à l'actine et à l' α -actinin (vert) via l'ancrage à la membrane et leur activité est modulée par des interactions avec le PIP2. La vinculine et la kinase d'adhésion focale (FAK) (bleu) se lient au complexe d'actine Arp2/3 (gris). Figure issue de (Vicente-Manzanares, Choi, et Horwitz 2009).

En réponse aux forces de cisaillement, les intégrines peuvent modifier leur état d'agrégation à la membrane plasmique (Janoštiak et al. 2014). Les modifications des forces mécaniques engendrent une agrégation des intégrines dans les AF par exemple. L'activation de ces sites d'AF par les contraintes de cisaillement participe non seulement à l'attache des cellules à leur substrat, mais aussi à la transmission intracellulaire des signaux mécaniques conduisant à des modifications du cytosquelette stabilisant la structure nucléaire (Maniotis, Chen, et Ingber 1997) et conduit également à l'orientation des CE dans le sens du flux (*via* l'activation de la protéine RhoA) (Song Li et al. 2002). En réponse au shear stress, les intégrines $\beta 1$ peuvent être retrouvées dans les cavéoles où elles permettent, *via* le recrutement d'une kinase de la famille de Src, la phosphorylation de CAV-1 (évoquée précédemment) conduisant par l'activation de la voie de signalisation Src/RhoA/myosin à la formation de fibres d'actine de stress (Radel et Rizzo 2005; Schiller et al. 2013). Les intégrines peuvent fonctionner comme des mécanocapteurs primaires et répondre aux forces externes en modifiant leur conformation (Janoštiak et al. 2014). Un flux unidirectionnel, mais pas bidirectionnel, induit un changement de la conformation du domaine extracellulaire de l'intégrine $\beta 1$, puis *via* l'activation de la signalisation calcique permet l'alignement des CE au flux laminaire (Xanthis et al. 2019). Cela suggère donc que les intégrines $\beta 1$ sont directement sensibles aux forces mécaniques.

2.2. Mécanotransducteurs : facteur de transcription mécanosensibles

Le flux sanguin, laminaire ou perturbé, régule la physiopathologie vasculaire à travers la modulation de l'expression de très nombreux facteurs de transcription mécanosensibles (MSTF : mechanosensitive transcription factor) (Niu et al. 2019). Il est pour l'instant difficile de lier une classe de mécanosenseurs à un groupe/type de

facteur de transcription, c'est pourquoi ils sont présentés séparément de la partie mécanosenseurs dans ce manuscrit.

Les **MSTF** sont des protéines spécialisées de liaison à l'ADN qui répondent aux forces biomécaniques et contrôlent le taux de transcription de l'information génétique de l'ADN à l'ARNm. Les MSTF régulent l'expression des gènes en aval en se liant à des séquences spécifiques de l'ADN : les éléments sensibles au stress de cisaillement (SSRE). En tant que régulateurs majeurs de l'expression génique induite par le shear stress dans les CE, les MSTF contrôlent les fonctions endothéliales mais également le développement de l'athérosclérose. Par exemple, facteurs Krüppel-like (KLF) KLF2, KLF4 et NRF2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) sont des MSTF importants qui sont surexprimés à la suite d'un flux laminaire (Boon et Horrevoets 2009; Villarreal et al. 2010) (figure 14). Au contraire, AP-1, NF- κ B, YAP/TAZ/TEAD et HIF-1 α sont inhibés par le flux laminaire (K.-C. Wang et al. 2016; B. Li et al. 2019). Un flux perturbé aurait lui des effets opposés sur la régulation de ces MSTF à savoir une diminution de l'activation de KLF2/4 et une activation d'AP-1, NF- κ B, YAP/TAZ/TEAD et HIF-1 α (figure 14).

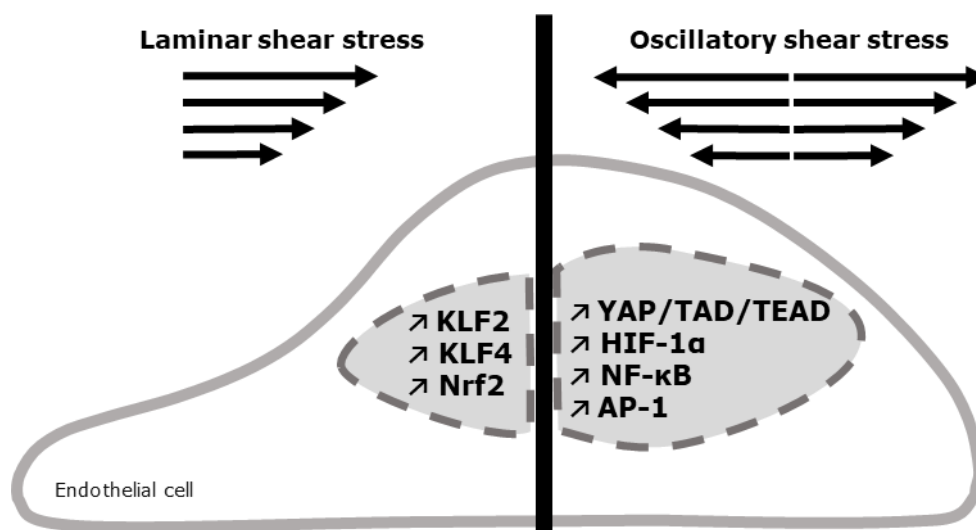


Figure 14 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress laminaire ou oscillatoire sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la mécanotransduction

2.2.1. KLF2 et KLF4

Les facteurs Krüppel-like (KLF) 2 et 4, respectivement KLF2 et KLF4 sont des facteurs moléculaires associés à l'homéostasie vasculaire, qui régulent un grand nombre de gènes anti-inflammatoires, antioxydants, et anti-thrombotiques des CE (Sweet et al. 2018). **KLF2** est activé par le flux laminaire et diminué par le flux perturbé (W. Wu et al. 2011; Fang et Davies 2012). Mécanistiquement, le shear stress laminaire active Piezo1 induisant un influx de Ca^{2+} et par conséquent l'activation de la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline dépendante (CAMKII) (figure 15). CAMKII interagit avec MEKK3 et l'active pour permettre la signalisation MEKK3/MEK5/ERK5 et l'induction de l'expression de KLF2/4 (Zheng et al. 2022) (figure 15). KLF2 augmente l'expression de gènes-cibles *via* les sites de liaison à KLF2 présents sur les promoteurs de ces derniers (Sweet et al. 2018). KLF2 est aussi régulé négativement par de nombreuses protéines ou molécules pro inflammatoires, pro thrombotiques et vasoconstricteurs (Simmons, Kumar, et Jo 2016). KLF2 inhibe l'expression de gènes pro inflammatoires en recrutant le co-activateur transcriptionnel p300 (Sweet et al. 2018). **KLF4** est également induit par un flux laminaire et réprimé lors d'un flux turbulent par la méthylation médiée par une DNA-méthyltransferase sur son

promoteur (Y.-Z. Jiang et al. 2014). KLF4 régule l'expression de gènes régulés également par KLF2 (comme *NOS3* et *VCAM1*) (G. Zhou et al. 2012) mais son rôle est moins bien documenté que pour KLF2.

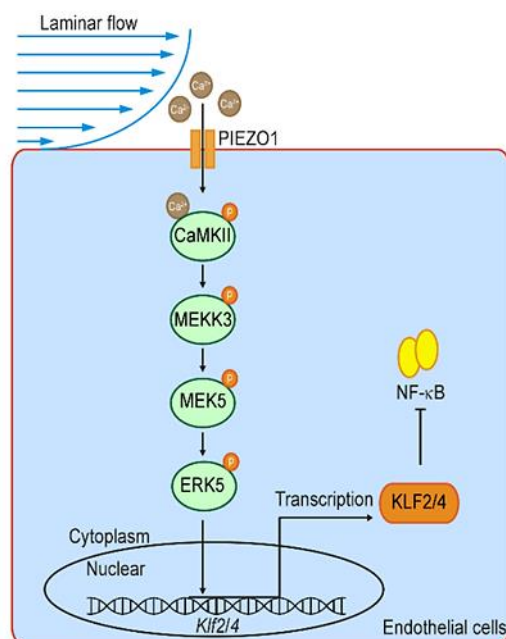


Figure 15 : Représentation schématique de la cascade de signalisation induite par un shear stress laminaire induisant une augmentation de l'expression de KLF2 et KLF4. Figure adaptée de (Q. Zheng et al. 2022).

2.2.2. Nrf2

Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) est un facteur de transcription qui régule l'expression d'un nombre important de gènes responsables de la protection cytosolique lors d'un shear stress laminaire. Nrf2 est régulé positivement par KLF2 (figure 16), et négativement par Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) qui facilite la dégradation de Nrf2 par le protéasome (figure 19). En réponse à un shear stress laminaire, la production de NO et l'activation de KLF2 favorise l'activation de Nrf2 par la dissociation de Keap1 (McSweeney, Warabi, et Siow 2016) (figure 16). Nrf2 activé est transloqué dans le noyau et se fixe sur les éléments de réponse antioxydant (ARE) de ces gènes-cibles impliqués dans la détoxification de phase II (un processus qui conjugue des métabolites à des groupements méthyl ou acétyl ... ou dérivés sucrés, pour favoriser l'élimination des métabolites ou xénobiotiques), l'inflammation, le métabolisme en réponse au stress oxydatif (McSweeney, Warabi, et Siow 2016) (figure 16). Les gènes-cibles de Nrf2 sont bien caractérisés et incluent entre autre l'hème oxygenase-1 (*HO-1*) et la NAD(P)H quinone oxydoréductase 1 (*NQO1*) (Suzuki et al. 2013; Hayes et Dinkova-Kostova 2014). Ces enzymes ont des effets cytoprotecteurs, antioxydants, et détoxifiants. L'activation de Nrf2 en réponse à un flux laminaire est donc nécessaire pour l'adaptation des CE au maintien de l'homéostasie cellulaire redox (Simmons, Kumar, et Jo 2016).

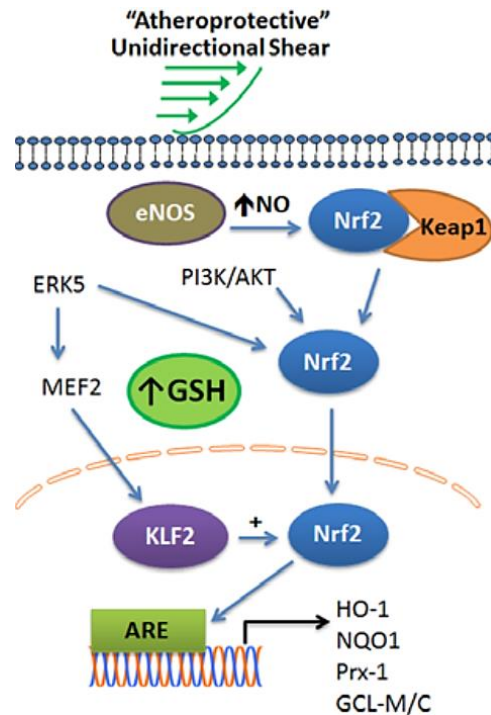


Figure 16 : Représentation schématique de la voie de signalisation de Nrf2 induite par le shear stress
Un shear stress laminaire athéroprotecteur induit l'activation de KLF2 et l'inactivation de Keap1 résultant en l'activation de Nrf2. Nrf2 activé se fixe sur les ARE de ses gènes-cibles, permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire rédox. Figure adaptée de (McSweeney, Warabi, et Siow 2016).

2.2.3. YAP/TAZ/TEAD

YAP/TAZ/TEAD ou Yes-associated protein (YAP)/WW domain-containing transcription regulator 1 (TAZ, WWTR1)/TEA-domain transcription factor (TEAD) régulent de multiples processus cellulaires comme la prolifération, la migration cellulaire et l'inflammation (Panciera et al. 2017). Deux gènes cibles de YAP/TAZ : *CTGF* (facteur de croissance du tissu conjonctif ou *CCN2*) et *Cyr61* (inducteur angiogénique riche en cystéine 61 ou *CCN1*) sont fortement exprimés dans les plaques d'athérosclérose avancées (Schober et al. 2002), indiquant le rôle pro-athérogène potentiel de l'activation de YAP/TAZ. Le shear stress laminaire unilatéral supprime la transactivation de YAP/TAZ/TEAD (L. Wang et al. 2016; K.-C. Wang et al. 2016; S. Xu et al. 2016), en favorisant la phosphorylation de YAP (sérine 127), ce qui réduit la localisation nucléaire de YAP et inhibe l'expression de gènes pro-athérogènes dépendants de YAP (*CTGF* et *Cyr61*) (figure 17) dans des CE humaines cultivées et dans l'endothélium d'aorte de souris. En revanche, un flux perturbé ou un traitement avec la cytokine pro-inflammatoire TNF α , favorise l'activation de YAP en augmentant la phosphorylation de YAP (tyrosine 357) en fonction de l'activité de c-Abl une tyrosine protéine kinase de la famille Src (B. Li et al. 2019) (figure 17), sans affecter la voie de signalisation de NF- κ B (Choi et al. 2018). La voie YAP/TAZ/TEAD activée favorise l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 (figure 17), permettant l'adhésion des monocytes aux CE, et induisant des réponses endothéliales inflammatoires dépendantes de VCAM-1 (Choi et al. 2018).

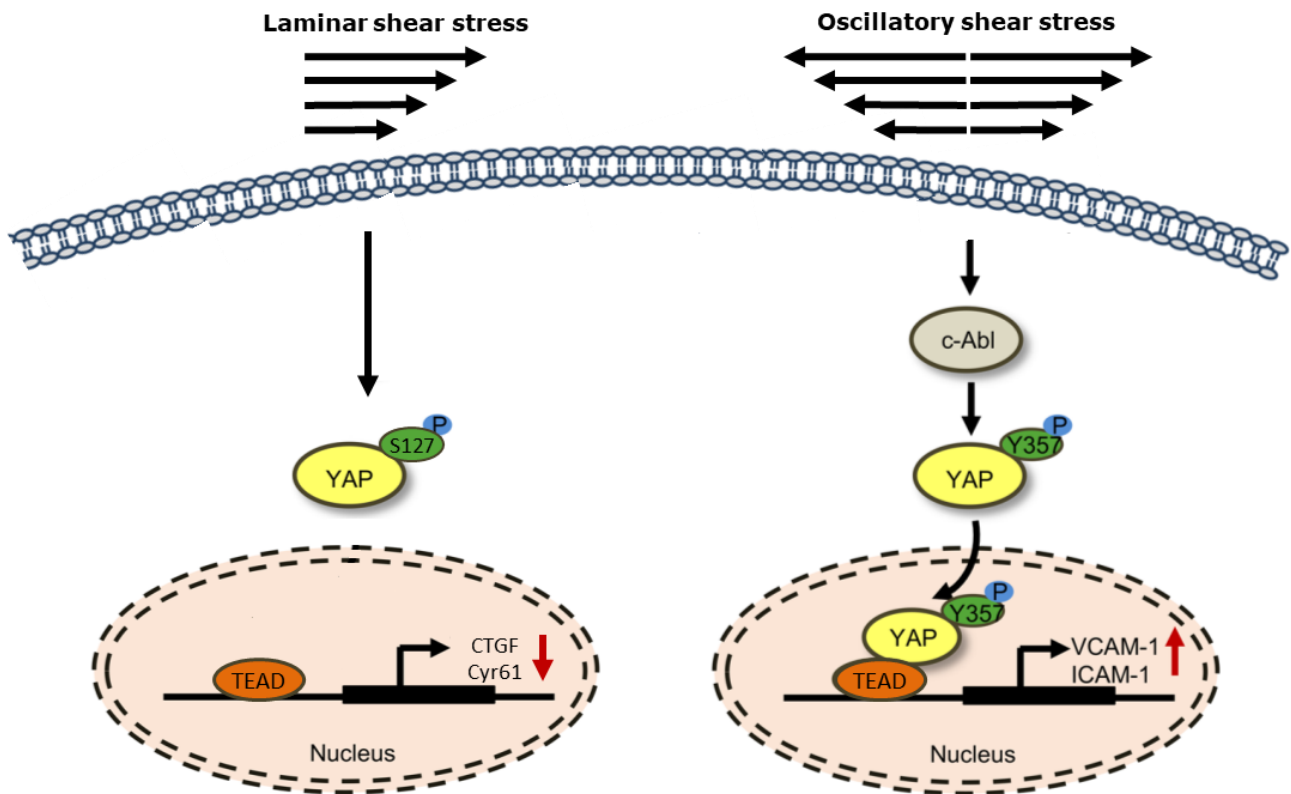


Figure 17 : Représentation schématique de la voie YAP/TAZ/TEAD en réponse à un shear stress laminaire ou oscillatoire

Un shear stress laminaire induit la phosphorylation de YAP sur la serine 127 réduisant la translocation nucléaire de YAP et inhibant l'expression de CTGF et Cyr61. Un shear stress oscillatoire active c-Abl favorisant la phosphorylation de YAP sur la tyrosine 357 permettant la translocation de YAP dans le noyau, sa fixation sur TEAD favorisant l'expression de VCAM-1 et ICAM-1. Figure modifiée de (B. Li et al. 2019).

2.2.4. HIF-1α

Le facteur de transcription **HIF-1α** (Hypoxia-inducible Factor 1α) est stabilisé lors d'une hypoxie et a un rôle prépondérant dans la biologie des tumeurs solides ainsi que dans les processus d'invasion et de métastase.

Dans le contexte de la CE et du flux perturbé, l'activation de la voie de signalisation HIF-1α régule les réponses inflammatoires, la perméabilité vasculaire, le recrutement de leucocytes, l'angiogenèse intra plaque dans les plaques d'athérome de modèles murins et chez l'Homme (X.-L. Chen et al. 2003; Kobayashi et al. 2016). Il a été montré que HIF-1α est activé par un flux perturbé *in vitro* dans des CE issues de veines ombilicales humaines ou d'aortes humaines (dans des conditions normoxiques), et *in vivo* dans les aires aortiques où il y a des courbures et ramifications qui sont propices au dépôt des plaques d'athérome chez la souris et le porc (Feng et al. 2017; D. Wu et al. 2017).

Lors de l'exposition à un flux perturbé, l'expression de HIF-1α est augmentée par un double mécanisme qui implique l'activation transcriptionnelle de NF-κB ainsi que la stabilisation de la protéine HIF-1α par une enzyme de désubiquitination (Cezanne) (Feng et al. 2017) (figure 18). La génération de ROS dépendante de la NADPH oxydase NOX4 est également impliquée dans la stabilisation de HIF-1α induite par le flux perturbé (D. Wu et al. 2017). L'activation de HIF-1α entraîne non seulement l'expression de plusieurs gènes de l'inflammation et de l'adhésion (*MCP-1*, *SELE*, *VCAM-1*), réprime la respiration des mitochondries *via* la diminution de la respiration oxydative mitochondriale due à l'augmentation de l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK1) qui

inhibe la pyruvate déshydrogénase (PDH), et améliore également l'expression de plusieurs enzymes glycolytiques comme l'hexokinase 2 (HK2) ou GLUT1 (ou SLC2A1 pour solute carrier family 2) (Feng et al. 2017; D. Wu et al. 2017) (figure 18). La glycolyse dépendante de HIF-1 α favorise la prolifération et l'inflammation des CE (Feng et al. 2017), mécanismes suggérant que HIF-1 α a un rôle dans la régulation de l'angiogenèse intra plaque dans les lésions avancées comme il a déjà été démontré dans le cancer. Ainsi, HIF-1 α est essentiel à la fois dans les premiers stades de l'athérosclérose, pour initier la formation de lésions en favorisant la signalisation inflammatoire dans les régions artérielles exposées à des contraintes de cisaillement faibles ou perturbées, mais aussi dans les stades avancés de l'athérosclérose, en régulant les processus-clés de l'angiogenèse (X. Li, Weintraub, et Fulton 2017).

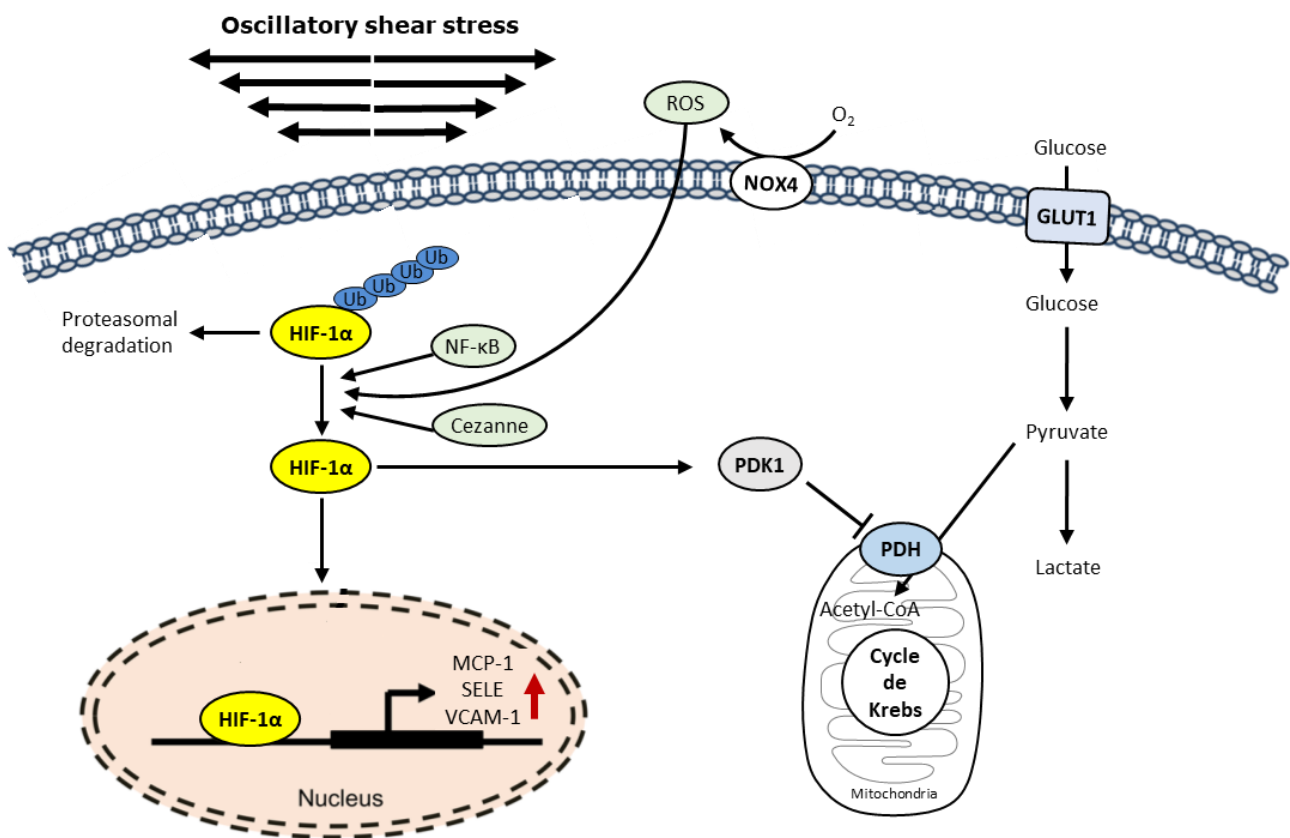


Figure 18 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress oscillatoire sur la voie de HIF-1 α . Lors d'un shear stress oscillatoire, l'expression protéique de HIF-1 α est augmentée par NF- κ B et les ROS, et stabilisée par Cezanne. HIF-1 α induit l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse tels que GLUT1 et PDK1 et favorisant la prolifération et l'inflammation des CE comme MCP-1, SELE (E-sélectine) et VCAM-1.

2.2.5. NF- κ B et AP-1

NF- κ B et AP-1 (activating protein 1), sont des facteurs de transcription, activés par le TNF α , qui favorisent l'expression de nombreux gènes de l'inflammation et de l'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, et SELE) dans les CE (Natarajan et al. 2001; Partridge et al. 2007) (figure 19).

L'activité de **NF- κ B** est hautement contrôlée par sa phosphorylation et sa localisation subcellulaire. Dans des cellules non-stimulées, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par des molécules de liaison inhibitrices I κ B. Un signal pro-inflammatoire conduit à la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation de I κ B, entraînant la libération de NF- κ B et sa translocation dans le noyau (figure 19). Il a été montré de manière intéressante qu'un

flux laminaire protège les CE en altérant la fonction de NF- κ B c'est-à-dire en inhibant sa capacité d'induction de molécules pro-inflammatoires et en améliorant simultanément l'induction de transcrits cytoprotecteurs dépendants de NF- κ B (Bcl-2, GADD45 β , MnSOD) (Partridge et al. 2007). Un flux oscillatoire augmente la production de ROS activant de la voie des MAP (mitogen-activated protein) kinases (MAPK) et résultant en l'activation de NF- κ B (McSweeney, Warabi, et Siow 2016) (figure 19).

L'exposition de CE à des peptides pro-inflammatoires comme le TNF α induit l'activation de la voie des MAP kinases (MEKK1, MKK4 et MKK7, JNK) qui active c-Jun, un composant de **AP-1** (Natarajan et al. 2001) (figure 19). En effet, AP-1 est un hétérodimère composé de c-Fos, c-Jun, et des membres de la famille des ATF (activating transcription factor). Il a été montré que le NO inhibe l'activation de la kinase c-Jun responsable de l'activation de AP-1 (Natarajan et al. 2001).

NF- κ B et AP-1 sont également tous les deux activés par un flux prolongé de faible intensité (2 dynes/cm²) ou perturbé dans les CE en culture et dans l'endothélium dans les aires de flux perturbé dans l'aorte de souris (Mohan, Mohan, et Sprague 1997; Hajra et al. 2000). Ainsi, NF- κ B et AP-1 sont des MSTF sensibles au shear stress et représentent des médiateurs importants de l'inflammation de l'endothélium (Noguchi et Jo 2011).

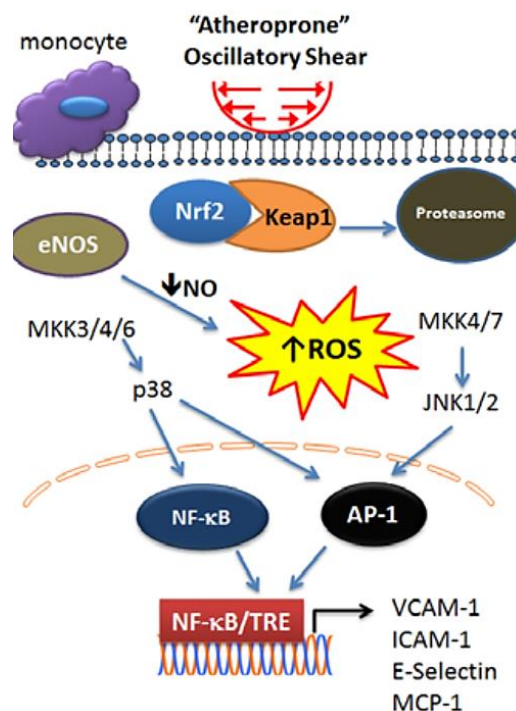


Figure 19 : Représentation schématique de la voie de signalisation de NF- κ B et AP-1 induite par le shear stress. Un shear stress oscillatoire athéropromoteur induit la dégradation de Nrf2 associé à Keap1 par le protéasome. L'augmentation de la production de ROS induite par le shear stress oscillatoire active la voie des MAPK et favorise la translocation de NF- κ B et AP-1 dans le noyau, résultant en l'expression de gènes pro inflammatoires et l'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines, permettant l'adhésion des monocytes. Figure adaptée de (McSweeney, Warabi, et Siow 2016).

2.3. Voies de signalisation

Une fois les contraintes de cisaillement perçues à la surface cellulaire par une variété de mécanosenseurs (Chatzizisis et al. 2007) (cf 2.1. Mécanosenseurs vasculaires), la stimulation mécanique va résulter en l'activation de divers facteurs de transcription MSTF (cf 2.2. Mécanotransducteurs : facteur de transcription mécanosensibles) et cascades de voies de signalisation intracellulaires qui sont très nombreuses et détaillées dans le paragraphe

ci-dessous. Tout comme pour les MSTF, il est difficile de lier une voie de signalisation avec un type de mécanosenseur, c'est pourquoi ces voies sont présentées séparément de la partie mécanosenseurs et MSTF dans ce manuscrit.

2.3.1. PI3K/AKT

La signalisation médiée par **PI3K/AKT** est l'une des premières voies de signalisation activées par les forces de cisaillement. L'activation de la voie PI3K/AKT peut s'effectuer, en réponse à des forces de cisaillement, *via* l'activation des récepteurs à la surface cellulaire tel que VEGFR2 (Z.-G. Jin et al. 2003) et PECAM-1 (Osawa et al. 2002) ainsi que la présence de la VE-Cadhérine (Shay-Salit et al. 2002) qui composent le mécanosome jonctionnel (cf 2.1.3. Mécanosenseurs du pôle jonctionnel). L'activation de la voie PI3K/AKT peut également se faire *via* l'activation de protéines adaptatrices liées au récepteur comme Shc (K. D. Chen et al. 1999) ou les kinases Src (Tzima et al. 2005). L'activation de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) permet la transformation des PIP2 en PIP3 (phosphatidylinositol-3-phosphate) et induit la phosphorylation de AKT (tyrosine 308) (Morello, Perino, et Hirsch 2009). L'activation de AKT engendre la phosphorylation de la eNOS (serine 1177) entraînant l'activation de la eNOS ainsi que la production de NO (Dimmeler et al. 1998; Dimmeler, Fleming, et al. 1999) (figure 20). Cette voie de signalisation conduit à un phénotype anti-athéropone et protecteur de la cytotoxicité et de l'apoptose dans les CE (Dimmeler et Zeiher 1999). D'une manière intéressante, il semblerait que la voie AKT soit également activée lors de faibles contraintes de cisaillement *via* la kinase IKKε, ce qui augmente la phosphorylation de IRF3 (interferon regulatory factor) et induit sa translocation dans le noyau, puis sa liaison sur le promoteur de ICAM-1 (L. Zhu et al. 2021) (figure 20). Ainsi la voie AKT serait capable d'induire des réponses soit anti-, soit pro- athérogène en fonction de l'intensité des forces de cisaillement.

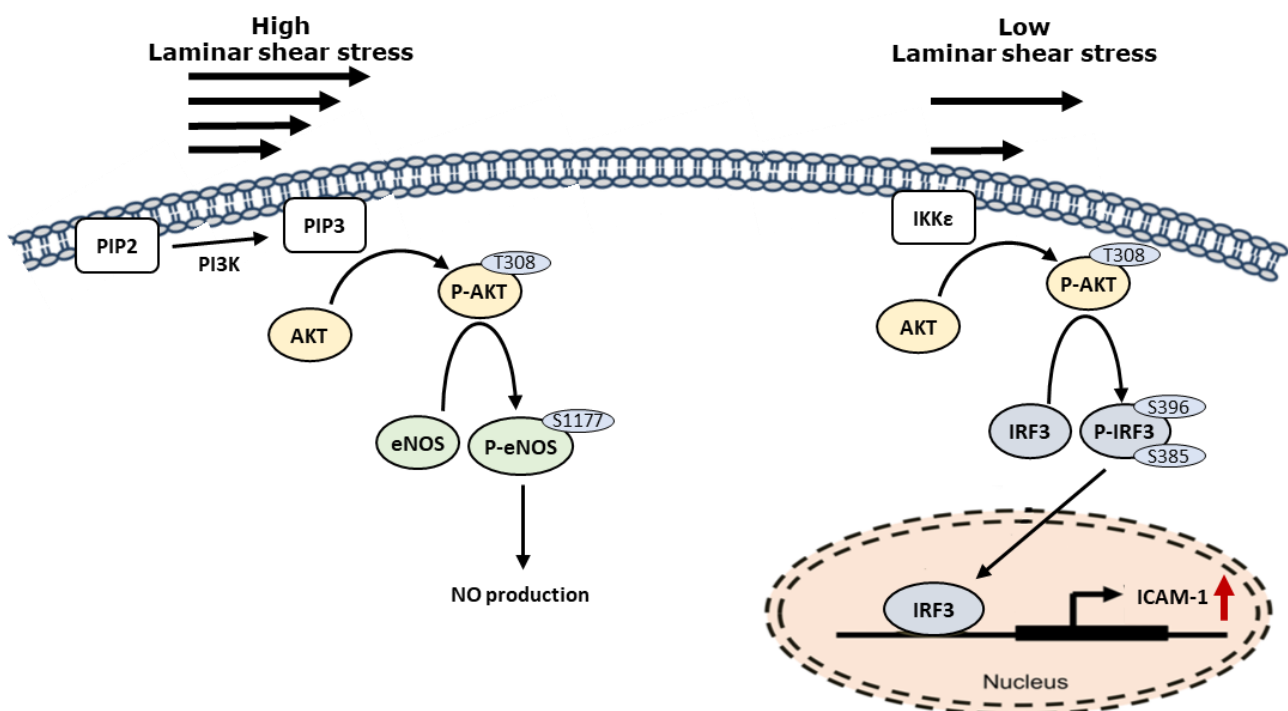


Figure 20 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress laminaire sur la voie PI3K/AKT
Un shear stress laminaire conduit à un phénotype athéroprotecteur en activant la production de NO *via* la voie PI3K/AKT, tandis qu'un shear stress laminaire de faible intensité engendre l'activation de IRF3 *via* la phosphorylation d'AKT aboutissant à un phénotype athéropone.

2.3.2. MAP Kinases

De nombreuses voies convergent vers des voies de signalisation communes, telles que la voie des **MAPK** (mitogen-activated protein kinases) qui régule la prolifération, la différenciation, la mitose, la survie cellulaire, l'apoptose et l'expression génique entre autres (Pearson et al. 2001). La voie des MAPK peut être activée par différents mécanosenseurs ou transducteurs comme les intégrines (*via* les FAK) (Zebda, Dubrovskiy, et Birukov 2012), la PKC ϵ (Traub et al. 1997), la NADPH oxydase (*via* les ROS (Hwang et al. 2003)), ou PECAM-1 (*via* la voie PI3K/AKT). Les MAPK sont phosphorylées par une cascade de kinases dépendantes de l'activation de la voie de Ras-Raf-MEK. Parmi les MAPK, 3 groupes sont distingués : ERK1/2/5 (extracellular signal regulated kinases), JNK1/2/3 (c-jun N-terminal kinases) et p38 kinases $\alpha/\beta/\delta/\gamma$. Les contraintes de cisaillement activent ERK1/2, puis plus tardivement JNK. Les protéines G participent à l'activation des MAPK, la protéine G β/γ activant JNK tandis que la protéine G α_{12} active ERK1/2. Le shear stress induit également l'activation de p38 de manière dépendante de la VE-Cadhérine (Shay-Salit et al. 2002).

Les MAPK sont aussi capables d'activer des facteurs de transcription comme c-myc, AP-1 ou NF- κ B (Traub et al. 1997). ERK5, membre de la famille des MAPK, a un rôle dans le développement et l'intégrité cardiovasculaire. ERK5 peut activer des facteurs de transcription comme les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) ayant des propriétés anti-inflammatoires (Le et al. 2017).

2.3.3. Protéines kinases

Les protéines kinases C (PKC) forment une famille de 15 isoformes chez l'Homme, divisés en 3 sous-familles selon leur second messager. Les PKC « conventionnels » contiennent les isoformes α , β_1 , β_{II} , et γ , et requièrent une augmentation de la concentration en DAG, en Ca $^{2+}$ et en phospholipides pour être activés. Les PKC « nouveaux » sont les isoformes δ , ϵ , η , et θ et nécessitent une augmentation de la concentration en DAG mais pas de Ca $^{2+}$ pour s'activer. Les isoformes PKC « atypiques » regroupent les isoformes ζ et ι , et n'ont pas besoin de Ca $^{2+}$ ni de DAG pour leur activation. PKC β est activé par les forces de cisaillement dans les régions corticales principalement (Y. L. Hu et Chien 1997). Les forces de cisaillement activent PKC ϵ qui induit l'activation de ERK1/2 et participe à l'induction de l'expression de MCP-1 (Traub et al. 1997; Ni et al. 2003) (cf paragraphe 2.3.2. MAP Kinases). En réponse au shear stress, la protéine kinase B (PKB aussi connue sous le nom « AKT ») induit la phosphorylation de la NOS engendrant la production de NO, nécessaire à l'activation de la voie Ras-JNK (Go 2001). Lors d'un shear stress physiologique, la protéine kinase A (PKA) phosphoryle l'intégrine α_4 (serine 988) permettant l'activation de Rac1, et nécessaire au réarrangement du cytosquelette et à l'alignement des CE (Goldfinger et al. 2008).

2.3.4. Protéines Rho

Le flux module l'activité de petites protéines Rho à activité GTPase (**Rho GTPases**) : Rho, Rac1, et Cdc42, qui font partie de la famille des protéines Ras (Tzima 2006). En réponse au shear stress, la protéine Rho régulant la formation de fibres de stress et des adhésions focales participent à l'alignement des cellules dans le sens du flux ; les protéines Rac1 nécessaires à la régulation de la polymérisation de l'actine induisent la formation de lamellipodes dans la direction du flux ; et les protéines Cdc42 impliquées dans la formation de filopodes permettent de polariser les cellules dans la direction du flux (Tzima 2006). La polarité des cellules est régulée par

de nombreuses protéines du cytosquelette péri-nucléaires (microtubules, actine, réarrangement du centrosome) activées par les contraintes de cisaillement qui permettent une localisation du centre des microtubules en amont du noyau (J. T. Morgan et al. 2011) (cf paragraphe 2.4.1 Polarité). Les Rho GTPases conduisent également à l'activation de JNK et de facteurs de transcription mécanosensibles comme NF- κ B et c-fos.

2.3.5. Protéines d'adhésion focale : FAK

Les adhésions focales, complexes multiprotéiques faisant le lien entre les intégrines et la MEC sont constituées d'une variété de protéines kinases telles que la FA kinase (**FAK**) (focal adhesion kinase), la kinase contenant le domaine d'homologie Src 2 (Shc), la tyrosine protéine kinase Crk, la paxilline, le substrat associé à Crk (p130CAS), qui médient la transduction du signal des intégrines aux messagers intracellulaires (Shyy et Chien 2002) (figure 21). Par exemple, les contraintes de cisaillement activent la protéine kinase FAK *via* sa phosphorylation par les intégrines (Shyy et Chien 2002) (figure 21). L'association de FAK avec Src et PI3K phosphoryle FAK, permettant le recrutement et l'activation de la voie Ras-Raf-MEK et des MAPKs (Zebda, Dubrovskiy, et Birukov 2012) (figure 21).

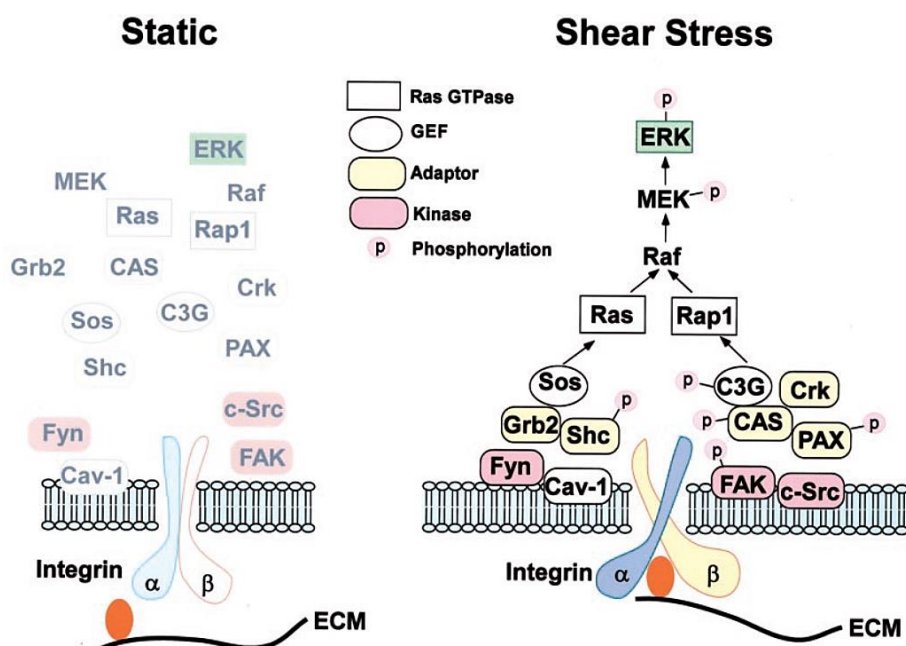


Figure 21 : Représentation schématique de la mécanotransduction médiée par les FAK

Dans la condition statique, les intégrines sont en conformation inactive et ne transmettent pas de signal en intracellulaire. Un shear stress active les intégrines qui, par un changement de conformation, augmentent leur affinité et leur interaction avec les protéines (orange) de la MEC. Le signal est transmis *via* l'activation des voies FAK/Src et Fyn/Cav-1 qui induisent une cascade de phosphorylation en amont convergeant vers l'activation de la voie Ras-Raf-MEK-ERK dans les CE.

2.3.6. NO

Les forces de cisaillement médiée par le flux sanguin favorisent l'activation des mécanosenseurs à la surface des CE, entraînant la production de la PGI₂ et du **NO**, qui régulent le tonus vasculaire. Dans les CE, le NO est produit principalement par l'enzyme eNOS à partir de L-arginine, mais il peut aussi être libéré de manière non-enzymatique à partir du nitrate transformé par la cytochrome-P450 réductase, ou des S-nitrosothiols (Yingzi Zhao, Vanhoutte, et Leung 2015). La eNOS est exprimée constitutivement dans les CE, et son activité est régulée

par le Ca^{2+} intracellulaire, l'interaction Ca^{2+} -calmoduline (Busse et Mülsch 1990), le pH intracellulaire et ses sites de phosphorylation (Ayajiki et al. 1996; García-Cardena et al. 1996; Yingzi Zhao, Vanhoutte, et Leung 2015).

Le shear stress laminaire régule à la hausse la transcription de la eNOS par l'interaction de KLF2 avec le co-activateur transcriptionnel p300, qui empêche la liaison de p300 avec NF- κ B, bloquant ainsi l'activation du promoteur de VCAM-1 et favorisant la liaison de KLF2 au promoteur de la eNOS (SenBanerjee et al. 2004, 2) et la transcription de la eNOS (Michael E. Davis et al. 2004; Yingzi Zhao, Vanhoutte, et Leung 2015).

La eNOS est activée par le shear stress *via* différentes voies de signalisation. Le shear stress induit l'augmentation de l'expression transcriptionnelle de eNOS de manière rapide et transitoire *via* la voie Src-Ras-Raf-MEK-ERK, et une prolongation de la stabilité de l'expression transcriptionnelle de eNOS *via* Src (M. E. Davis et al. 2001). Au niveau des cavéoles, la eNOS phosphorylée sur la thréonine 495, interagit avec CAV-1 *via* le domaine réductase rendant la eNOS inactive (García-Cardena et al. 1996) (figure 22). Le shear stress favorise la dissociation de la eNOS des cavéoles et son interaction avec le complexe Ca^{2+} /calmoduline et HSP90 (García-Cardena et al. 1998). Le shear stress, *via* l'activation dépendante de PKA, AKT, c-Src, et de Ras-Raf-MEK-ERK, favorise la phosphorylation d'eNOS au niveau de la serine 1177 et de la serine 633, induisant la production de NO (Dimmeler, Fleming, et al. 1999; M. E. Davis et al. 2001; Boo et al. 2002; Boo et Jo 2003; Mount, Kemp, et Power 2007; Yingzi Zhao, Vanhoutte, et Leung 2015; M. J. Davis et al. 2023) (figure 22).

Le NO endothélial diffuse dans les CMLV pour induire la vasodilatation par le remodelage du complexe actine-myosine, *via* un mécanisme dépendant du cGMP et du Ca^{2+} (Yingzi Zhao, Vanhoutte, et Leung 2015) (cf paragraphe 1.3.4 a) Voie du NO).

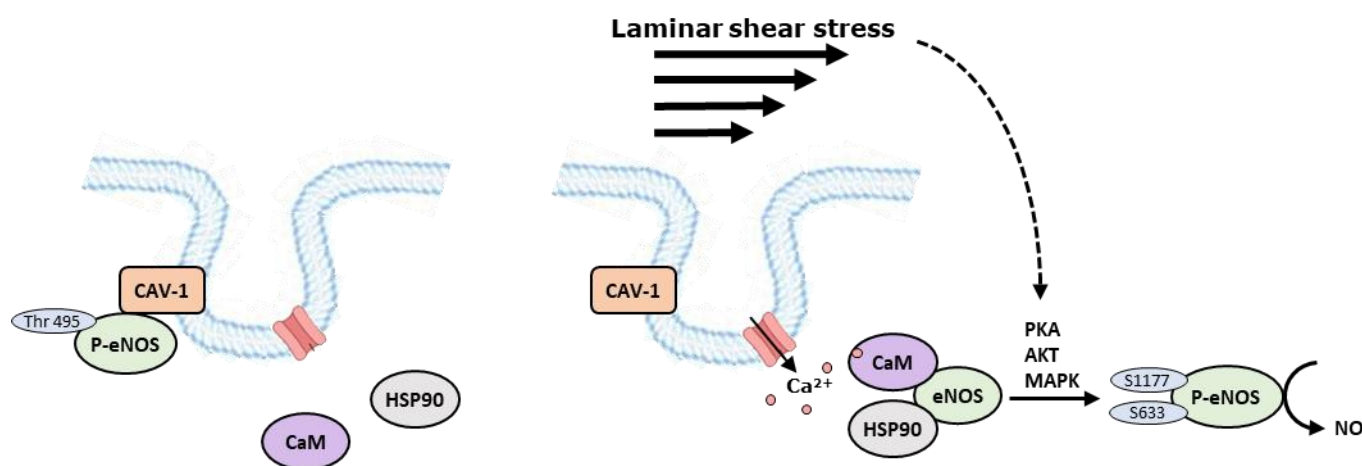


Figure 22 : Représentation schématique de la production de NO médiée par le shear stress

En condition statique, la eNOS est phosphorylée sur la thréonine 495 et interagit avec la CAV-1. Un shear stress active la eNOS *via* sa perte d'interaction avec la CAV-1, son interaction avec le complexe Ca^{2+} /calmoduline et HSP90, sa phosphorylation sur les serines 1177 et 633 par les voies PKA, AKT, MAPK.

2.4. Effets du shear stress sur les fonctions cellulaires endothéliales

En réponse aux contraintes de cisaillement, les CE vont produire des facteurs vasorelaxants en particulier le NO *via* l'activation de mécanosenseurs, facteurs de transcription et voies de signalisation vus ci-dessus. Le shear stress permet également de réguler/moduler différentes fonctions cellulaires endothéliales telles que la polarité, l'alignement, l'apoptose, la prolifération, la migration, la perméabilité, et l'autophagie.

2.4.1. Polarité

La **polarité** cellulaire fait référence à la distribution inégale (asymétrique) de certains composants cytoplasmiques dans une cellule avec un ordre spatial. En réponse à des contraintes de cisaillement hémodynamiques physiologiques, les CE présentent des adaptations morphologiques et une polarité planaire dans la direction du flux, pour réduire la résistance au flux, permettant le maintien des fonctions physiologiques et biochimiques (Wang et al. 2022). Ainsi, la morphologie des CE apparaît comme le reflet des conditions locales de flux. Plusieurs voies de signalisation et organites interviennent dans la régulation de la polarité des CE lors d'un shear stress. Le **noyau** interagit avec le cytosquelette *via* des complexes, permettant la transmission directe des forces mécaniques exercées sur la surface cellulaire. Dans les cellules polarisées le noyau est situé à l'arrière de la cellule, créant un axe pointe/centrosome/noyau dans le sens du flux (figure 23). Bien que le noyau soit un organite grand et rigide, les forces mécaniques extracellulaires influencent la rigidité et la taille du noyau, influençant l'organisation de la chromatine et le cytosquelette. Les composants du **cytosquelette** sont impliqués dans les étapes d'induction de maintien de la polarité cellulaire. La génération de la polarité est contrôlée par des microtubules (tubuline) servant de structures de guidage cytoplasmique uniformément alignées et polarisées pour le transport vectoriel et sélectif des vésicules dérivées du Golgi vers la surface cellulaire. La polymérisation de la G-actine en F-actine contribue au maintien de la forme et de la polarité des cellules. La bande d'actine périphérique marquée dans les CE cultivées en condition statique se remodèle pour former des filaments d'actine orientés parallèlement à la direction du flux et des fibres de stress d'actine qui traversent la cellule d'un côté à l'autre sous le noyau (figure 23). Les microtubules, nécessaires à l'allongement des cellules, semblent être principalement localisées en amont du noyau, et fortement orientées dans la direction du flux, tout comme le réarrangement du centrosome (ou MTOC pour Microtubule Organizing Center) (Coan et al. 1993) mais certaines études rapportent que le MTOC est localisé en aval du noyau après 24 heures de shear stress (Tzima et al. 2003; Dragt et al. 2012). Cette contradiction semble varier en fonction du type et de l'amplitude des contraintes de cisaillement appliquées sur les CE. L'**appareil de Golgi** est un élément clé de la CE dans la polarité cellulaire puisqu'il est l'organisateur du transport membranaire. Les cils primaires, étant structurés par le réseau de microtubules, sont impliqués dans l'établissement de l'asymétrie et de la réponse pour la coordination de l'orientation cellulaire. La redistribution du complexe conjonctif intracellulaire favorise le remodelage de l'actine et du cytosquelette des microtubules, entraînant une polarisation morphologique cellulaire (figure 23).

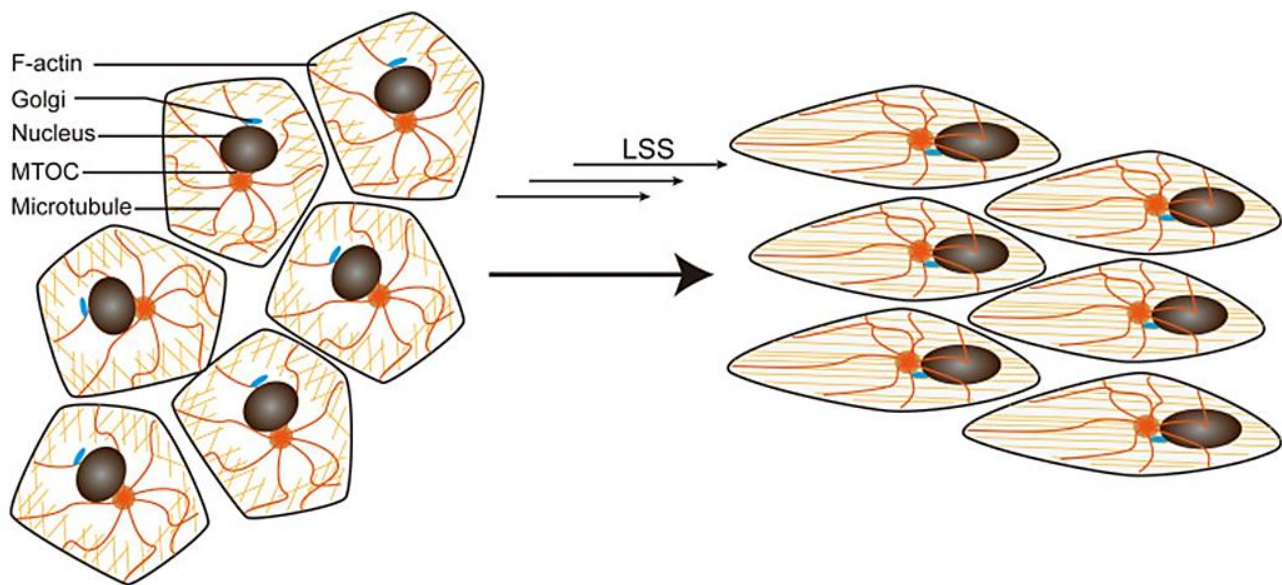


Figure 23 : Représentation schématique de la distribution des organites pendant un flux laminaire. Sous un shear stress laminaire (LSS), les organites cellulaires s'organisent différemment et modifient leur forme, localisation et mouvement. Figure adaptée de (Wang et al. 2022).

Parmi les voies de signalisation impliquées dans la polarité cellulaire des CE lors d'un shear stress Piezo1, activé par le shear stress, induit un influx calcique facilitant la réorganisation des adhésions focales et l'alignement des CE. Les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 influencent la polarité en régulant des changements de forme cellulaire par des effets sur la dynamique du cytosquelette et l'activité de facteurs de transcription (Wang et al. 2022).

2.4.2. Alignement

Les forces de cisaillement ont un impact sur la **morphologie** des CE. Les cellules sont polygonales, en forme de « pavé » et orientées de manière aléatoire dans les zones à faibles contraintes de cisaillement (4 dynes/cm²), mais elles sont allongées et alignées dans la direction du flux dans les régions à fortes contraintes de cisaillement (12 dynes/cm²) (Russo et al. 2020) (figure 3A). Cette réorganisation spatiale du cytosquelette est un élément majeur dans la réponse des CE aux forces de cisaillement puisqu'il est en lien avec l'état physiologique de la CE. Un flux laminaire physiologique entraîne un alignement de la CE dans le sens du flux. Dans cette situation, les CE sont dans un état de quiescence cellulaire et elles contribuent physiologiquement à la vasodilatation du vaisseau en produisant du NO. Ce shear stress et cet alignement protège également activement de l'athérosclérose en raison de l'induction de gènes anti-inflammatoires, antioxydants et antithrombotiques. Au contraire, un flux perturbé turbulent oscillatoire est associé à un phénotype endothélial dit en pavé et favorise un état cellulaire instable avec une dysfonction des CE, induisant un environnement inflammatoire propice au développement des plaques d'athérome.

L'**alignement** des cellules se déroule en 3 phases distinctes (Galbraith, Skalak, et Chien 1998). Dans la première phase (3 premières heures), les CE s'allongent et ont plus de fibres de stress et de microfilaments, et des jonctions intercellulaires plus épaisses. Dans la deuxième phase (de 3 à 6 heures), les cellules sont mobiles grâce à leur réseau important de microtubules et elles ont un noyau situé dans la région en amont de la cellule. La troisième phase (après 12 heures d'exposition) se caractérise par l'épaississement et l'alignement des fibres de stress et la restauration des jonctions intercellulaires et des microfilaments, amenant à des cellules allongées et orientées

dans la direction du flux. Les CE répondent initialement au stress de cisaillement en améliorant leurs attaches au substrat et aux cellules voisines.

Les mécanismes impliqués dans la modification morphologique des CE en réponse au shear stress dépendent du Ca^{2+} intracellulaire, de l'actine, des microtubules, de JNK2, des intégrines $\alpha 4$ et de la PKA, ainsi que de RhoA, et Rac1, et de canaux ioniques comme Piezo1 ; et sont indépendants de la PKC, ou de la PI3K (Malek et Izumo 1996; S. Li et al. 1999; Wojciak-Stothard et Ridley 2003; Goldfinger et al. 2008; Hahn et al. 2011; Ranade et al. 2014).

2.4.3. Apoptose

L'**apoptose** ou la mort cellulaire programmée est un mécanisme essentiel pour maintenir l'homéostasie des cellules. L'activation de la famille de protéases des **caspases** représente la dernière voie commune de transduction du signal d'apoptose. La progression de l'apoptose dans les CE est associée au désassemblage des complexes d'AF et au réassemblage de l'actine sous la forme d'un cercle à la périphérie et la formation de bourgeonnement membranaire (Wu et al. 2007). L'exposition des CE à un flux turbulent augmente l'apoptose (Freyberg et al. 2001), tandis qu'un flux laminaire réduit le taux de cellules apoptotiques et prévient l'apoptose induite par le TNF α , les ROS ou les LDL oxydés (Hermann, Zeiher, et Dimmeler 1997; Dimmeler et al. 1997; Dimmeler, Hermann, et al. 1999). Cet effet anti-apoptotique du shear stress est corrélé avec la synthèse de NO endothélial et les capacités antioxydantes des CE. La formation de NO médiée par les contraintes de cisaillement interfère avec la transduction du signal de mort cellulaire *via* l'expression de protéines inhibitrices de l'apoptose (**IAP**-1 et -2) et l'inhibition de la caspase-3 (X. Jin et al. 2002), et contribue à l'intégrité des CE en inhibant l'apoptose.

2.4.4. Prolifération

Les contraintes de cisaillement inhibent la **prolifération** des CE qui rentrent dans un état de quiescence. Cette réduction de la prolifération apparaît dépendante de l'amplitude des forces de cisaillement, plus les contraintes sont fortes et moins les cellules prolifèrent (Levesque, Nerem, et Sprague 1990). Cet événement se produit *via* la forte activation de P53 (gène suppresseur de tumeur), induisant une surexpression des protéines d'arrêt de croissance du cycle cellulaire (GADD45 et de P21 : régulateur du cycle cellulaire agissant comme un inhibiteur de cdk), ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de Rb (protéine du rétinoblastome) (Lin et al. 2000) (figure 24). L'inhibition résultante de la kinase dépendante de la cycline (cdk) et l'hypophosphorylation de Rb conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire endothélial (figure 24).

Les CE exposées à de fortes contraintes de cisaillement ont donc un phénotype quiescent qui dépend également de l'activation de KLF2, qui en réprimant l'activité promotrice de PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2.6-biphosphatase-3) réduit la glycolyse et le métabolisme de respiration mitochondrial, induisant un phénotype quiescent des CE (Dekker et al. 2006; Doddaballapur et al. 2015).

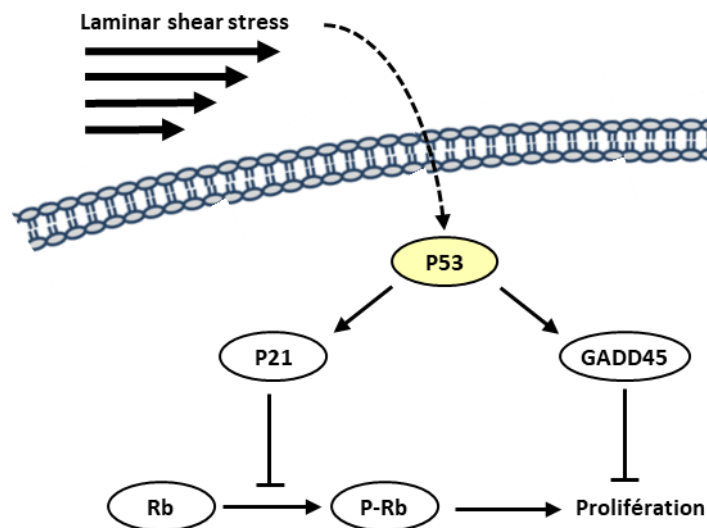


Figure 24 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress laminaire sur la prolifération des CE. Un shear stress laminaire active P53 favorisant l'expression de P21 et GADD45, protéines d'arrêt du cycle cellulaire et inhibitrices de la prolifération. Les CE rentrent donc dans un état de quiescence.

2.4.5. Migration

La **migration** est un processus important pour l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants) et la ré-endothélialisation après une lésion dans l'endothélium vasculaire. L'effet des forces de cisaillement sur la migration des CE est moins décrit dans la littérature, notamment car les études de migration s'effectuent sur des cellules en condition statique. Les forces de cisaillement améliorent la vitesse de migration des CE en modulant la force biophysique des tractions à travers la voie biochimique de Rho-p160ROCK (Shiu et al. 2004). Dans une étude de blessure de l'endothélium *in vitro*, il a été montré que de fortes contraintes de cisaillement laminaire améliorent la migration des CE par la signalisation médiée par les intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ et les récepteurs de la fibronectine, qui servent de mécanotransducteurs dans les CE (via la phosphorylation de FAK et ERK1/2). Une étude de 2020 (Russo et al. 2020) a démontré que les CE exposées à un shear stress laminaire physiologique de 12 dynes/cm² présentaient une adhésion cellulaire plus élevée que celles exposées à un shear stress pathologique de 4 dynes/cm² (par un test d'adhésion à la fibronectine avec un marquage au Crystal violet). Par conséquent, les CE exposées à un shear stress laminaire de faible intensité, correspondant à un flux pathologique, ont une capacité plus forte à migrer que les CE exposées à un flux physiologique (Russo et al. 2020), suggérant que l'intensité des forces de cisaillement impacte la vitesse de migration des CE.

2.4.6. Perméabilité

La **perméabilité** vasculaire est la capacité d'un vaisseau sanguin à laisser passer des molécules ou cellules (leucocytes par exemple) à travers la paroi du vaisseau. Afin d'assurer leur fonction de barrière entre le sang et les CMLV, et l'intégrité vasculaire, il est crucial que les CE régulent leur perméabilité par la stabilité des jonctions cellule-cellule notamment via la phosphorylation de la **VE-Cadhérine** sur les résidus tyrosine ou sérine (Dejana et al. 2009). Le shear stress module la phosphorylation de la VE-Cadhérine de manière flux-dépendante. Un shear stress de faible intensité ou perturbé augmente la phosphorylation de la VE-Cadhérine (Tyr658/685) résultant en l'internalisation de la VE-Cadhérine et par conséquent une augmentation de la perméabilité (Wessel et al. 2014) (figure 25). De plus, la présence de leucocytes sur le site d'inflammation induit la déphosphorylation de la tyrosine 731 de la VE-Cadhérine, entraînant l'endocytose de la VE-Cadhérine, et une augmentation de la perméabilité (Wessel et al. 2014) (figure 25). De ce fait, dans les zones de fortes contraintes de cisaillement laminaire, les

cellules sont moins perméables aux macromolécules que dans les régions où le flux est perturbé où les CE sont décrites comme hautement perméables aux lipoprotéines de faible densité (LDL) (Stemerman et al. 1986). En effet, de faibles contraintes de cisaillement favorisent la perméabilité endothéliale et l'infiltration des LDL (Chatzizisis et al. 2007).

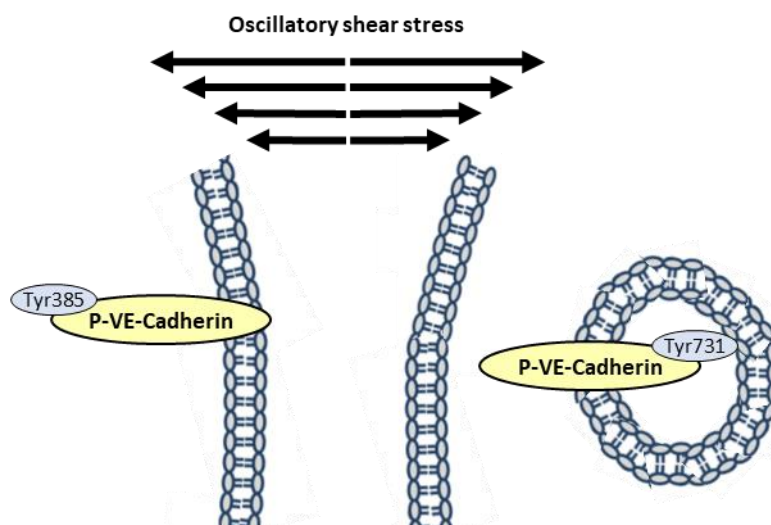


Figure 25 : Représentation schématique de l'effet d'un shear stress perturbé sur la perméabilité des CE. Lors d'un shear stress de faible intensité ou perturbé, la VE-cadherine, protéine de jonction des CE, est internalisée (phosphorylation de la tyrosine 385) ou endocytée (phosphorylation de la tyrosine 731), augmentant la perméabilité des CE.

La perméabilité des CE semble également être corrélée avec leur capacité à proliférer puisque les zones de perméabilité sont associées aux zones de mitose (Chien 2003) et au renouvellement des cellules (Jo et al. 1991). De plus, la perméabilité semble être liée aux processus d'alignement des cellules au flux puisqu'une augmentation de la perméabilité a été observée dans les cellules exposées à un flux dans les premières heures, alors qu'une fois que les cellules sont alignées dans la direction du flux la perméabilité diminue. Cet effet « temps-dépendant » est dépendant des voies de signalisation du NO et de l'AMPc (Chang et al. 2000) et de l'activation de la voie PI3K-NO-GMPc (Warboys et al. 2010).

2.4.7. Autophagie endothéliale

L'autophagie désigne les processus de dégradation et de recyclage utilisés par la cellule pour éliminer ses propres constituants endommagés ou inutiles par la voie lysosomale. Ce mécanisme joue un rôle important dans les cellules vasculaires afin de préserver leur phénotype et assurer leur fonction, et permet ainsi de garantir l'homéostasie cellulaire. L'autophagie génère des métabolites qui représentent à la fois une source d'énergie pour la cellule et une source de matériel pour la synthèse de nouvelles macromolécules (Boya, Reggiori, et Codogno 2013). Il existe 3 types d'autophagie.

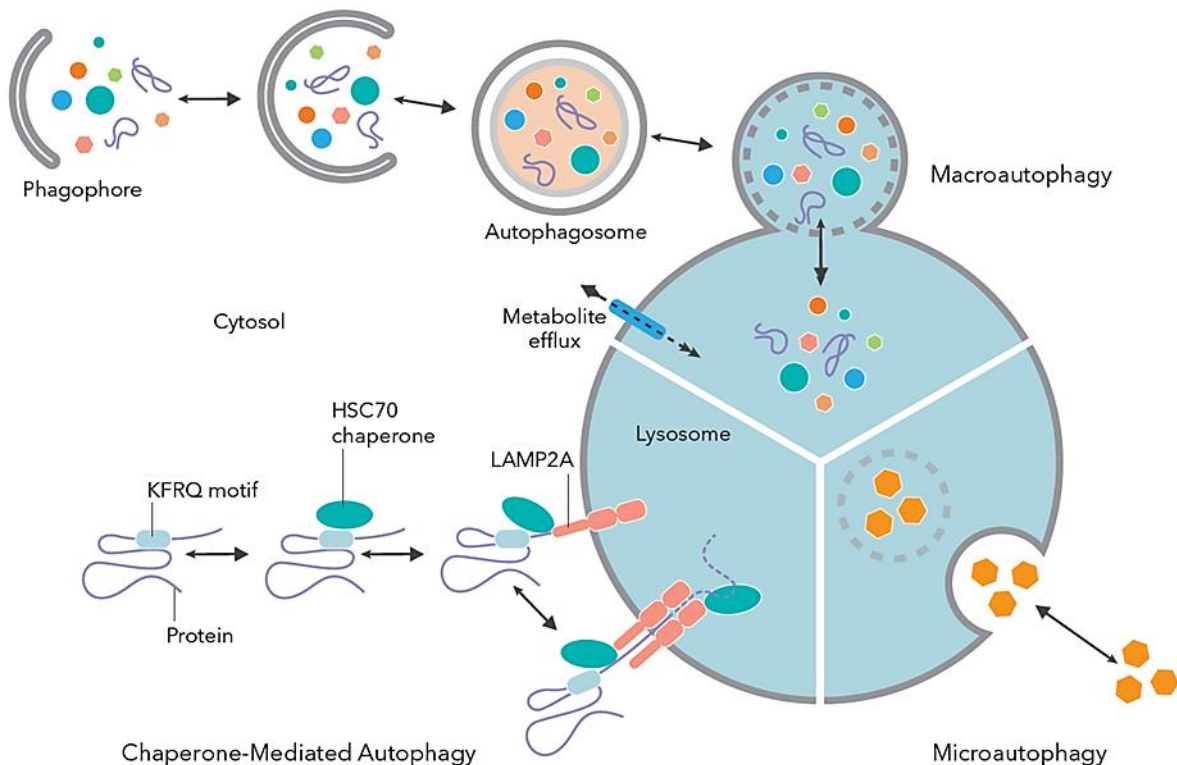


Figure 26 : Représentation schématique des trois types d'autophagie

L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes dégrade les protéines cytosoliques *via* leur interaction avec des protéines chaperonnes (HSC70), puis par la dimérisation de LAMP2A les protéines sont transloquées dans le noyau avant d'être dégradées. La micro-autophagie permet la dégradation des composants cytoplasmiques de manière non-sélective par des invaginations de la membrane lysosomale. Durant la macro-autophagie, le phagophore séquestre les protéines cytosoliques à dégrader, puis forme l'autophagosome qui fusionnera avec le lysosome. Figure issue de Novus Biologicals – STRY0065514 – Autophagy Handbook

L'**autophagie médiée par les protéines chaperonnes** (CMA pour Chaperone-Mediated Autophagy) est un système de dégradation des protéines intracellulaires dans les lysosomes. Les protéines cytosoliques à dégrader sont ciblées sélectivement (motif KFRQ) par des protéines chaperonnes (dont la protéine chaperonne HSC70 (heat shock cognate 70 protein)), puis ce complexe est reconnu et transloqué par l'interaction avec la protéine LAMP2A (lysosome-associated membrane protein type 2A) dans la lumière lysosomale où les protéines seront dégradées (Cuervo et Wong 2014) (figure 26).

La **micro-autophagie** est un processus de dégradation lysosomal non-sélectif des composants cytoplasmiques. Les substrats (composants cytoplasmiques) sont piégés dans des invaginations de la membrane lysosomale appelées « tubes d'autophagie » permettant de former des vésicules dans lesquelles les substrats sont dégradés par des protéases lysosomales. Les produits de ce système de dégradation autophagique sont recyclés par différents processus métaboliques cellulaires comme la production de protéines, lipides, ou d'ATP (W. Li, Li, et Bao 2012; Schaaf et al. 2019; Alharbi, Bima, et Elsamanoudy 2021) (figure 26).

La **macro-autophagie** est un mécanisme de dégradation lysosomale dynamique et complexe faisant intervenir des autophagolysosomes qui résultent de la fusion des lysosomes avec des autophagosomes : organites formés d'une double membrane dans laquelle sont séquestrés les composants cytoplasmiques. La macro-autophagie est une série d'étapes incluant l'induction, l'élongation, la maturation et la fusion de l'autophagosome (avec comme marqueur LC3 (Light Chain 3) -II ou B) avec le lysosome (figure 26). Chaque étape nécessite l'implication de

plusieurs complexes de signalisation dont la famille des protéines Atg (autophagy related gene). L'induction de l'autophagie est dépendante de l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase), de l'inhibition de la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin), et de l'activation simultanée du complexe PI3K/BECN1 (phosphatidylinositol-3 kinase de classe III/beclin1) (Russell et al. 2013; Gallagher, Williamson, et Chan 2016; C. Zhou et al. 2017).

Plusieurs études suggèrent que l'autophagie peut contribuer à la régulation de la biodisponibilité du NO dans les CE exposées à un shear stress physiologique, et que la perte d'autophagie peut être un mécanisme central provoquant un dysfonctionnement endothélial (Nussenzweig, Verma, et Finkel 2015).

Le shear stress induit par un flux laminaire favorise l'autophagie contrairement à un flux oscillatoire ou avec de faibles forces de cisaillement qui lui l'inhibe (J. Liu et al. 2015). Le flux laminaire n'a pas d'effet direct sur la voie mTOR-ULK, mais il régule positivement l'expression de SIRT1 (sirtuine 1), qui active FoxO1, qui se lie aux régions promotrices des gènes associés à l'autophagie et médie ainsi l'autophagie induite par le flux (J. Liu et al. 2015). Le shear stress laminaire a également un effet anti-inflammatoire dépendant de l'activation de l'autophagie et résultant de la translocation de HMGB1 (high-mobility group box-1) et de son interaction avec Beclin1 (Meng et al. 2022). L'inhibition pharmacologique de l'autophagie dans des CE avec la 3-MA (3-Methyladenine) exposées à un flux laminaire augmente l'inflammation induite par le TNF- α , ce qui suggère que l'autophagie est indispensable dans le bénéfice athéroprotecteur anti-inflammatoire du shear stress (Meng et al. 2022). L'autophagie semble également être un élément indispensable pour l'alignement des CE dans le sens du flux dans les régions exposées à de fortes contraintes de cisaillement laminaire (Vion et al. 2017). Ainsi, les contraintes de cisaillement élevées stimulent l'autophagie endothéliale dans les CE humaines et murines.

En revanche, les CE exposées à de faibles contraintes de cisaillement présentent une altération de l'autophagie suite à l'activation de mTOR, à l'inhibition de l'AMPK et au blocage du flux autophagique (Vion et al. 2017). L'inhibition de l'autophagie augmente la formation de plaques dans les régions aux fortes contraintes de cisaillement, mais pas dans les zones où le flux est oscillatoire et athéropone (Vion et al. 2017). Dans les CE de souris hypercholestérolémiques, exposées à de fortes contraintes de cisaillement, une altération de l'autophagie est associée à une augmentation de l'apoptose et de la sénescence (Vion et al. 2017). Le prétraitement des CE à la rapamycine, inhibiteur de mTOR et donc inducteur de l'autophagie, associé à une exposition à des contraintes de cisaillement, augmente l'expression de la eNOS initiée par les contraintes de cisaillement (Guo et al. 2014). Fait intéressant, l'autophagie diminue l'expression de l'ET-1, puissant vasoconstricteur endogène et marqueur spécifique du dysfonctionnement endothélial (Guo et al. 2014). Dans des CE déficientes en autophagie, la phosphorylation de la eNOS et la production de NO induites par de fortes contraintes de cisaillement sont nettement réduites, alors que la production de ROS et de cytokines inflammatoires sont élevées dans ces cellules (Bharath et al. 2014; Nussenzweig, Verma, et Finkel 2015). Une altération de l'autophagie dans les artères humaines et murines contribue à une réduction de la dilatation dépendante de l'endothélium, tandis qu'une amélioration de l'autophagie (avec le tréhalose, un agent stimulant l'autophagie) restaure la dilatation dépendante de l'endothélium en réduisant le stress oxydatif et l'inflammation dépendante de l'ion superoxyde et en augmentant la biodisponibilité du NO (LaRocca et al. 2012).

L'ensemble de ces travaux indique que l'autophagie est un processus cellulaire clé qui préserve la fonction endothéliale en lien avec les contraintes de cisaillement.

En conclusion de ce premier chapitre, nous avons vu que le flux sanguin qu'il soit physiologique (laminaire) ou pathophysiologique (oscillatoire) est détecté par de nombreux mécanosenseurs présents à la surface des cellules endothéliales et conduit à des réponses cellulaires variées. Parmi ces mécanosenseurs, les canaux ioniques comme les canaux potassiques Kir2.1 et les canaux ioniques cationiques non sélectifs comme TRPV4 et Piezo1 (cf paragraphe 2.1.2 d) Canaux ioniques) jouent un rôle primordial.

Bien que les canaux Na⁺ dépendants de potentiel (Nav), exprimés dans les CE, aient déjà été montrés comme mécanosensibles dans des cellules cardiaques ou intestinales, leur implication dans la mécanosignalisation vasculaire reste encore peu décrite (Traub et al. 1999) (paragraphe 3.6.4 Mécanosensibilité des canaux Nav). Dans le chapitre suivant, nous décrirons la structure et la fonction de ces canaux Nav et nous nous focaliserons davantage sur les sous-unités auxiliaires de ces canaux, les sous unités β .

3. Canaux sodiques dépendants du potentiel

Les canaux ioniques sont des entités protéiques transmembranaires, dont l'arrangement tridimensionnel forme un pore, ayant la propriété de laisser passer des ions d'un côté à l'autre de la membrane, suivant les gradients électrochimiques, la sélectivité et le mode d'ouverture du canal. Parmi les canaux ioniques dépendants du voltage, les canaux sodiques dépendants du potentiel ou canaux Nav s'activent lors d'une dépolarisation membranaire, sont sélectifs des ions sodium et caractéristiques des cellules excitables. Les canaux Nav sont également la cible de nombreuses molécules naturelles ou synthétiques. En fonction des sites de fixation de ces composés, une cartographie moléculaire de la sous-unité Nav α a été proposée (Mattei et Legros 2014).

3.1. Gènes et structure

Les canaux Nav forment un complexe hétérotrimérique, composés de trois sous-unités (Beneski et Catterall 1980) : une sous-unité α et deux sous-unités β . La sous-unité « principale » α (ou Nav α), de 260 kDa, constitue le pore du canal, et est suffisante pour générer un courant sodique expérimentalement (Goldin et al. 1986; Masaharu Noda et al. 1986; Qiao et al. 2014). Physiologiquement, la sous-unité α est associée à deux, identiques ou différentes, sous-unités β (ou Nav β), de 30 à 40 kDa, dites « auxiliaires ».

Chez les mammifères, la **sous-unité α** est codée par 9 gènes. Les gènes *SCN1A* *SCN2A* *SCN3A* *SCN4A* *SCN5A* codent respectivement les isoformes protéiques Nav1.1 à Nav1.5 ; et les gènes *SCN8A* *SCN9A* *SCN10A* *SCN11A* vont former respectivement les isoformes protéiques Nav1.6 à Nav1.9 (tableau 1). La sous-unité Nav α est constituée de quatre domaines transmembranaires homologues (I à IV) (figure 27). Chaque domaine transmembranaire est composé de six segments transmembranaires numérotés de 1 à 6 et organisés en hélice α (figure 27). Entre les segments 5 et 6 de chaque domaine, on trouve les boucles P extracellulaires, orientées vers l'intérieur, où la séquence en acides aminés à motif DEKA (Asp-Glu-Lys-Ala) définit la sélectivité ionique pour les canaux Nav (figure 27). Le segment 4, riche en acides aminés positifs, est le détecteur de potentiel (Catterall 2000) (figure 27). Lors d'une dépolarisation membranaire, il entraîne un changement conformationnel du canal puis son ouverture. Entre le segment 6 du domaine III et le segment 1 du domaine IV, la boucle intracellulaire avec le motif IFM (Ile-Phe-Met) constitue la porte d'inactivation (ou porte h), bloquant l'influx de Na⁺ avant la fermeture du canal (figure 27). Les extrémités N-terminale et C-terminale sont situées en intracellulaire (F. H. Yu et Catterall 2003) (figure 27).

Quatre gènes (*SCN1B* à *SCN4B*) codent pour les 5 **sous-unités Nav β** des mammifères, formant 4 isoformes transmembranaires : Nav β 1 à Nav β 4, et la forme soluble de Nav β 1 issue d'un épissage alternatif du gène *SCN1B* : Nav β 1B (tableau 1) (L. L. Isom et al. 1992; 1995; Kazen-Gillespie et al. 2000; K. Morgan et al. 2000; Qin et al. 2003; F. H. Yu et Catterall 2003). Excepté Nav β 1B, les 4 sous-unités Nav β transmembranaires sont composées d'un domaine N-terminal extracellulaire, d'un segment transmembranaire de type hélice α , et d'un domaine C-terminal cytoplasmique (figure 27) (L. L. Isom 2001; W. Brackenbury et Isom 2011). Les sous-unités Nav β contiennent une structure similaire au motif Immunoglobuline de type-V (ou « Ig-like ») dans leur domaine extracellulaire (L. L. Isom et Catterall 1996). Nav β 1B contient le même domaine Ig-like que Nav β 1, mais une région C-terminale successive qui est le produit d'une rétention d'intron pendant l'épissage alternatif de *SCN1B* dépourvu du domaine transmembranaire, résultant en une molécule sécrétée et soluble (Kazen-Gillespie et al. 2000; Patino et al. 2011). Les sous-unités Nav β 1 et Nav β 3 possèdent environ 60% d'homologie de séquence en

acides aminés (L. L. Isom et al. 1992; K. Morgan et al. 2000) et interagissent avec la sous-unité α de manière non covalente *via* les domaines N-terminal et C-terminal (K. A. McCormick et al. 1998; Meadows et al. 2001). Les sous-unités $\text{Nav}\beta 2$ et $\text{Nav}\beta 4$ interagissent de manière covalente avec la sous-unité α par des ponts disulfures établis grâce à un résidu cystéine conservé présent au niveau du domaine Ig-like en N-terminal (C. Chen et al. 2012; Gilchrist et al. 2013).

Des mutations héréditaires ou spontanées des différents gènes des sous-unités des canaux Nav sont à l'origine de nombreuses canalopathies, qui se manifestent par un gain ou une perte de fonction (seules les mutations sur les sous-unités $\text{Nav}\beta$ seront détaillées dans la partie 3.5. Canalopathies et physiopathologies associées aux sous-unités $\text{Nav}\beta$).

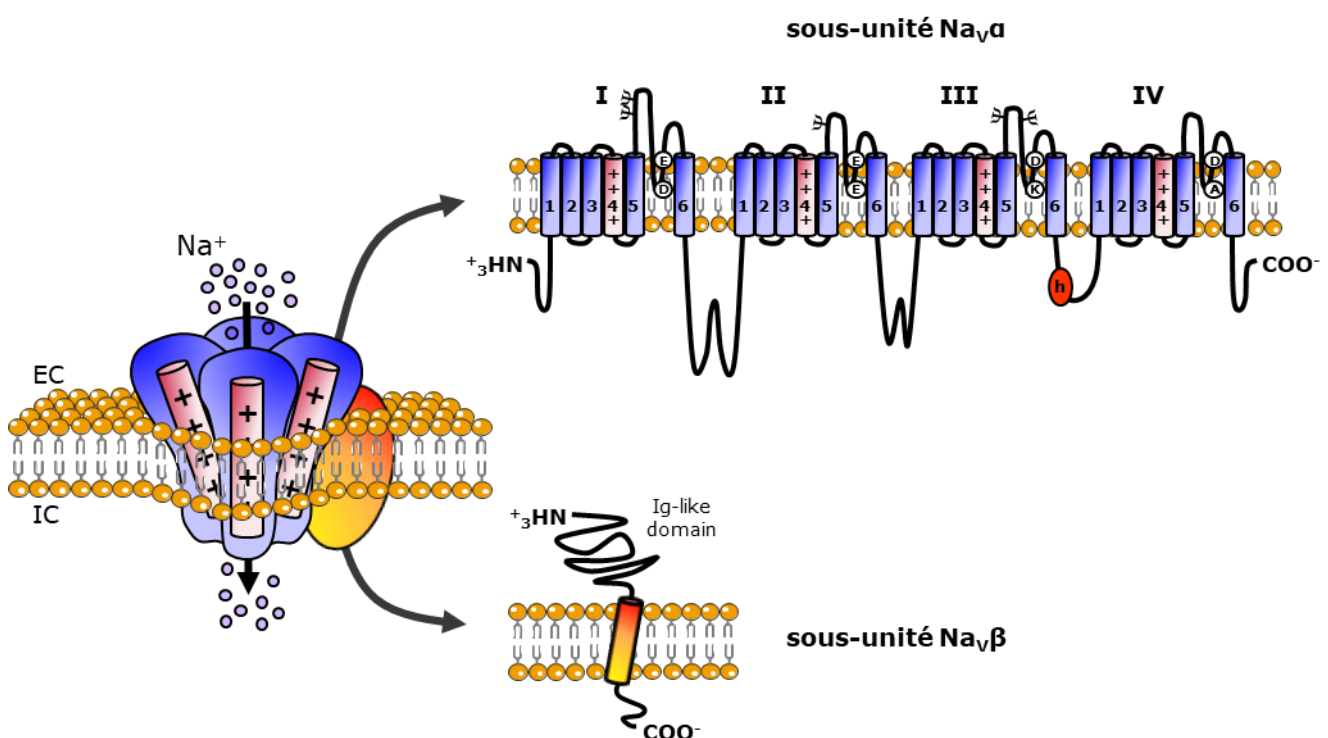


Figure 27 : Structure des sous-unités α et β des canaux Nav

La sous-unité $\text{Nav}\alpha$ est constituée de 4 domaines homologues (I à IV) composés de 6 segments transmembranaires (1 à 6). Le segment 4 chargé positivement (+) est le détecteur de potentiel. Les boucles extracellulaires entre les segments 5 et 6 de chaque domaine représente la porte d'activation du canal. La boucle intracellulaire entre le segment 6 du domaine III et le segment 1 du domaine IV constitue la porte d'inactivation ou porte h. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont situées en intracellulaire (IC). Les sous-unités $\text{Nav}\beta$ sont composées d'une boucle Ig-like dans leur domaine extracellulaire (EC), d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine C-terminal intracellulaire. Les sites de glycosylation sont représentés par des ψ .

Gènes	Isoformes	Sensibilité à la TTX	Expression tissulaire
<i>SCN1A</i>	Nav1.1	TTX-sensible	Système nerveux central (SNC), microglie, kératinocytes
<i>SCN2A</i>	Nav1.2	TTX-sensible	SNC, astrocytes, cellules β des îlots de Langerhans, vaisseaux sanguins
<i>SCN3A</i>	Nav1.3	TTX-sensible	SNC, astrocytes, cellules β des îlots de Langerhans, vaisseaux sanguins
<i>SCN4A</i>	Nav1.4	TTX-sensible	Muscle squelettique, cellules cancéreuses, vaisseaux sanguins
<i>SCN5A</i>	Nav1.5	TTX-résistant	Muscle cardiaque, astrocytes, microglie, macrophages, lymphocytes T, cellules cancéreuses, vaisseaux sanguins
<i>SCN8A</i>	Nav1.6	TTX-sensible	SNC, astrocytes, microglie, macrophages, kératinocytes, cellules cancéreuses, vaisseaux sanguins
<i>SCN9A</i>	Nav1.7	TTX-sensible	Système nerveux périphérique (SNP), cellules cancéreuses, vaisseaux sanguins
<i>SCN10A</i>	Nav1.8	TTX-résistant	SNP, rétine, kératinocytes
<i>SCN11A</i>	Nav1.9	TTX-résistant	SNP, rétine
<i>SCN1B</i>	Nav β 1		SNC, SNP, myocytes cardiaques, cellules cancéreuses
<i>SCN1B</i>	Nav β 1B		SNC, SNP, muscle squelettique
<i>SCN2B</i>	Nav β 2		SNC, SNP, myocytes cardiaques, muscle squelettique, cellules cancéreuses
<i>SCN3B</i>	Nav β 3		SNC, SNP, myocytes cardiaques, cellules cancéreuses
<i>SCN4B</i>	Nav β 4		SNC, SNP, myocytes cardiaques, muscle squelettique, cellules cancéreuses

Tableau 1 : Résumé des différents gènes et isoformes des sous-unités α et β des canaux Nav chez les mammifères et leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX), et leur distribution tissulaire. Figure inspirée de (Black et Waxman 2013; de Lera Ruiz et Kraus 2015; Lopez-Charcas et al. 2021).

3.2. Expression et distribution tissulaire/cellulaire

L'expression des **sous-unités Nava** des canaux Nav a été initialement décrite dans les cellules excitables telles que les neurones, les cardiomyocytes ou les cellules musculaires squelettiques ; et leur localisation diffère en fonction du tissu. Les isoformes Nav1.1 Nav1.2 Nav1.3 Nav1.6 sont exprimés dans les neurones du système nerveux central (SNC) ; Nav1.7 Nav1.8 Nav1.9 sont majoritairement exprimés dans les neurones du système nerveux périphérique (SNP) ; les motoneurones expriment Nav1.6 ; les fibres musculaires squelettiques Nav1.4 ; et les myocytes cardiaques Nav1.5 (tableau 1) (Catterall, Goldin, et Waxman 2005; de Lera Ruiz et Kraus 2015).

Récemment, l'expression (transcriptionnelle et protéique) et l'activité (courants sodiques transitoires) des canaux Nav ont été identifiées dans des tissus et cellules qui ne sont pas considérés comme excitables électriquement (c'est-à-dire qui ne génèrent pas de potentiel d'action). Ces cellules sont dites « non-excitables » et les canaux Nav ont été détectés dans les astrocytes, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, les cellules β des îlots de Langerhans, les kératinocytes, les macrophages, la microglie, les cellules précurseurs d'oligodendrocyte, les cellules de Müller (rétine), les lymphocytes T et les cellules cancéreuses, entre autres, dans lesquels la fonction biologique et la distribution subcellulaire sont incertains (tableau 1) (Black et Waxman 2013; Roger et al. 2015). Les **sous-unités Nav β** sont exprimés dans un grand nombre de tissus et cellules, incluant cellules excitables et non-excitables (tableau 1), et leur expression varie au cours du développement, tout comme les sous-unités Nav α . Nav β 1 et Nav β 2 sont prédominantes dans le développement post-natal cérébral et sont retrouvées avec des niveaux élevés chez l'adulte dans le cerveau (L. L. Isom et al. 1995; Kazen-Gillespie et al. 2000). Nav β 1B et Nav β 3 sont fortement exprimées lors du développement embryonnaire et au début de la vie, et l'expression de Nav β 3 persiste à l'âge adulte dans le cœur (K. Morgan et al. 2000; Qin et al. 2003; Patino et al. 2011). Le profil d'expression de Nav β 4 lors du développement n'est que peu documenté (O'Malley et Isom 2015).

La sous-unité **Nav β 1** est exprimée dans le cerveau (hippocampe, noyaux thalamiques, ganglions de la base), le cervelet, le cortex cérébral, la médulla, la moelle épinière, les DRG, le muscle squelettique (Hartshorne et Catterall 1984; Kazen-Gillespie et al. 2000; Qin et al. 2003; C. Chen et al. 2004). La sous-unité **Nav β 1B** est exprimée de manière prédominante dans le cerveau humain, la moelle épinière, les DRG (neurones sensoriels), le muscle squelettique, et avec un faible niveau d'expression dans le cœur, le placenta, le poumon, le foie, les reins, et le pancréas (Qin et al. 2003). Dans le SNC, Nav β 1B est exprimée dans le cervelet, le cortex cérébral et le lobe occipital. L'expression de Nav β 1B est très similaire à celle de Nav β 1, excepté que Nav β 1 est plus abondante dans le cortex cérébral que dans le cervelet (Qin et al. 2003). La sous-unité **Nav β 2** présente une large distribution dans le cerveau (cellules pyramidales et granulaires de l'hippocampe, cortex cérébral, globus pallidus, noyau réticulaire, soma et dendrites des cellules cérébelleuses de Purkinje) et est exprimée dans les DRG (F. H. Yu et al. 2003). La sous-unité **Nav β 3** est exprimée de manière abondante dans le cerveau de rat adulte, et plus faiblement dans les glandes surrénales, le muscle squelettique, les reins, le pancréas, le cœur et les poumons (K. Morgan et al. 2000; Shah et al. 2000; Stevens et al. 2001). De façon complémentaire à Nav β 1, Nav β 3 est exprimée dans l'hippocampe, et dans le cortex olfactif et les ganglions de la base (où Nav β 1 est exprimée faiblement) (K. Morgan et al. 2000; Shah et al. 2000). Le niveau d'expression d'ARNm de Nav β 3 est plus faible dans les noyaux thalamiques et absent dans le cervelet (où les niveaux d'expression de Nav β 1 sont importants) (K. Morgan et al. 2000). La sous-unité Nav β 3 est également exprimée dans les DRG et les nerfs périphériques et différenciellement exprimée en condition pathologique (cf paragraphe 3.5.3. Douleur) (M. A. Casula et al. 2004). Nav β 3 a également été détectée dans les CE artérielles intra crânielles (Hermkens et al. 2019). La sous-unité **Nav β 4** est abondamment exprimée dans les DRG, plus faiblement dans le cerveau, la moelle épinière, le muscle squelettique et le cœur, et détectée dans la peau (F. H. Yu et al. 2003). La distribution tissulaire de l'expression de Nav β 4 est détaillée dans le travail de (F. H. Yu et al. 2003). Au niveau cardiaque, Nav β 1 est exprimée dans les tubules transverses des myocytes ventriculaires et dans les disques intercalaires des myocytes atriaux, alors que Nav β 3 est exprimée abondamment dans les tubules transverses des myocytes ventriculaires et faiblement dans les myocytes atriaux (Fahmi et al. 2001; Maier et al. 2004; Kaufmann et al. 2013). Nav β 2 et Nav β 4 sont localisées dans les disques intercalaires des myocytes cardiaques ventriculaires murins (Maier et al. 2004). Nav β 2 est

exprimée abondamment et Nav β 4 de façon ponctuelle à la surface des myocytes cardiaques atriaux humains (Kaufmann et al. 2013).

Les sous-unités Nav β sont également exprimées dans des cellules cancéreuses et différenciellement exprimées en condition pathologique (cf paragraphe 3.5.5. Cancer) (J. K. J. Diss et al. 2008; Chioni et al. 2009; Nelson et al. 2014; Roger et al. 2015; Lopez-Charcas et al. 2021). Cette expression peut paraître surprenante au premier abord mais peut s'expliquer par le fait que les sous-unités Nav β appartiennent à la super famille des molécules d'adhésion cellulaires de type immunoglobuline (Ig-CAM).

Cette diversité dans le nombre et la localisation des sous-unités Nav α et Nav β permet l'expression de différentes combinaisons dans un type cellulaire spécifique et même dans un domaine subcellulaire spécifique au sein d'une cellule, en fonction du rôle de celle-ci dans le tissu global (Calhoun et Isom 2014). Par exemple, Nav β 1, *via* son interaction avec une neurofascine (C.F. Ratcliffe et al. 2001), permet le recrutement et le maintien de Nav α (Nav1.6) au niveau des nœuds de Ranvier optimisant la propagation rapide des potentiels d'action dans les axones sur de longues distances (Freeman et al. 2016).

De plus, les sous-unités Nav α et Nav β peuvent subir des modifications post-traductionnelles modifiant leur expression et fonction (L. L. Isom et al. 1992; Johnson et al. 2004; Sokolov et al. 2018). Ici seules les modifications post-traductionnelles des sous-unités Nav β seront abordées. Concernant les modifications post-traductionnelles des sous-unités Nav α , elles sont décrites dans la revue (Pei, Pan, et Cummins 2018).

3.2.1. Modifications post-traductionnelles des sous-unités Nav β

Les sous-unités Nav β (tout comme les sous-unités Nav α) peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles : phosphorylation, glycosylation, palmitoylation, clivage protéolytique, dont la plupart ont été décrites pour la sous-unité Nav β 1 (Kruger et Isom 2016). Ces régulations post-traductionnelles ainsi que le complexe macromoléculaire par les interactions protéines-protéines et le trafficking intracellulaire, amènent à des changements dans l'expression des canaux Nav à la membrane plasmique et dans la régulation de leur activité (Johnson et al. 2004).

a) Glycosylation

La glycosylation est définie comme un procédé enzymatique qui consiste à ajouter et lier de façon covalente un glucide au cours de la synthèse de protéines. Les sous-unités Nav β sont des **protéines hautement glycosylées** ; la glycosylation représentant environ un tiers du poids moléculaire des sous-unités Nav β (Messner et Catterall 1985; Roberts et Barchi 1987). Les sous-unités Nav β matures contiennent trois à quatre sites prédictifs de N-glycosylation localisés dans leur domaine extracellulaire Ig-like (L. L. Isom et al. 1992; K. A. McCormick et al. 1998; Namadurai et al. 2015). De plus, les sous-unités Nav β 1 et Nav β 3 interviennent dans la modulation des formes de glycosylation de Nav1.7, permettant son adressage à la membrane et modifiant ainsi les propriétés électrophysiologiques du canal (Laedermann et al. 2013).

b) Sialylation

La sialylation consiste en la fixation d'un acide sialique sur des sites de glycosylation. La sialylation de Nav β 1 et Nav β 2 module l'expression du canal à la surface membranaire et les propriétés électrophysiologiques de la sous-unité Nav α associée (Johnson et al. 2004; Johnson et Bennett 2006).

c) Phosphorylation

Le domaine C-terminal de la sous-unité Nav β 1 sert de lien physique entre la sous-unité Nav α et le cytosquelette. Ce domaine contient des sites de modifications post-traductionnelles de type phosphorylation qui régulent les **interactions** entre les sous-unités Nav β et les protéines du cytosquelette. Le résidu tyrosine intracellulaire Y-181 de Nav β 1 peut être phosphorylé (Jyoti D. Malhotra et al. 2002; 2004). Dans les myocytes cardiaques, cette phosphorylation régule le recrutement de l'ankyrine médié par Nav β 1 aux points de contact cellule-cellule (Jyoti D. Malhotra et al. 2002). Nav β 1 non phosphorylée est localisée au niveau des tubules T avec l'ankyrine B, tandis que Nav β 1 phosphorylée est localisée au niveau des disques intercalaires avec la connexine-43, la N-cadhérine et Nav1.5 (Jyoti D. Malhotra et al. 2002; 2004). De plus, la phosphorylation de Nav β 1 sur Y-181 augmente l'expression de la sous-unité Nav α à la surface cellulaire mais ne module pas le courant I_{Na} (McEwen et Isom 2004). Dans les neurones de rat, le domaine intracellulaire de Nav β 1 interagit avec le récepteur protéine tyrosine kinase- β (RPTK β) (Charlotte F. Ratcliffe et al. 2000), régulant potentiellement le mécanisme de phosphorylation de Y181. Par conséquent, l'état de phosphorylation Y-181 de Nav β 1 régule son interaction avec les protéines du cytosquelette, entre autres, ainsi que sa localisation subcellulaire. Enfin, il a été rapporté qu'un résidu thréonine intracellulaire de Nav β 1 pourrait être phosphorylé dans les synaptosomes de souris (modèle d'étude de transmission synaptique) (Trinidad et al. 2012) mais la signalisation fonctionnelle de cette modification post-traductionnelle n'a pas encore été démontrée.

d) Palmitoylation

La palmitoylation est la formation d'une liaison covalente entre un acide gras, comme l'acide palmitique, et un résidu de cystéine (ou sérine ou thréonine), généralement sur une protéine membranaire. Récemment, il a été montré que la sous-unité Nav β 1 pouvait être S-palmitylée *in vitro* et *in vivo* dans le cerveau de souris (Bouza et al. 2020). Dans des cellules hétérologues, la substitution du résidu cystéine 162 par l'alanine abolit la palmitoylation de Nav β 1, et induit une diminution de la fraction de Nav β 1 dans la membrane plasmique et une réduction du niveau de Nav β 1 disponible pour le clivage protéolytique (Bouza et al. 2020). Il semble donc que la S-palmitoylation de Nav β 1 lui confère la stabilité à la membrane plasmique et la **localisation** à la surface cellulaire.

Les sous-unités Nav β sont également les cibles d'un clivage séquentiel protéolytique (décrits dans le paragraphe 3.4.2. Nav β et signalisation par protéolyse intramembranaire régulée ou RIP).

3.3. Fonction canalaire/canonique

Les canaux Nav sont responsables d'un courant entrant sodique I_{Na} , et leur activité est dépendante du potentiel de membrane. Ils jouent ainsi un rôle essentiel dans l'excitabilité cellulaire puisqu'ils sont à l'origine de la genèse et de la propagation des potentiels d'action (Hodgkin et Huxley 1952). Leur rôle canonique dans la genèse d'un courant électrique et dans la conduction dans les cellules excitables a été bien établi et est relativement bien compris (Rush, Cummins, et Waxman 2007; Catterall 2012).

3.3.1. Conformations des canaux Nav et propriétés électrophysiologiques

Les canaux Nav peuvent être présents sous 3 conformations dépendantes des portes d'activation et d'inactivation (figure 28). Au repos, le canal est à l'état **fermé**, par la porte d'activation, imperméable aux ions Na^+ et peut être activé immédiatement. Lors d'une dépolarisation membranaire, la porte d'activation s'ouvre, le canal est à l'état **ouvert** et devient donc activé et perméable aux ions Na^+ . Ensuite, la porte d'inactivation se ferme, le canal devient imperméable aux ions Na^+ et passe à l'état **inactivé** (figure 28). Dans cette conformation, le canal ne peut être ré-ouvert immédiatement, il faut attendre que le canal passe à l'état fermé pour qu'il soit de nouveau activable, soit que la porte d'activation se ferme et que celle d'inactivation s'ouvre (figure 28). Une inactivation rapide est l'une des caractéristiques biophysiques des canaux Nav (figure 29).

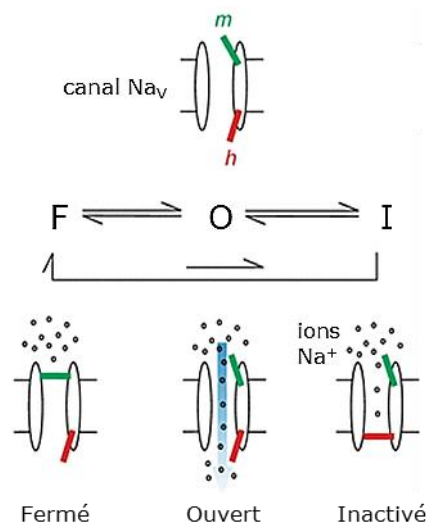


Figure 28 : Schéma des différents états conformationnels des canaux Nav

Les canaux Nav peuvent être présents sous trois conformations : fermé (F) ou ouvert (O) ou inactivé (I). La porte m (verte) représente la porte d'activation, alors que la porte h (rouge) représente la porte d'inactivation. (B) Figure adaptée de (Engel 2013).

Un des éléments indispensables pour étudier la fonction canalaire des canaux ioniques étant l'électrophysiologie, la technique de **patch-clamp** permet d'enregistrer les courants ioniques transitant à travers la membrane et de les caractériser suivants les protocoles utilisés.

Afin d'illustrer brièvement les **propriétés électrophysiologiques** des canaux Nav, nous prendrons comme exemples les résultats de mon travail sur la caractérisation électrophysiologique des courants Na^+ médiés par les canaux Nav endogènes de la lignée de cellules antéhypophysaires de rat GH3b6 qui a été publié début 2022 dans le journal *International Journal of Molecular Sciences (IJMS)* (Réthoré et al. 2022).

Des enregistrements en patch-clamp en configuration cellule-entière ont été réalisés. Un protocole de dépolarisations successives a permis d'enregistrer une déflexion négative symbolisant un courant entrant Na^+ dépendant du potentiel (figure 29A), de déterminer l'amplitude du courant pour un potentiel donné et de tracer une courbe de la densité du pic de courant en fonction du potentiel imposé (ou courbe I/V) (figure 29B). De plus, l'application de tétrodothine (TTX) à 300 nM a supprimé l'intégralité des courants Na^+ signifiant que ces courants sont médiés par les canaux Nav (Réthoré et al. 2022). Le protocole de dépolarisation successives suivi d'une dépolarisation fixe (0 mV pendant 15 ms) permet de mesurer le nombre de canaux activables et inactivés pour un potentiel imposé, et par conséquent de tracer les courbes de dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation

et de l'inactivation, respectivement (figure 29C). Le protocole constitué d'une dépolarisation (+20 mV pendant 100 ms) puis d'une seconde dépolarisation (+20 mV pendant 20 ms) qui se décale dans le temps, permet de mesurer la cinétique de la récupération de l'inactivation, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que les canaux soient de nouveau activables (ou le temps pour qu'ils passent de l'état inactivé à fermé) (figure 29D).

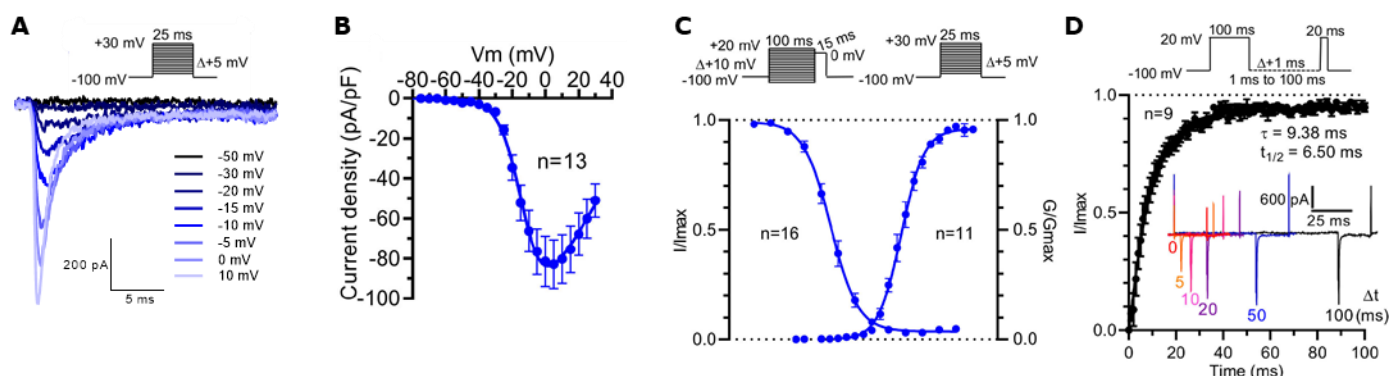


Figure 29 : Caractérisation électrophysiologique du courant I_{Na} des cellules GH3b6 (A) Représentation d'une famille de tracés de courant Na^+ obtenus avec le protocole schématisé au-dessus. (B) Courbe I/V obtenue par la moyenne de la densité du pic de courant Na^+ pour chaque potentiel. (C) Courbes de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation. Les protocoles utilisés sont schématisés au-dessus de chaque courbe. (D) Cinétique de récupération de l'inactivation. Le protocole utilisé est schématisé au-dessus du graphique et quelques tracés représentatifs sont présentés dans l'encart. Figure adaptée de (Réthoré et al. 2022).

3.3.2. Classification pharmacologique

Du fait de leur rôle dans le couplage excitation-transmission de l'influx nerveux, excitation-contraction au niveau cardiaque et excitation-sécrétion dans les cellules endocrines, les canaux Nav sont la cible de nombreuses **toxines** naturelles d'origine animale ou végétale. Ces dernières exercent leurs effets en se fixant sur des sites spécifiques de la sous-unité $Nav\alpha$ (Mattei et Legros 2014; de Lera Ruiz et Kraus 2015), ce qui modifie les propriétés biophysiques engendrant ainsi un blocage ou une activation de ces canaux (Denac, Mevissen, et Scholtysik 2000). Ces toxines ont un rôle clé au sein dans la relation proie-prédateur et dans l'évolution des stratégies de prédation avec la notion de course aux armements co-évolutive (Geffeney et al. 2002). Par exemple, la tétrodotoxine ou TTX, qui bloque spécifiquement les canaux Nav est produite par des tritons (du genre *Taricha*) comme arme de défense envers des couleuvres rayées (*Thamnophis sirtalis*). Au cours de l'évolution, une diversification des canaux Nav s'est opérée chez cette couleuvre pour devenir résistante à la TTX afin de pouvoir se nourrir de tritons sans risquer d'être intoxiquée (Geffeney et al. 2002).

Ainsi, la **TTX**, une toxine guanidique produite également par des bactéries présentes dans certains organes du poisson globe ou poisson Fugu se fixent spécifiquement sur le site 1 de la sous-unité $Nav\alpha$ afin de bloquer le pore du canal et donc la conductance des ions Na^+ . Elle est considérée comme le bloqueur de référence des canaux Nav . Le classement pharmacologique en fonction de la sensibilité ou résistance à cet inhibiteur sélectif des canaux sodiques s'établit en fonction de la concentration de TTX utilisée pour bloquer les canaux Nav (M. Noda et al. 1989; Terlau et al. 1991; Heinemann et al. 1992). Les canaux bloqués par de faibles concentrations de TTX (de l'ordre du nanomolaire) sont dits sensibles à la TTX ($Nav1.1$ à 1.4 , $Nav1.6$ et $Nav1.7$), alors que les canaux résistants à la TTX ($Nav1.5$, $Nav1.8$, $Nav1.9$) sont bloqués par de fortes concentrations de TTX (centaines de micromolaire) (tableau 1) (Catterall et al. 2003).

À contrario, la vétratridine (VTD), un alcaloïde polycyclique d'origine végétale, se fixe spécifiquement sur le site 2 de la sous-unité Nav_α et entraîne une activation continue du canal, empêchant ainsi son inactivation (Mattei et Legros 2014). Cette toxine est une des toxines activatrices de référence des canaux Nav .

Concernant les sous-unités Nav_β , aucune molécule naturelle, synthétique ou chimique, n'est connue pour moduler l'activité de ses sous-unités.

3.3.3. Fonction canalaire dans les cellules non excitables

Lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules non excitables, les canaux Nav possèdent des fonctions différentes de la genèse et la propagation des potentiels d'action. Ainsi les canaux Nav semblent contribuer à l'activité des cellules microgliales et des cellules immunitaires. Par exemple, l'inhibition par la TTX de l'activité des isoformes $\text{Nav}_{1.1}$ $\text{Nav}_{1.5}$ $\text{Nav}_{1.6}$ exprimées dans les cellules microgliales engendre une diminution de l'activité phagocytaire et de la sécrétion des interleukines 1α et 1β (Black, Liu, et Waxman 2009). De plus, lorsque des cellules microgliales sont dépourvues de $\text{Nav}_{1.6}$ leur capacité migratoire est diminuée (Black, Liu, et Waxman 2009). Dans les astrocytes, le blocage de l'activité des canaux Nav par la TTX perturbe l'activité Na^+/K^+ -ATPase et induit la mort des astrocytes (Sontheimer et al. 1994). Les auteurs suggèrent que l'influx de Na^+ par les canaux Nav dans les cellules gliales permettrait le maintien de la concentration de Na^+ intracellulaire nécessaire pour réguler correctement l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase (Sontheimer et al. 1994). De plus, il a été rapporté que la TTX bloquant l'activité de $\text{Nav}_{1.7}$ exprimé dans les cellules dendritiques immatures, entraîne une diminution de la migration induite par des chimiokines et altère l'activation des cellules dendritiques (Kis-Toth et al. 2011). L'activation de $\text{Nav}_{1.5}$, exprimé dans les endosomes tardifs de macrophages, induit un efflux de Na^+ et un influx de protons dans l'endosome, diminuant ainsi le pH intra-endosomal (Carrithers et al. 2007). $\text{Nav}_{1.5}$ serait donc nécessaire au processus d'acidification des endosomes lors de la phagocytose (Carrithers et al. 2007).

3.3.4. Fonction canalaire dans les cellules cancéreuses

Dans plusieurs types de cellules cancéreuses, des courants I_{Na} ont également été détectés (Lopez-Charcas et al. 2021). Dans des cellules de cancer du sein ou de cancer du côlon, la TTX a induit une diminution de l'amplitude du courant I_{Na} médié par $\text{Nav}_{1.5}$ et une réduction du potentiel invasif des cellules cancéreuses (Fraser et al. 2005; House et al. 2010). Le taux d'expression et l'activité de l'isoforme $\text{Nav}_{1.5}$, semblent être corrélés positivement avec le phénotype invasif et métastatique du cancer, voire à un mauvais pronostic de la survie des patients (M. Yang et al. 2012). Les taux augmentés d'expression de $\text{Nav}_{1.6}$ et $\text{Nav}_{1.7}$ semblent également être en lien avec la gravité du cancer du col de l'utérus et de la prostate (J. K. J. Diss et al. 2005; Lopez-Charcas et al. 2018). Un traitement à la TTX diminue les capacités invasives des cellules du cancer de l'utérus (Lopez-Charcas et al. 2018). Les canaux Nav exprimés dans les cellules non excitables sont donc également fonctionnels et leur rôle canonique est associé à la **mobilité** (migration et invasion) de différents types cellulaires, au niveau physiologique et pathologique.

3.3.5. Fonction canalaire et sous-unités Nav_β

A l'origine, les sous-unités Nav_β ont été caractérisées comme des **sous-unités auxiliaires des canaux Nav** , capables de réguler les propriétés électrophysiologiques des sous-unités Nav_α et de moduler la pharmacologie des canaux Nav (leur sensibilité (Lenkowski et al. 2003) et leur affinité de liaison (Wilson 2011 ; Zhang 2013)).

Les Nav β 1-3 régulent l'adressage des Nav α à la membrane plasmique (Meadows et al. 2001; Ishikawa et al. 2013; Dulsat et al. 2017) et toutes les sous-unités Nav β augmentent l'amplitude du courant I_{Na} (figure 29A) (L. L. Isom, De Jongh, et Catterall 1994; Fahmi et al. 2001; Grieco et al. 2005; Bon et al. 2016). Les sous-unités Nav β induisent d'autres changements dans la cinétique de I_{Na} (figure 29A), incluant une accélération de la récupération de l'inactivation (figure 29D) (Merrick et al. 2010; Laedermann et al. 2013) et de l'inactivation (figure 29C) (L. L. Isom et al. 1992; L. L. Isom, De Jongh, et Catterall 1994). Les Nav β s peuvent décaler positivement et négativement les courbes de dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation (figure 29B) (Cusdin et al. 2010; Zhao, O'Leary, et Chahine 2011) et de l'inactivation (figure 29C) (Meadows et al. 2001; Zhu et al. 2017), en fonction de l'expression endogène des sous-unités Nav et d'autres protéines interagissant avec ces canaux dans le système expérimental utilisé.

Les sous-unités Nav β peuvent également moduler l'expression et les propriétés électrophysiologiques d'**autres canaux dépendants du potentiel** comme les canaux potassiques (K_v) (W. Brackenbury et Isom 2011; D. Hu et al. 2012; Marionneau et al. 2012; Bouza et Isom 2018). En effet, il a été montré dans le cerveau de souris que Nav β 1 interagit avec K_v4.2, un acteur majeur du courant potassique transitoire de type-A (I_A) participant au contrôle du déclenchement des potentiels d'action et par conséquent à l'excitabilité cellulaire. Cette interaction entre K_v4.2 et Nav β 1 augmente la stabilité de l'expression de K_v4.2 de manière hétérologue. L'extinction de Nav β 1 diminue les densités de courant K⁺ de type-A dans les neurones corticaux isolés et prolonge la durée des potentiels d'action (Marionneau et al. 2012). La sous-unité Nav β 1 pourrait donc aussi avoir un rôle de régulateur de la densité de canaux K⁺ et de l'excitabilité neuronale.

3.4. Fonctions non canoniques – implication des sous-unités Nav β

Les fonctions des canaux ioniques dépendants du potentiel dans la régulation de l'excitabilité électrique sont décrites depuis de nombreuses années, mais leur implication dans des fonctions non canoniques, c'est-à-dire des fonctions qui ne sont pas en lien avec l'entrée de Na⁺ et la dépolarisation membranaire, commence seulement à être documentée. Depuis quelques années, des études montrent que les canaux Nav participent ou régulent de multiples fonctions effectrices dans les cellules non excitables. Ces fonctions sont portées aussi bien par la sous-unité Nav α que Nav β mais nous nous focaliserons ici dans ce manuscrit principalement sur les sous-unités Nav β . Identifiées au départ, comme de simples protéines chaperonnes, les sous-unités Nav β se révèlent être **multifonctionnelles** puisqu'elles participent à des rôles divers et essentiels à travers de nombreux tissus et systèmes, à la fois dans les cellules excitables et non excitables, avec ou sans la sous-unité α des canaux Nav (W. Brackenbury et Isom 2011). En effet, en plus d'avoir un rôle de modulateur/régulateur des cinétiques et dépendances vis-à-vis du potentiel des courants Na⁺, leur structure Ig-like dans le domaine extracellulaire leur confère la particularité de faire partie des molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (Ig-CAM) (L. L. Isom et Catterall 1996; Srinivasan, Schachner, et Catterall 1998; Jyoti Dhar Malhotra et al. 2000; C.F. Ratcliffe et al. 2001; McEwen et Isom 2004). Elles participent ainsi à d'autres fonctions en tant que protéines d'adhésion cellulaire semblables aux intégrines, cadhérines et sélectines (L. L. Isom et Catterall 1996; Lori L. Isom 2002; W. Brackenbury et Isom 2011) (cf paragraphe 3.4.1. Nav β et molécules d'adhésion cellulaire). Les sous-unités Nav β sont également des substrats pour le clivage protéolytique par les secretases (Kim et al. 2005; Wong et al. 2005) et il a été suggéré que ce processus permettrait la régulation de l'expression de gènes, dont

ceux de la sous-unité $\text{Nav}\alpha$ par exemple (Kim et al. 2007; 2014; Bouza et al. 2021) (cf paragraphe 3.4.2. $\text{Nav}\beta$ et signalisation par protéolyse intramembranaire régulée ou RIP).

3.4.1. $\text{Nav}\beta$ et molécules d'adhésion cellulaire

Comme vu dans le paragraphe 3.3.5. Fonctions canalaires et sous-unités $\text{Nav}\beta$, les sous-unités $\text{Nav}\beta$ régulent l'expression à la surface cellulaire des canaux Nav et la cinétique des courants Na^+ . Ces sous-unités appartiennent à la superfamille des **Ig-CAM** et possèdent un grand domaine extracellulaire (~129-141 acides aminés) et un plus court domaine C-terminal cytoplasmique (~34-44 acides aminés). Les sous-unités $\text{Nav}\beta 1$, $\text{Nav}\beta 2$ et $\text{Nav}\beta 4$ sont capables de former des interactions *trans* homophile (entre deux mêmes protéines situées sur des cellules différentes) et *trans* hétérophile (entre deux protéines différentes situées sur des cellules différentes) (McEwen et Isom 2004; W. Brackenbury et Isom 2011; Shimizu et al. 2016) *via* leurs boucles Ig-like en extracellulaire (Lori L. Isom 2002), permettant de médier l'adhésion cellule-cellule, et entraînant des agrégations cellulaires (figure 30A et B) (Jyoti Dhar Malhotra et al. 2000; Shimizu et al. 2016) ce qui ne semble pas être le cas pour $\text{Nav}\beta 3$. En effet, la structure cristalline publiée de $\text{Nav}\beta 3$ humain a révélé que le domaine extracellulaire forme un trimère pour une interaction *cis* homophile (entre mêmes protéines situées sur une même cellule) (Namadurai et al. 2015). Sur cette structure de $\text{Nav}\beta 3$, la surface du feuillet β , qui correspond à l'interface pour l'interaction *trans* homophile des autres $\text{Nav}\beta$, est située à l'intérieur de la structure trimérique, et ne peut donc pas interagir en *trans* avec une autre molécule $\text{Nav}\beta 3$ (figure 30B). Ainsi, la trimérisation de $\text{Nav}\beta 3$ expliquerait probablement l'absence d'interaction *trans* homophile (McEwen et al. 2009; Shimizu et al. 2016). La sous-unité $\text{Nav}\beta 3$, peut également se lier de manière homophile en *cis*, et de manière hétérophile en *trans* avec des neurofascines (C.F. Ratcliffe et al. 2001; Namadurai et al. 2015; Salvage, Huang, et Jackson 2020).

En effet, tout comme pour $\text{Nav}\beta 3$, les autres sous-unités $\text{Nav}\beta$ peuvent interagir avec plusieurs CAM comme des neurofascines mais également d'autres protéines de la matrice extracellulaire (tableau 2). Les domaines Ig-like des sous-unités $\text{Nav}\beta 1$ et $\text{Nav}\beta 2$ peuvent interagir en *trans*, mais l'association nécessite la présence d'une séquence dans la région cytoplasmique de $\text{Nav}\beta 2$ qui contient un site putatif de phosphorylation de la caséine kinase II (McEwen et Isom 2004). $\text{Nav}\beta 1$ interagit avec la contactine, la neurofascine-155, la neurofascine-186, NrCAM, la N-cadhérine (Kazarinova-Noyes et al. 2001; C.F. Ratcliffe et al. 2001; Jyoti Dhar Malhotra et al. 2000; Jyoti D. Malhotra et al. 2002; 2004; McEwen et Isom 2004). La ténascine et la contactine font partie des protéines sécrétées par les oligodendrocytes qui participent à la formation du pré-nœud qui accélèrent la vitesse de propagation des potentiels d'action. Les molécules d'adhésion cellulaire (CAM) (neurofascine, NrCAM, contactine) et les protéines d'ancrage au cytosquelette d'actine (ankyrines) sont les molécules situées dans les régions paranodales ou du nœud de Ranvier des neurones myélinisés, et assurent l'assemblage, le maintien et l'interaction entre la myéline et le neurone afin de générer et propager l'influx nerveux le long de l'axone (Freeman et al. 2016). Dans un système hétérologue, l'interaction entre $\text{Nav}\beta 1$ et la contactine, la neurofascine-186 ou $\text{Nav}\beta 2$ augmente le courant Na^+ (Kazarinova-Noyes et al. 2001; McEwen et Isom 2004), suggérant que l'adhésion dépendante de $\text{Nav}\beta 1$ peut réguler la fonction et l'excitabilité de la sous-unité $\text{Nav}\alpha$.

Les sous-unités $\text{Nav}\beta 1$ et $\text{Nav}\beta 2$ interagissent également avec la ténascine-R, molécule de la matrice extracellulaire sécrétée par les oligodendrocytes pendant la myélinisation (Xiao et al. 1999). $\text{Nav}\beta 2$ interagit aussi avec la ténascine-C (Srinivasan, Schachner, et Catterall 1998) mais n'interagit pas avec la contactine (McEwen et Isom 2004). La sous-unité $\text{Nav}\beta 2$ peut se lier en *trans* à la laminine extracellulaire, une CAM neuronale,

augmentant la migration, l'invasion et la croissance des cellules cancéreuses humaines issues d'adénocarcinome (Jansson et al. 2014). Concernant Navβ1B, il semblerait qu'elle ait le même motif Ig-like que Navβ1, et par conséquent des interactants similaires à Navβ1 (Patino et Isom 2010).

Du côté intracellulaire, les sous-unités Navβ1 et Navβ2 se lient comme dit précédemment à l'ankyrine G et l'ankyrine B, protéines faisant le lien entre la surface membranaire et le cytosquelette, et favorisent la liaison directe de l'ankyrine G à la sous-unité Nav1.2 (figure 30A) (McEwen et Isom 2004; Kaczmarek 2006; Pan et al. 2006). Enfin, la phosphorylation de Y181 de Navβ1 régulerait la distribution tissulaire de celle-ci et son interaction avec les autres protéines (cf paragraphe 3.2.1. Phosphorylation).

Enfin, peu d'interactants de Navβ4 sont connus (tableau 2). Il a été montré que Navβ4 peut interagir avec Navβ1 de façon *cis* hétérophile afin de moduler les propriétés biophysiques de Nav1.1 (Aman et al. 2009) et que l'interaction *trans* homophile de Navβ4 contribue à l'adhésion cellule-cellule (Shimizu et al. 2016).

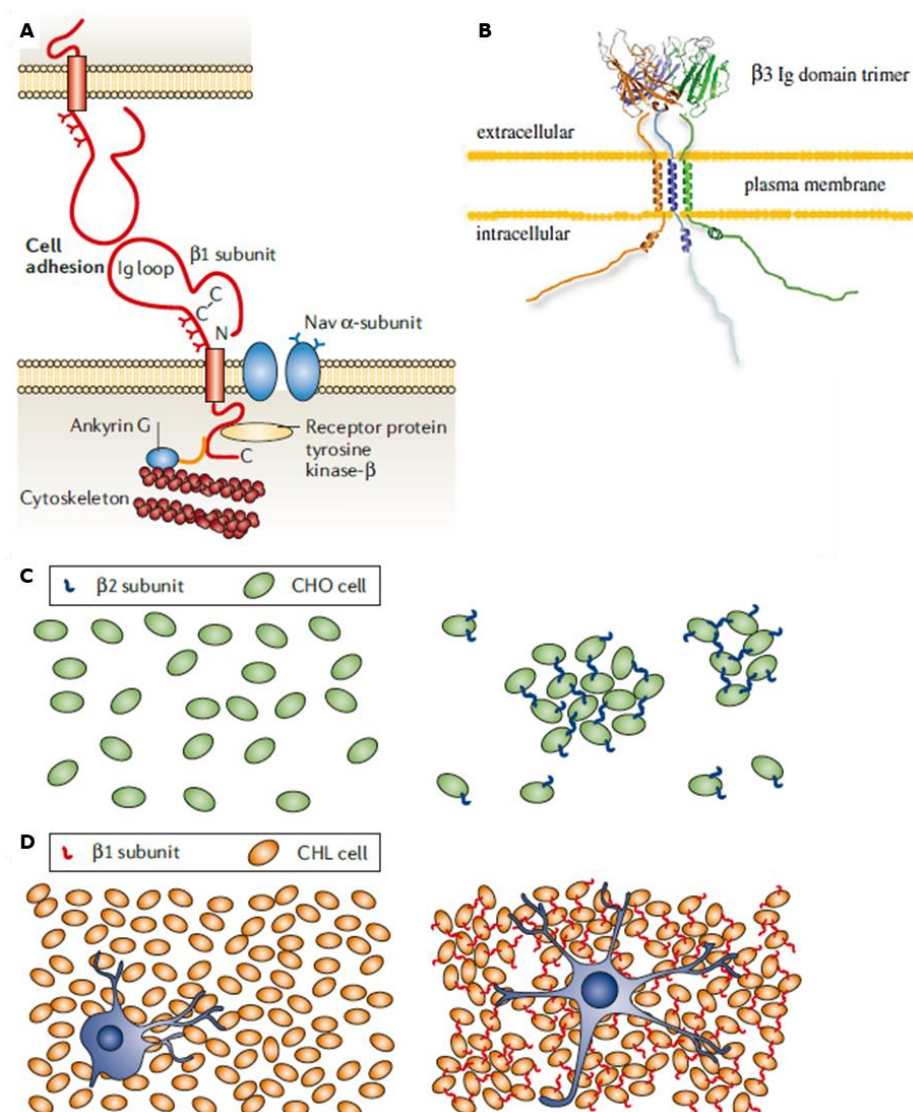


Figure 30 : Fonction d'adhésion cellulaire des sous-unités Navβ

(A) Navβ1 forme des interactions *trans* homophiles via les boucles Ig-like pour favoriser l'adhésion cellule-cellule. Navβ1 est liée au cytosquelette via la liaison de l'ankyrine G à leur domaine cytoplasmique. (B) Schéma issu de (Namadurai et al. 2015) de la forme trimérique de Navβ3. (C) Comparée aux cellules CHO non-transfectées (à gauche), la transfection de Navβ2 dans ces cellules augmente la formation d'agrégats cellulaires (à droite) via l'adhésion cellulaire médiée par Navβ2. (D) Des neurones granulaires en culture étendent leurs neurites sur une monocouche de cellules CHL (Chinese hamster lung) (à gauche). La longueur des neurites est significativement augmentée lorsque les cellules CHL surexpriment Navβ1 (à droite). Figure adaptée de (Kaczmarek 2006; Namadurai et al. 2015).

Isoforme	Interactants	Références
Navβ1	Navβ1, Contactine, Neurofascine-186, Ténascine-R, Ankyrine G, Ankyrine B, N-cadhérine, RPTKβ	(Charlotte F. Ratcliffe et al. 2000; Kazarinova-Noyes et al. 2001; C.F. Ratcliffe et al. 2001; Jyoti Dhar Malhotra et al. 2000; Jyoti D. Malhotra et al. 2002; 2004; McEwen et Isom 2004; Freeman et al. 2016)
Navβ2	Navβ2, Ténascine-R, Ténascine-C, Ankyrine G, Ankyrine B	(Srinivasan, Schachner, et Catterall 1998; Xiao et al. 1999; Jyoti Dhar Malhotra et al. 2000; McEwen et Isom 2004)
Navβ3	Navβ3, neurofascines	(C.F. Ratcliffe et al. 2001; Namadurai et al. 2015; Salvage, Huang, et Jackson 2020)
Navβ4	Navβ1, Navβ4	(Aman et al. 2009; Shimizu et al. 2016)

Tableau 2 : Liste des interactants décrits pour les sous-unités Navβ.

Finalement, les interactions entre les sous-unités Navβ et les molécules de la matrice extracellulaire pourrait jouer un rôle crucial dans la localisation des sous-unités α canaux Nav (par exemple à haute densité dans les nœuds de Ranvier) ou dans la régulation de l'activité des canaux Nav en fonction de leur localisation. L'ensemble de ces données suggèrent que même si les sous-unités Navβ ont une structure similaire, les structures de leur boucle Ig-like sont bien différentes, et leur confèrent des capacités diverses de transduction du signal intracellulaire.

3.4.2. Navβ et signalisation par protéolyse intramembranaire régulée (RIP pour *regulated intramembrane proteolysis*)

En 2005, il a été montré que les sous-unités Navβ étaient des substrats pour le clivage protéolytique par des enzymes de la famille des secretases (Wong et al. 2005). Les sous-unités Navβ peuvent être séquentiellement clivées : par la β-secretase **BACE1** (β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1) en extracellulaire, libérant le fragment N-terminal (ECD pour ExtraCellular Domain) ; puis par la **γ-secretase** en intracellulaire, formant un domaine intracellulaire soluble (ICD pour IntraCellular Domain) (de ~10 kDa) (figure 31) (Wong et al. 2005; Kim et al. 2005).

Parmi ces secretases, BACE1 est une protéase transmembranaire qui clive différents substrats, dont le plus connu est l'APP (amyloid precursor protein) qui à la suite du clivage génère le peptide Aβ (β-amyloid protein). Une élévation des niveaux d'expression de BACE1 et du peptide Aβ dans le parenchyme cérébral a été associée à la maladie d'Alzheimer tandis que la présence du peptide Aβ dans le plasma est associée à la progression de maladies des petits vaisseaux cérébraux (H. Zhou et al. 2022). BACE1 semble reconnaître préférentiellement les résidus hydrophobes comme la leucine (pour Navβ1 Navβ2 et Navβ4) ou la phénylalanine (pour Navβ3) (Wong et al. 2005). Le travail de Wong en 2005 a montré que les séquences adjacentes au domaine transmembranaire sur chaque sous-unité Navβ contiennent un ou plusieurs sites de clivage de BACE1 ainsi que de la γ-secretase, et que

le ECD des sous-unités Nav β semblerait libéré de manière similaire à celui du peptide A β . Cependant, l'absence de BACE1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris ainsi que dans le cerveau de souris n'a pas complètement abolit la production de fragments peptidiques et conduit seulement à une réduction de la production du ICD de Nav β (Wong et al. 2005) suggérant que d'autres protéases, telles que BACE2 (Farzan et al. 2000, 2; Hussain et al. 2000), pourraient également cliver les Nav β sur le même site (ou sur un site très proche).

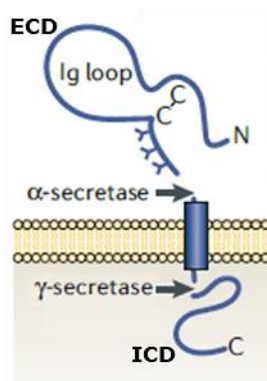


Figure 31 : Clivage protéolytique des sous-unités Nav β

Toutes les sous-unités Nav β subissent une protéolyse constitutive dans les neurones. La sous-unité Nav β est clivée séquentiellement par une α -secretase libérant le domaine extracellulaire (ECD), puis par une γ -secretase clivant le domaine C-terminal intracellulaire (ICD). Figure adaptée de (Kaczmarek 2006).

Ce qui est intéressant, c'est que ces fragments clivés ne sont pas seulement de simples produits de dégradation mais possèdent de véritables activités biologiques d'où le terme **RIP** pour « regulated intramembrane proteolysis » ou **protéolyse intramembranaire régulée**. Ceci a été montré pour les ECD solubles de Nav β 1 et Nav β 4, tout comme le variant d'épissage soluble Nav β 1B, qui favorisent la croissance des neurites (prolongements cytoplasmiques d'un neurone) (figure 30D) (Davis, Chen, et Isom 2004; Miyazaki et al. 2007; Patino et Isom 2010). Concernant la sous-unité Nav β 4, il a été suggéré que le clivage par BACE1 induit la formation d'un ICD soluble de Nav β 4, qui régule la longueur des neurites et la densité de protrusions de type filopode dans les neurones (Miyazaki et al. 2007). Contrairement à la forme entière de Nav β 1, le ICD de Nav β 1 ne permet pas d'induire la croissance de cellules cancéreuses MDA-MB-231 (Haworth et al. 2022). Par une étude transcriptomique sur des cellules hétérologues (CHL) surexprimant le ICD de Nav β 1 humain comparées à des cellules contrôles, une analyse ontologique a permis de mettre en évidence que le ICD de Nav β 1 pourrait être associé aux fonctions biologiques de l'adhésion, de la prolifération cellulaire et de la réponse immunitaire entre autres (Bouza et al. 2021). De plus, il a été suggéré que le ICD de Nav β 2, issu du clivage par BACE1 et la γ -secretase, serait nécessaire pour l'adhésion transcellulaire et la migration cellulaire (Kim et al. 2005). Aujourd'hui, excepté dans l'étude de Wong et al., aucune étude n'évoque le ICD de Nav β 3 (Wong et al. 2005).

Les Nav β 1-ICD et Nav β 2-ICD issus du clivage protéolytique par les secretases peuvent être transloqués dans le noyau et moduler la transcription et donc réguler l'expression de certains gènes dont ceux codant pour les sous-unités Nav α (Kim et al. 2007; Bouza et al. 2021; Haworth et al. 2022). Étant donné que ni le ICD de Nav β 1 ni le ICD de Nav β 2 ne contiennent de domaine de liaison à l'ADN, un ou plusieurs partenaires de liaison semblent être nécessaires pour servir d'intermédiaire afin d'effectuer leurs effets sur l'expression génique, comme c'est le cas pour le NICD (Notch-1 Intracellular Domain) et l'AICD (APP Intracellular Domain), où les fragments solubles intracellulaires s'associent avec des partenaires protéiques pour former un complexe activateur/modulateur de la

transcription (Cao et Südhof 2001; Bray et Gomez-Lamarca 2018; Bouza et al. 2021; Haworth et al. 2022). Dans le travail de Kim *et al.*, le ICD de Nav β 2 augmente l'expression transcriptionnelle de *Scn1a* et le niveau d'expression protéique de la sous-unité Nav1.1 dans les cellules de neuroblastome de rat (Kim et al. 2007). L'expression augmentée de Nav1.1 associée au clivage de Nav β 2 est localisée à l'intérieur des cellules, et est associée à une diminution de la densité de courant I_{Na} à la surface cellulaire (Kim et al. 2007). Dans le travail de Bouza *et al.*, le ICD de Nav β 1 humain réprime l'expression de *Scn3a* mais augmente l'expression de *Scn4a* et *Scn5a* dans des cellules hétérologues (CHL) (Bouza et al. 2021). Dans le travail d'Haworth *et al.* de l'équipe de Lori L. Isom, le ICD de Nav β 1 (séquence du rat) augmente le niveau transcriptionnel de *SCN1A* et *SCN9A* et réprime l'expression de *SCN3A* et *SCN8A* dans les cellules humaines de carcinome mammaire MDA-MB-231 (Haworth et al. 2022). D'après ces travaux, il n'existe donc pas encore de consensus quant au rôle de ces fragments ICD dans la régulation transcriptionnelle des sous unités Nav α .

Enfin, le travail de Haworth *et al.* a montré que la localisation de Nav β 1 (totale) était principalement intracellulaire (particulièrement dans le RE et les vésicules endo/lysosomales) tandis que le ICD de Nav β 1 a été retrouvé dans le noyau et les endosomes (Haworth et al. 2022). Finalement, ils ont montré que le ICD de Nav β 1 semble être capable d'induire les mêmes effets électrophysiologiques que la forme entière de Nav β 1 sur le courant Na⁺ dans les cellules humaines MDA-MB-231. Ces résultats récents sont « intrigants » car ils suggèrent qu'une protéine d'adhésion membranaire serait finalement principalement localisée dans des vésicules intracellulaires tout en conservant la capacité de réguler les propriétés d'activation et d'inactivation du courant Na⁺ (Haworth et al. 2022).

3.4.3. Nav β et développement

La régulation de la croissance des neurites et de la migration par les sous-unités Nav β ont des conséquences sur le développement et l'**organogenèse**. En particulier Nav β 1 qui joue un rôle clé dans la formation des réseaux neuronaux lors du développement post-natal (Sutkowski et Catterall 1990; Sashihara et al. 1995; W. J. Brackenbury et al. 2008). Les souris déficientes en *Scn1b* ont un phénotype neurologique sévère incluant un retard de croissance, une ataxie, une arythmie cardiaque, des crises convulsives spontanées dès le 8^{ème} jour, et meurent prématurément à 21 jours (C. Chen et al. 2004). L'hypothèse est que l'absence de la sous-unité Nav β 1 perturbe les interactions et l'adhésion transcellulaire neuronale menant à des connexions cérébrales aberrantes, résultant en une hyperexcitabilité neuronale et la genèse de crises épileptiques (C. Chen et al. 2004; Lopez-Santiago et al. 2007).

Comme évoqué précédemment, les sous-unités Nav β permettent aux canaux Nav de former un lien physique entre le cytosquelette et la surface des cellules voisines. Dans le développement neuronal, ces interactions sont susceptibles de contribuer à la formation des segments initiaux des axones et des nœuds de Ranvier, où les canaux Nav s'accumulent à haute densité. Les sous-unités Nav β pourrait également avoir un rôle indépendamment de la sous-unité Nav α dans l'organisation des réseaux neuronaux.

La présence de Nav β 1 dans le milieu (ECD de Nav β 1 ou variant d'épissage soluble Nav β 1B) ou dans le substrat (sur la monocouche de cellules hétérologues (CHL)) stimule la croissance des neurites des neurones granulaires de cervelet murin (figure 30D), *via* une interaction *trans* homophile grâce à la boucle Ig-like de Nav β 1 (T. H. Davis, Chen, et Isom 2004). En revanche, ni Nav β 2 ni Nav β 4 ne favorisent la croissance des neurites dans ce modèle (T. H. Davis, Chen, et Isom 2004). La sous-unité Nav β 2 semble réduire la longueur des neurites, mais

cet effet peut être contrée par la co-expression avec soit la sous-unité Nav1.2 ou la sous-unité Navβ1 (T. H. Davis, Chen, et Isom 2004). La sous-unité Navβ4 permet l'extension des neurites dans les cellules de neuroblastomes, et augmente la densité d'épines dendritiques dans les neurones de l'hippocampe (Oyama et al. 2006; Miyazaki et al. 2007).

Même s'il reste à déterminer si ces événements sont influencés par l'activité de conduction des sous-unités Navα des canaux Nav, ces études suggèrent que les fonctions non canoniques de la sous-unité Navβ des canaux Nav peuvent être des éléments organisationnels importants au cours du développement neuronal.

3.5. Canalopathies et physiopathologies associées aux sous-unités Navβ

Les canalopathies sont l'ensemble des maladies associées au dysfonctionnement des canaux ioniques. Des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités Navβ sont associées à un grand nombre de canalopathies, incluant des arythmies cardiaques (le syndrome de mort subite et le syndrome de mort subite du nourrisson) ainsi que l'épilepsie (O'Malley et Isom 2015). De plus, des modulations d'expression des sous-unités Navβ peuvent avoir un impact sur la douleur, la démyélinisation, les désordres neurodégénératifs, les cancers, et les troubles de l'humeur (O'Malley et Isom 2015). Certaines mutations associées à ces pathologies sont présentées ci-dessous sur les structures protéiques des sous-unités Navβ dans la figure 32 et dans les tableaux 3 et 4.

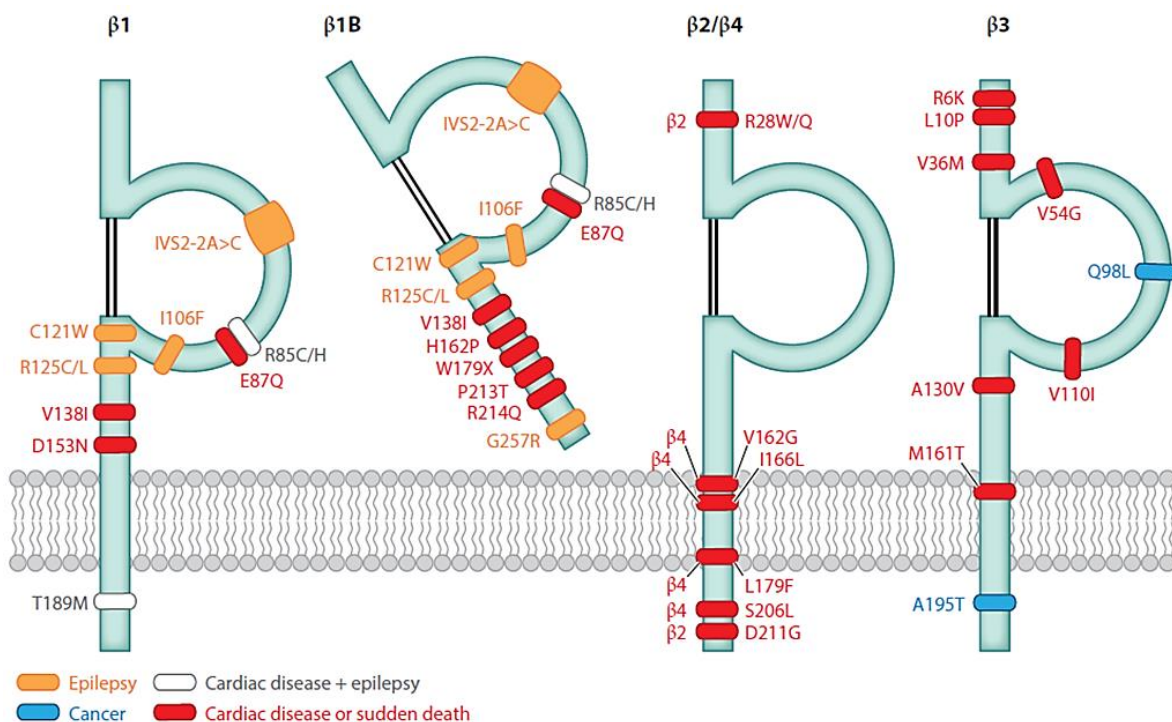


Figure 32 : Schéma des sites de mutations des sous-unités Navβ

Les acides aminés mutés sont représentés sur chaque sous-unité Navβ. Les pathologies associées sont classées en quatre catégories : épilepsie (orange), pathologie cardiaque et épilepsie (blanc), pathologie cardiaque ou mort subite (rouge), et cancer (bleu). Figure issue de (O'Malley et Isom 2015).

3.5.1. Arythmies cardiaques

Les arythmies cardiaques sont des anomalies qui affectent la fréquence cardiaque. Le **syndrome de Brugada** est une canalopathie responsable de troubles du rythme cardiaque. Ce syndrome est caractérisé par un sus-décalage du segment ST avec un aspect en dôme, suivi d'une onde T négative (dans les dérivations droites V1, V2) visible sur l'électrocardiogramme (ECG), associé à un risque de mort subite par fibrillation ventriculaire (Brugada et Brugada 1992). Le **syndrome du QT long** est caractérisé par un retard de repolarisation du potentiel d'action cardiaque, mesuré par l'allongement de l'intervalle QT sur un ECG, entraînant un risque plus élevé de fibrillations ventriculaires et par conséquent de mort subite (Giudicessi et Ackerman 2013). Les mutations dans les gènes codant pour les sous-unités Nav β sont associées à une perte de fonction dans le syndrome de Brugada alors que les mutations associées au syndrome du QT long sont des gains de fonction. Ces effets pathologiques des sous-unités Nav β semblent être associés à une modulation de la régulation d'expression ou d'activité des sous-unités Nav α . La **mort subite** ou inattendue du nourrisson, est le décès incompréhensible à première vue et imprévisible, le plus souvent pendant le sommeil, d'un nourrisson âgé entre 0 et 24 mois, qui semblait en bonne santé apparente.

Pathologies	Gènes	Mutations	Références
Syndrome de Brugada	<i>SCN1B</i>	p.E87Q, p.D153N, p.H162P (Nav β 1B), p.W179X (Nav β 1B), p.R85H(Nav β 1B), p.R214Q (Nav β 1B)	(Hiroshi Watanabe et al. 2008; 2009; Olesen et al. 2011; Holst et al. 2012; D. Hu et al. 2012)
	<i>SCN2B</i>	p.D211G, p.R28W, p.R28Q	(Hiroshi Watanabe et al. 2009; Riuró et al. 2013)
	<i>SCN3B</i>	p.L10P, p.V110I, p.V54G, p.R6K, p.L10P, p.M161T, p.A130V	(D. Hu et al. 2009; Valdivia et al. 2010; P. Wang et al. 2010; Olesen et al. 2011; Ishikawa et al. 2013)
	<i>SCN4B</i>	p.V162G, p.I166L	(R.-G. Li et al. 2013)
Syndrome du QT long	<i>SCN1B</i>	p.P213T (Nav β 1B)	(Riuró et al. 2013)
	<i>SCN4B</i>	p.L179F	(D. W. Wang et al. 1996; Medeiros-Domingo et al. 2007)
Mort subite du nourrisson	<i>SCN1B</i>	p.R214Q (Nav β 1B)	(D. Hu et al. 2012)
	<i>SCN3B</i>	p.V36M, p.V54G	(Tan et al. 2010) (Valdivia et al. 2010)
	<i>SCN4B</i>	p.S206L	(Medeiros-Domingo et al. 2007; Tan et al. 2010)

Tableau 3 : Résumé des mutations dans les gènes des sous-unités Nav β et des pathologies cardiaques associées.

3.5.2. Epilepsie

L'épilepsie est caractérisée par une activité électrique aberrante (ou perturbée) dans le cerveau, entraînant des crises qui sont récurrentes et spontanées (non provoquées) (Fisher et al. 2014). Les gènes codant les canaux Nav sont impliqués dans de multiples formes d'encéphalopathies épileptiques.

Le **syndrome de Dravet**, ou épilepsie myoclonique sévère de l'enfance, est une forme complexe d'épilepsie caractérisée par une encéphalopathie épileptique pédiatrique génétique (Dravet 2011). Les crises débutent dans la première année de vie sous la forme de convulsions cloniques fébriles généralisées ou unilatérales, et se transforment en convulsions myocloniques afébriles récurrentes d'origines multiples (généralement pharmaco résistantes). Les patients atteints présentent un retard de développement précoce, une déficience cognitive intellectuelle, des troubles de la personnalité, des troubles du sommeil, une ataxie, et un haut risque de mort

subite (Dravet 2011). La majorité des mutations sur *SCN1B* induisant une épilepsie sont identifiées et les effets pathologiques semblent être dépendants de la modulation de l'expression ou de l'activité (propriétés électrophysiologiques) des sous-unités Nav α , exceptée p.G257R, placée dans la boucle Ig-like, qui suggère que les fonctions d'adhésion cellulaire de Nav β 1B modulées sont cliniquement pertinentes et que les effets pathologiques ne dépendent donc pas ici de l'expression et/ou de l'activité des sous-unités Nav α .

Pathologies	Gènes	Mutations	Références
Syndrome de Dravet	<i>SCN1B</i>	p.R125C, p.I106F,	(Patino et al. 2009) (Ogiwara et al. 2012)
Autres formes d'épilepsie	<i>SCN1B</i>	p.R85C, p.R85H, p.R125L, IVS2-2A>C, p.C121W, p.G257R (Nav β 1B)	(Wallace et al. 1998; Audenaert et al. 2003; Scheffer et al. 2007; 2010; Fendri-Kriaa et al. 2011; Patino et al. 2011)

Tableau 4 : Résumé des mutations dans les gènes des sous-unités Nav β et des formes d'épilepsie associées.

Le gène *SCN3B* fait partie des gènes dont l'expression est régulée dans l'hippocampe des patients atteints d'**épilepsie du lobe temporal** (LTE) sans sclérose de l'hippocampe (van Gassen et al. 2009). En effet, le niveau d'expression de la sous-unité Nav β 3 dans l'hippocampe des patients atteints de LTE sans sclérose de l'hippocampe est très nettement diminué par rapport aux sujets sains, alors qu'un gain d'expression est observé dans l'hippocampe des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal avec sclérose hippocampique (van Gassen et al. 2009). La modification d'expression de *SCN3B* peut intervenir dans la modulation de l'excitabilité des sous-unités Nav α , par conséquent les effets pathologiques observés seraient le reflet de la modulation des propriétés électrophysiologiques des sous-unités Nav α .

3.5.3. Douleur

La douleur neuropathique peut être causée par une mutation génétique ou une lésion nerveuse, entraînant une sensation de douleur extrême ou l'allodynie, chez les individus en raison de **perturbations de la nociception**, les voies neuronales impliquées dans la sensation de stimuli nocifs. Les sous-unités Nav β sont exprimées dans plusieurs types de cellules impliquées dans la nociception, y compris les neurones des DRG et les nerfs périphériques. Des études suggèrent l'implication des sous-unités Nav β dans la nociception. En effet, les neurones des DRG dépourvus de Nav β 1 sont hyperexcitables (Lopez-Charcas et al. 2021). Bien que la létalité post-natale précoce de ces souris complique les tests comportementaux de douleur, les neurones hyperexcitables des DRG de ces souris peuvent augmenter leur sensibilité à la stimulation entraînant une allodynie. Le rôle de Nav β 2 dans la nociception a également été exploré. L'expression de Nav β 2 augmente suite à une lésion nerveuse et cette expression est nécessaire au développement de l'allodynie mécanique dans un modèle de rongeur (Pertin 2005). L'expression de Nav β 2 est régulée positivement dans un modèle de douleur neuropathique chronique chez le rat (Shah et al. 2000). Enfin, l'expression de Nav β 3 est augmentée dans les neurones sensoriels en condition d'hyperalgésie ou dans un modèle de douleur neuropathique (lésion constitutive chronique du nerf : ligature du nerf sciatique) (Shah et al. 2000). De plus, l'expression des sous-unités Nav β 1 et Nav β 2 est diminuée dans les neurones sensoriels humains après une lésion (par avulsion ou arrachement) de la racine vertébrale (ensemble de nerfs qui émergent de la moelle épinière), alors que l'expression de Nav β 3 est augmentée. Il semble donc que l'expression de Nav β 3 soit régulée différemment de Nav β 1 et Nav β 2 dans les neurones sensoriels (M. A. Casula et al. 2004). Ces résultats suggèrent que les sous-unités Nav β potentiellement *via* la modulation des propriétés

électrophysiologiques des sous-unités Nav α , jouent un rôle dans la nociception et sont des cibles thérapeutiques potentielles dans la douleur neuropathique.

3.5.4. Maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques et la maladie de Huntington, se caractérisent par une perte progressive de la fonction neuronale au fil du temps et impliquent souvent la mort des cellules neuronales. L'accumulation de Na⁺ intra-axonaux entraînant une surcharge en Ca²⁺ est un mécanisme proposé pour la perte axonale et la mort cellulaire dans les maladies neurodégénératives, suggérant un lien potentiel entre les canaux Nav et la **neurodégénérescence** (Waxman 2006). L'inhibition pharmacologique des canaux Nav est neuroprotectrice dans l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), un modèle de la sclérose en plaques (Lo, Black, et Waxman 2002; Lo et al. 2003). Ce résultat suggère qu'une réduction du courant I_{Na} pourrait être un mécanisme général de neuroprotection. Les souris déficientes en *Scn2b* présentent une densité de courant Na⁺ réduite dans les neurones du SNC et SNP, probablement liée à la modulation des propriétés électrophysiologiques des sous-unités Nav α . Ainsi, il a été émis l'hypothèse que ces souris pourraient afficher une protection contre la neurodégénérescence (C. Chen et al. 2002; Lopez-Santiago et al. 2007). En utilisant le modèle EAE, il a été démontré que les souris déficientes en *Scn2b* ont des taux de survie plus élevés et des taux de progression symptomatique plus faibles par rapport aux souris contrôles (O'Malley et al. 2009). Cette découverte a soulevé la possibilité qu'en plus des sous-unités Nav α , Nav β 2 et éventuellement d'autres sous-unités Nav β , puissent être des cibles pour un traitement thérapeutique dans les maladies neurodégénératives.

L'expression de Nav β 4 est diminuée dans le striatum des patients atteints de la maladie de Huntington (Oyama et al. 2006). Cependant, la perte d'expression de Nav β 4 pourrait être une des causes ou un effet secondaire de la pathologie. Un rapport récent portant sur la maladie de Parkinson a identifié Nav β 4 glycosylée dans le liquide céphalo-rachidien du patient (T. Zhou et al. 2012), suggérant que le domaine extracellulaire de Nav β 4 pourrait être libéré dans le SNC au cours du développement de la maladie, et avoir un rôle indépendamment des sous-unités Nav α . Des preuves supplémentaires sont nécessaires pour définir de l'implication de Nav β 4 dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives. À l'heure actuelle, la possibilité que le clivage protéolytique altéré de Nav β 4 soit un sous-produit secondaire de la progression de la maladie ne peut être exclue. Même si Nav β 4 n'est pas directement impliqué dans le mécanisme de la maladie, le potentiel de son utilité en tant que biomarqueur peut être envisagé.

3.5.5. Cancer

L'implication des canaux Nav (sous-unités α et β) dans la biologie du cancer a été démontré initialement dans les travaux de Mustafa B. A. Djamgoz et William J. Brackenbury de l'Imperial College London au début des années 2000. Aujourd'hui, de nombreuses publications montrent un rôle important des canaux Nav dans le développement des cancers et les processus métastatiques (Haworth et Brackenbury 2019; Lopez-Charcas et al. 2021).

Nav β 1 semble avoir une influence négative (oncogénique) sur le comportement cellulaire *in vitro* en augmentant la prolifération et le potentiel invasif des cellules cancéreuses ainsi que l'adhésion transcellulaire, tout en accélérant la migration cellulaire, favorisant la croissance tumorale et métastatique par une augmentation de la

résistance à l'apoptose (J. K. J. Diss et al. 2008; Chioni et al. 2009; Nelson et al. 2014; Bon et al. 2016; Shih et al. 2017; Sanchez-Sandoval et Gomora 2019). L'expression de **Navβ2** est augmentée dans lignées cellulaires de cancer de la prostate fortement métastatiques et est corrélée à une augmentation de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses, et de la croissance tumorale *in vitro* mais pas *in vivo* (Jansson et al. 2012; 2014). Ces résultats suggèrent que la contribution fonctionnelle oncogénique de Navβ2 pourrait être spécifique au site ou au stade de la progression du cancer (Jansson et al. 2012; 2014).

Contrairement à Navβ1 et Navβ2, il semble que **Navβ3** et Navβ4 soient considérées comme des suppresseurs de tumeurs. Le promoteur du gène *SCN3B* (codant pour Navβ3) contient des éléments de réponse de P53, facteur de transcription induisant un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose en réponse à un stress cellulaire. De plus, des dommages de l'ADN induit par l'adriamycine (ou doxorubicine, agent de chimiothérapie) augmentent l'expression de *SCN3B* dans des fibroblastes embryonnaires de souris, et Navβ3 supprime la formation de colonies dans des lignées cellulaires de l'ostéosarcome et du glioblastome (Adachi et al. 2004). Il est donc suggéré que Navβ3 intervient dans la voie de signalisation apoptotique dépendante de P53. De plus, un screening à haut débit d'échantillons provenant de patients atteints de cancer colorectal à un stade avancé a identifié deux mutations faux-sens hétérozygotes distinctes dans *SCN3B* : p.Q89L et p.A195T (Sjöblom et al. 2006).

La diminution de l'expression de **Navβ4** est retrouvée dans plusieurs types de cellules cancéreuses (Lopez-Charcas et al. 2021). Cette perte d'expression de Navβ4 est en lien avec un comportement migratoire et invasif des cellules cancéreuses, médié par l'activation de la RhoA GTPase (J. K. J. Diss et al. 2008; Bon et al. 2016; Gong et al. 2018; Sanchez-Sandoval et Gomora 2019) tandis que l'expression de Navβ4 est associée à la suppression de l'invasion de cellules cancéreuses du cancer de l'utérus (Sanchez-Sandoval et Gomora 2019). Navβ4 apparait donc comme un gène suppresseur de tumeur et métastase *in vivo* (Bon et al. 2016).

Ainsi, malgré des similarités structurales, les sous-unités Navβ ont des degrés d'expression et des effets différents voire opposés dans les cellules cancéreuses, qui semblent être indépendants des sous-unités Navα. La relation structure-fonction et l'implication physiopathologique de chacune des sous-unités Navβ dans le cancer restent donc encore à mieux comprendre.

Ainsi, les mutations dans les gènes codant les sous-unités Navβ sont liées à une multitude de canalopathies incluant l'épilepsie, des syndromes de morts subite, des arythmies cardiaques. De plus, des changements dans l'expression des sous-unités Navβ peuvent être impliqués dans la douleur, les maladies neurodégénératives, le cancer.

3.6. Canaux Nav dans les cellules vasculaires

L'expression et l'activité des canaux Nav ont été mises en évidence à la fois dans les CMLV et les CE vasculaires. La relation entre la présence des canaux Nav, leur activité et leur implication dans les fonctions des CMLV et des CE (réponse au shear stress, prolifération, mécanosensibilité) sont peu décrits dans la littérature et sont détaillés dans les paragraphes suivants.

3.6.1. Expression et fonction des canaux Nav dans les CMLV

Les canaux Nav sont exprimés et génèrent des courants Na⁺ dans les CMLV isolées de l'aorte, artères pulmonaires, mésentériques, coronaires, utérines et crémaster (Boccaro et al. 1999; Platoshyn et al. 2005; Fort et al. 2009;

Ho et al. 2013). Différentes isoformes des sous-unités Nav α (Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.9) ont été retrouvées dans les CMLV et leur distribution ne s'avère pas localisée de façon tissu spécifique. Concernant les sous-unités Nav β , leur expression et rôle dans les CMLV sont très peu décrits dans la littérature. L'expression transcriptionnelle de *Scn1b* et *Scn4b* ont été identifiés dans l'aorte de rat et les artères utérines humaines (Fort et al. 2009; Virsolvy et al. 2021), *Scn1b* et *Scn3b* dans la média de l'aorte de rat (Fort et al. 2009) alors que tous les transcrits des sous-unités Nav β sont détectés dans les artères utérines et les CMLV fraîchement isolées. L'expression de *SCN1B* et *SCN2B* a été montrée dans des CMLV cultivées d'artères pulmonaires humaines (Platoshyn et al. 2005).

L'expression des canaux Nav fonctionnels a été démontrée initialement par patch-clamp. Des courants Na⁺ dépendants du potentiel ont été enregistrés dans des CMLV de différents types de vaisseaux sanguins (artères de conductance et artères de résistance). Dans les artères de conductance, les canaux Nav seraient à l'état ouvert au potentiel de repos et contribueraient à la dépolarisation du myocyte. Ainsi ils participeraient au potentiel de repos, mais pas à la genèse des potentiels d'action. Concernant les artères de résistance, caractérisées par une réactivité importante, le dialogue entre les canaux Nav et les échangeurs NCX est important pour la régulation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire (Boccaro et al. 1999; Ho et al. 2013) intervenant ainsi dans la régulation de la contraction des artères. Leur implication dans la contractilité vasculaire a été démontrée dans les artères mésentériques de rat (Ho et al. 2013).

La présence des canaux Nav, leur activité et leur implication dans les fonctions de la CMLV pourraient donc réguler le tonus vasculaire et par conséquent être impliquées dans les processus pathologiques.

3.6.2. Mises en évidence et caractérisation électrophysiologique dans les CE

La présence de canaux Nav dans les CE d'artères a été mise en évidence la première fois par la mesure de courants Na⁺ dépendants du potentiel et TTX-résistants en patch-clamp sur des CE isolées d'artères interlobaires de rat (Gordienko et Tsukahara 1994). Les mêmes courants Na⁺ dépendants du potentiel TTX-résistants ont également été observés dans les CE de la veine saphène de l'homme et de veine ombilicale humaine par électrophysiologie (Gosling et al. 1998; Andrikopoulos et al. 2011). L'expression des canaux Nav a été confirmée par analyse histochimique dans l'intima de veines saphènes et a été consolidée par des analyses d'expression transcriptionnelle (par RT-PCR) et protéique (par Western-Blot) permettant d'identifier l'isoforme Nav1.5, résistant à la TTX, et prépondérant dans le tissu cardiaque (Gosling et al. 1998). Cependant, seulement 57% des CE dissociées issues de veines saphènes humaines et 40% des CE issues de veines ombilicales humaines (HUVEC), ont présenté des courants Na⁺ (Gosling et al. 1998; Andrikopoulos et al. 2011). Deux études décrivent des courants Na⁺ dans les HUVEC (Traub et al. 1999; Andrikopoulos et al. 2011) mais l'expression des isoformes des canaux Nav est différente : Nav1.4 et Nav1.6 sont détectées dans (Traub et al. 1999) alors que les isoformes Nav1.5 (majoritaire), Nav1.6 et Nav1.7 sont détectées dans (Andrikopoulos et al. 2011). La présence des isoformes Nav1.2, Nav1.6 et Nav1.9 sont quant à elles détectées dans des CE d'artérioles de crémaster de rat (X. F. Figueroa et al. 2007).

3.6.3. Relation entre activité des canaux Nav et fonction des CE

L'implication des canaux Nav des CE dans le tonus myogénique a été montré pour la première fois en 2007 (X. F. Figueroa et al. 2007). L'inhibition des canaux Nav par des molécules telles que la TTX ou la bupivacaïne atténue l'onde de vasodilatation observée le long des artérioles de crémaster induite par stimulation électrique. La propagation de cette onde de vasodilatation dépend de l'intégrité de l'intima. Les canaux Nav exprimés au niveau des CE du réseau artériolaire de crémaster, permettraient de potentialiser l'activation des canaux Cav et le flux entrant de Ca^{2+} résultant activerait la eNOS et donc la libération de NO (X. F. Figueroa et al. 2007).

Les canaux Nav sont donc bien exprimés et leur activité canalaire semble fonctionnelle dans les CE. Ils participeraient à la régulation du potentiel de membrane de ces cellules et leur activité semble importante dans la réponse au stress hémodynamique. Cependant, peu d'études décrivent leur rôle et leur implication potentielle dans des mécanismes physiopathologiques en relation avec des mutations de gènes des canaux Nav.

Lors d'un stress hémodynamique, tel qu'un shear stress, l'activation de la voie de signalisation des MAP kinases, faisant intervenir les kinases ERK1/2, est une étape essentielle des mécanismes de réponse des CE (cf paragraphe 2.3.2. MAP Kinases). Traub a montré que remplacer le Na^+ extracellulaire (par du N-méthyl-D-glucamine (NMDG) ou du chlorure de choline) ou inhiber les canaux Nav avec la TTX (100 nM) augmente la phosphorylation de ERK1/2 et donc son activation en réponse à un shear stress dans les HUVEC (Traub et al. 1999). A l'inverse, la vératridine (100 nM), activateur des canaux Nav, inhibe l'activation de ERK1/2 par le shear stress dans les HUVEC. De même, dans les cellules CHO surexprimant Nav1.2 (séquence du rat) soumises à un shear stress l'activation de la voie ERK1/2 ne se met pas en place comparées aux cellules contrôles. Une solution extracellulaire sans Na^+ ou contenant de la TTX, réverse cette inhibition, et active la voie ERK1/2 en réponse à un shear stress (Traub et al. 1999). Cela suggère que l'activation de ERK1/2 médiée par le shear stress est inhibé par le Na^+ extracellulaire et que ce transport ionique s'effectue par les canaux Nav qui répriment la réponse des CE au shear stress (figure 33).

Dans une étude en 2011, Andrikopoulos et al. a montré que les HUVEC expriment majoritairement les isoformes Nav1.5 et Nav β 1, et faiblement Nav1.7 et Nav β 3, au niveau transcriptionnel (Andrikopoulos et al. 2011). Ces canaux Nav induisent un courant Na^+ dépendant du potentiel bloqué par la TTX, ils sont donc présents à la membrane plasmique et ont une fonction canalaire dans les HUVEC. La TTX à 1 μM stimule l'adhésion mais inhibe la tubulogenèse des HUVEC, tandis que à de plus faibles concentrations (200 nM) la TTX inhibe la migration stimulée par le VEGF (Andrikopoulos et al. 2011). Il semble donc que la migration des CE soit dépendante de Nav1.7 (TTX-sensible) et non de Nav1.5 (TTX-résistant) alors que pour l'adhésion et la tubulogenèse, les 2 isoformes semble être impliquées. Le VEGF stimule la prolifération des HUVEC *via* la voie de signalisation dépendante du Ca^{2+} et de ERK1/2. En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des différents acteurs de cette voie de signalisation, les auteurs ont montré que la TTX à de fortes concentrations (10-20 μM) réduit de façon significative la stimulation de la prolifération induite par le VEGF, *via* la diminution de la phosphorylation de ERK1/2. Ces résultats ne sont pas en accord avec l'étude de Traub et al qui montre que la TTX augmente la voie ERK1/2 lors d'un shear stress (Traub et al. 1999). Ici, l'activité des canaux Nav1.5 apparait nécessaire pour induire l'activation de ERK1/2 par le VEGF, par une voie impliquant l'activation de la PKC α et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Le modèle mécanistique proposé serait 1) l'activité des canaux Nav1.5 est un élément crucial de contrôle

du potentiel membranaire important dans la modulation de l'influx Ca^{2+} dans les CE, 2) l'influx de Ca^{2+} intervient par le NCX en mode inverse, 3) l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire permet l'activation de la PKC α activant la voie RAF-MEK-ERK1/2 (figure 33). Ce modèle place les canaux Nav et le NCX en tant que régulateurs du potentiel membranaire et de l'activité des voies de signalisation de la CE. Ces deux partenaires n'étant pourtant pas en interaction dans les CE (Andrikopoulos et al. 2011), constitueraient des éléments clés dans les réponses au stress hémodynamique.

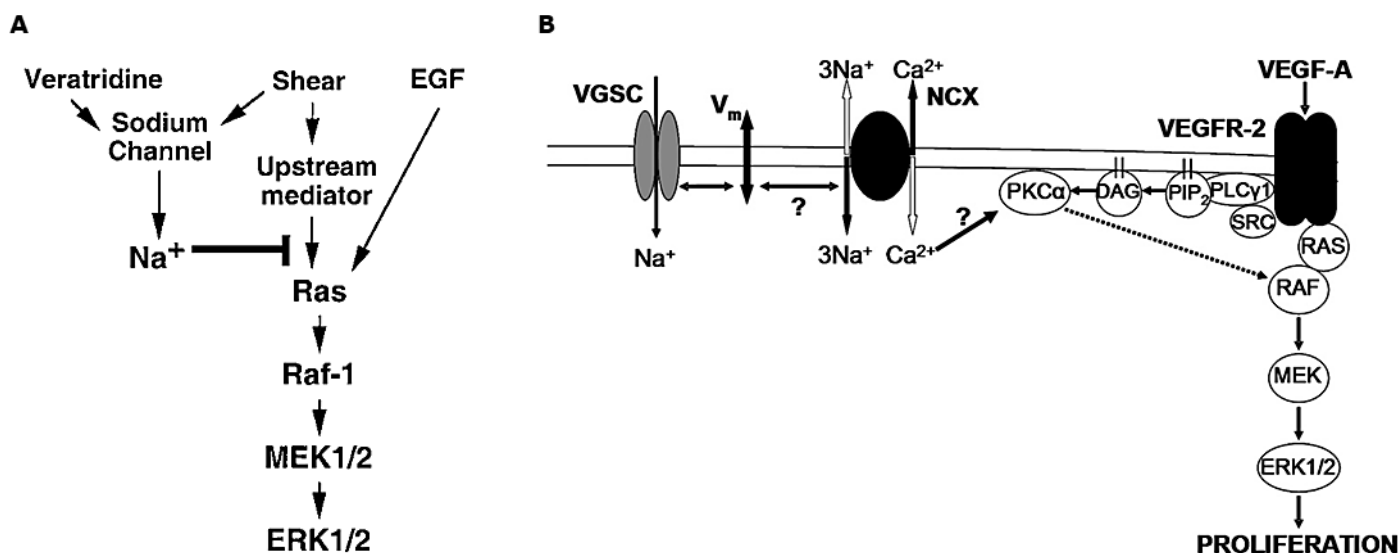


Figure 33 : Représentations schématiques de l'implication des canaux Nav dans la signalisation des CE
A) Modèle proposé par (Traub et al. 1999) sur l'activation des canaux Nav par la vératridine ou le shear stress induisant un influx de Na⁺ responsable de l'inactivation de la voie ERK1/2. Figure issue de (Traub et al. 1999). B) Modèle proposé par (Andrikopoulos et al. 2011) sur l'entrée de Na⁺ médiée par l'activation des canaux Nav influençant la concentration en Ca²⁺ intracellulaire permettant l'activation de la PKC α et de la PLC γ via le VEGF puis l'activation de ERK1/2. Figure issue de (Andrikopoulos et al. 2011).

3.6.4. Mécanosensibilité des canaux Nav

La mécanosensibilité des canaux Nav a été abordée pour la première fois dans les fibres nerveuses géantes de *Loligo*, où une augmentation de la pression hydrostatique engendre une diminution de l'amplitude du potentiel d'action (Baker, Hodgkin, et Shaw 1962). Dans les corpuscules de Pacini, où des canaux Nav ont été détectés (Pawson et Bolanowski 2002), le courant mécanorécepteur a une composante dépendante de la TTX (Bolanowski et Zwislocki 1984), suggérant que les déformations membranaires peuvent moduler l'activité des canaux Nav, conduisant à leur participation à la mécanotransduction en réponse au toucher (cf théorie FFL, paragraphe 2.1.1. Concepts de la mécanosensibilité des protéines membranaires mécanosensibles). Suite à ces observations préliminaires *in situ*, il a été montré, dans des ovocytes de xénope exprimant le canal Na⁺ humain recombinant du muscle squelettique Nav1.4, que l'étirement de la membrane induisait une conversion irréversible du mode d'ouverture anormalement lent en mode rapide (Tabarean, Juranka, et Morris 1999). S'ensuit des travaux dans les cellules gastro-intestinales (Strege, Ou, et al. 2003; Strege, Holm, et al. 2003) et des systèmes d'expression hétérologues (Morris et Juranka 2007; Beyder et al. 2010; 2012) où les stimuli mécaniques (shear stress et pression de patch) modifient les propriétés biophysiques de la sous unité α du canal Nav1.5. Ainsi, l'influx de Na⁺ à travers cette isoforme engendre une dépolarisation rapide du potentiel membranaire, indispensable pour

l'excitabilité électrique des cardiomyocytes et importante pour les ondes électriques lentes du muscle lisse gastro-intestinal, et qui semble donc être régulé par les forces mécaniques.

Le **mécanisme de mécanosensibilité** des canaux Nav reste incertain. Plusieurs hypothèses ont émergé telles qu'une mécanosusceptibilité directe de la sous-unité Nav α , c'est-à-dire que les mouvements du détecteur de potentiel situé sur le segment S4 (figure 28) s'accroissent avec des stimuli mécaniques. Cependant, Strege et al. suggère que les mécanismes de tension et de mécanosensibilité par Nav α 1.5 peuvent être distincts puisque la mutation G615E Nav α 1.5 démontre une mécanosensibilité d'activation intacte mais une perte de mécanosensibilité d'inactivation (Strege et al. 2019). La deuxième hypothèse propose un processus mécanosensible des canaux Nav dû à l'étirement qui induirait des modifications dans les interactions canal Nav – protéine (Force From Filaments) ou –lipide (Force From Lipides) impactant les courants Na⁺ (cf paragraphe 2.1.1. Concepts de la mécanosensibilité des protéines membranaires). Par exemple, il a été montré que la syntrophine γ 2, une protéine faisant le lien entre le cytosquelette d'actine et les protéines associées à la membrane, détermine la mécanosensibilité de Nav α 1.5 (Ou et al. 2003). De plus, les sous-unités Nav β semblent être importantes dans la mécanosensibilité de la sous-unité Nav α puisqu'il a été démontré que Nav β 1 stabilise l'activation et l'inactivation de Nav1.7 neuronal sous des contraintes mécaniques (Körner et al. 2018). Cependant, bien que Nav β 1 amplifie les changements mécano-induits dans l'inactivation de Nav α 1.5 lors d'un shear stress, Nav β 3 ne modifie pas la mécanosensibilité de l'activation et l'inactivation du courant Na⁺ médié par Nav1.5 sensible au shear stress, mais améliore l'accélération mécano-induite de la cinétique d'activation (Maroni et al. 2019). Maroni suggère que cette régulation mécanosensible pourrait permettre de raccourcir la durée du potentiel d'action lors de tachycardie et ainsi d'éviter les arythmies (Maroni et al. 2019). Étant donné que les propriétés électriques diffèrent entre les isoformes Nav α , il semble que la mécanosensibilité serait également différente entre les différentes isoformes Nav α et pourrait être régulée différemment par les sous-unités Nav β .

Il a également été montré récemment que des perturbations de la mécanosensibilité des canaux Nav pourraient contribuer à des **canalopathies**. De cette manière, la mutation faux-sens G615E de Nav α 1.5, trouvée dans les cas du syndrome du QT long acquis ou du syndrome du côlon irritable, a un effet mineur sur la dépendance vis-à-vis du potentiel du courant médié par Nav1.5 mais entraîne des perturbations de la mécanosensibilité du canal Nav1.5, suggérant qu'un défaut de la mécanosensibilité pourrait contribuer à la physiopathologie des muscles lisses (Strege et al. 2019).

Pris dans leur ensemble, ces éléments de littérature suggèrent que les contraintes de cisaillement influencent l'expression et/ou l'activité des sous-unités α et β des canaux Nav qui à leur tour auraient un rôle dans la réponse à ces forces mécaniques.

OBJECTIFS

Compte tenu de la littérature scientifique, les connaissances sur le rôle des canaux Nav dans la fonction endothéliale vasculaire et dans la réponse au flux sanguin sont très peu décrites. A ce jour, aucune donnée ne permet de définir si leur expression est associée à la fonction ou à la dysfonction des CE.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été de préciser l'expression des différentes isoformes des sous-unités α et β des canaux Nav, dans deux modèles de CE humaines : des cellules primaires issues de veine ombilicale (HUVEC) et des cellules de l'aorte immortalisées (TeloHAEC). Le développement et la validation d'un modèle *in vitro* pour caractériser les réponses des CE au flux ont permis de comparer les variations d'expression dans ces CE en condition statique ou exposées à un flux laminaire physiologique par une méthode de quantification relative de l'ARN (RT-qPCR). Ensuite, nous nous sommes concentrés sur une sous-unité Nav β dont l'expression est différenciellement régulée par le shear stress laminaire physiologique. Dans le but d'étudier le rôle de cette sous-unité Nav β dans la réponse au flux des CE, et de déterminer si cette sous-unité serait un nouvel acteur de la mécanotransduction endothéliale, nous avons identifié les protéines partenaires de cette sous-unité auxiliaire par une technique d'immunoprécipitation suivie d'une analyse protéomique. Afin de mieux comprendre le rôle fonctionnel de cette sous-unité du canal Nav dans la mécanotransduction et dans la fonction endothéliale, nous avons utilisé une technique d'invalidation de l'expression par ARN interférence (siRNA) afin de diminuer son expression et d'observer les conséquences en réponse à un flux et l'exploration des voies de signalisation impliquées dans son expression. Cette étude pourrait permettre de placer l'une des isoformes des canaux Nav comme potentiel acteur de la mécanosignalisation endothéliale.

En parallèle, une étude protéomique sur des HUVEC exposées à un flux laminaire physiologique ou à un flux oscillatoire athéropone, a été menée grâce à la collaboration avec les chercheurs François Guillonnet, Benjamin Barré et Catherine Guette de la plateforme d'onco-protéomique de l'ICO (Institut de Cancérologie de l'Ouest) d'Angers (équipe 3 CRCI2NA Nantes-Angers UMR INSERM U1307 CNRS 6075). L'objectif de ce travail étant d'identifier de nouveaux candidats impliqués dans l'athéroprotection et dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

L'ensemble de ce travail de thèse a donc eu pour but par une approche ciblée de mieux comprendre le rôle des canaux Nav dans la réponse de la CE à un flux, et par une approche sans a priori d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans la réponse au flux physiologique athéroprotectif ou pathologique athéropone.

RÉSULTATS

1. Étude 1 : Implication de la sous-unité Navβ3 dans la mécanotransduction endothéliale

Dans ce travail, nous avons dans un premier temps évalué la réponse des cellules HUVEC et TeloHAEC aux contraintes de cisaillement laminaire (LSS) de 20 dyn/cm² correspondant à un flux physiologique en comparaison aux CE cultivées de manière statique. L'alignement des cellules dans le sens du flux a été quantifié par la méthode local gradient orientation avec le plugin directionality sur le logiciel Fiji d'Image J. Dans nos deux modèles cellulaires, le LSS entraîne une modification de la morphologie des cellules caractérisée par une élongation et un alignement des cellules dans la direction du flux. Nous avons également montré que le LSS induit une activation de la voie de signalisation athéroprotectrice *via* l'augmentation de l'expression de facteurs de transcription (KLF2 et KLF4) et protéines (eNOS) dans les deux types de CE, et une réduction de la voie de signalisation athéropromue *via* la diminution de l'expression de KLF6 et VCAM-1 dans les HUVEC. Dans un second temps, nous avons caractérisé les profils d'expression transcriptionnelle par RTqPCR et protéique par Western Blot, des sous-unités α et β des canaux Nav dans les HUVEC et les TeloHAEC. Les deux types cellulaires expriment les mêmes isoformes à savoir Nav1.5 (*SCN5A*), Nav1.6 (*SCN8A*) et très faiblement Nav1.7 (*SCN9A*) ainsi que les sous-unités Navβ1 (*SCN1B*) et plus faiblement Navβ3 (*SCN3B*). Nous avons ensuite montré que le LSS module l'expression transcriptionnelle de ces isoformes Navα et Navβ, avec en particulier une diminution de l'expression transcriptionnelle de *SCN5A* et une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *SCN3B* et ce dans les types cellulaires.

Puisque Navβ3 voit son expression fortement augmentée en réponse à un LSS, nous avons souhaité déterminer son rôle dans la réponse des CE à un LSS. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie de diminution de son expression par ARN interférence. La diminution de l'expression de *SCN3B* par SiRNA (environ 40% d'inhibition) en condition de LSS, comparé au SiRNA contrôle, a permis de montrer une diminution de la longueur des HUVEC ainsi qu'un moindre alignement dans le sens du flux.

Pour mieux comprendre quel pourrait être le rôle de Navβ3 dans la CE en réponse à un LSS, nous avons ensuite identifié les partenaires protéiques de Navβ3 par des expériences d'immunoprécipitation (IP) suivies d'une identification de ses partenaires par spectrométrie de masse. Nous avons utilisé un plasmide d'expression qui, sous le contrôle du promoteur CMV (cytomégalovirus), génère une protéine Navβ3 en fusion avec Myc-tag en N-terminal. À la suite de la transfection de ce plasmide (ou du plasmide contrôle c'est-à-dire sans la séquence codante de *SCN3B*) dans les TeloHAEC ou dans les cellules COS-7, une IP avec un anticorps anti-Myc tag a été réalisée dans les TeloHAEC surexprimant la protéine de fusion Myc-Navβ3, ainsi que dans les COS-7 surexprimant également la protéine de fusion Myc-Navβ3. Suite à l'IP dans les COS-7, un lysat protéique d'HUVEC a été passé afin d'accrocher les protéines endothéliales à Myc-Navβ3 (expérience de pull down). Ensuite, une approche protéomique dépendante de l'acquisition (DDA) sur le spectromètre de masse TimsTOF Pro2 (Bruker) nous a permis d'identifier 510 partenaires potentiels de Navβ3 dans les COS-7/HUVEC et 289 dans les TeloHAEC. Une analyse d'enrichissement par Gene Ontology (GO-terms) à l'aide de la base de données ToppGene a été réalisée sur les 76 partenaires potentiels de Navβ3 communs aux deux expériences d'immunoprécipitation. Dans la catégorie des processus biologiques ou des constituants cellulaires, la plupart des termes GO retrouvés font

référence à des compartiments intracellulaires ou au transport des protéines et à l'organisation du système endomembranaire. De plus, parmi ces 76 protéines partenaires potentielles de Navβ3, onze ont déjà été décrites dans la banque de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information) dont la protéine mTOR que nous avons validé par co-immunoprécipitation avec Navβ3. La sérine/thréonine kinase mTOR étant connue pour contrôler la prolifération, la mobilité et la survie cellulaire par un processus dépendant de l'autophagie, nous émettons l'hypothèse que Navβ3, par son interaction directe avec mTOR, inhibe la voie mTOR et favorise le flux autophagique conduisant à l'alignement des CE au flux.

Does Navβ3, an auxiliary subunit of voltage-gated Na⁺ channel, contribute to endothelial mechanotransduction?

Léa Réthoré^a, Anne-Laure Guihot^a, Linda Grimaud^a, Coralyne Proux^a, Benjamin Barré^b, Catherine Guette^b, Daniel Henrion^a, Christian Legros^{a,#}, Claire Legendre^{a,#,*}

^aUniv Angers, INSERM, CNRS, MITOVASC, Equipe CarME, SFR ICAT, Angers, FRANCE

^bUniv Angers, INSERM, CRCINA, ICO Cancer Center, SFR ICAT, Angers, FRANCE

[#]These authors equally contributed to this work.

^{*}Corresponding author e-mail addresses: claire.legendre@univ-angers.fr; +332 44 68 82 86

1. Introduction

Endothelium is defined as a single cell layer separating blood from vessel wall which plays a pivotal role in vascular homeostasis (Deanfield, Halcox, et Rabelink 2007). As such, endothelial dysfunction contributes to the initiation and development of several cardiovascular diseases (CVD), including arterial hypertension and atherosclerosis (Baeyens et al. 2016).

The endothelial cells (EC) are constantly exposed to frictional or hemodynamic forces resulting from blood flow. These forces or shear stress stimulate EC, which induce intracellular signaling to maintain EC integrity. Shear stress is laminar (Laminar Shear Stress or LSS) when arteries are straight and uniform whereas at arterial bifurcations or curvatures, shear stress becomes oscillatory and disturbed (oscillatory shear stress or OSS). While LSS induces alignment of EC in the same direction of flow, which is associated with structural reorganization of actin cytoskeleton remodeling (Kroon et al. 2017). This laminar shear stress (LSS) ranging from 10 to 60 dyn/cm² in the arterial vascular network (Chatterjee 2018), activates the atheroprotective molecular signaling pathway (Maurya et al. 2021). This activation leads to the induction of the Krüppel-like transcription factors, KLF2 and KLF4 that trigger the expression of genes necessary for EC stability and quiescence, such as *NOS3* which promotes vasodilation and prevents inflammation (Nakajima et

Mochizuki 2017). Moreover, this LSS downregulates atheroprone signaling pathway composed of KLF6 and VCAM1/ICAM1 (Nakajima et Mochizuki 2017). Furthermore, under physiological blood flow, autophagy is required for atheroprotection and EC alignment (Vion et al. 2017; Park et al. 2019; Meng et al. 2022). LSS stimulates autophagic flux through mTOR inhibition, preventing EC apoptosis, senescence and inflammation and promoting EC alignment in the direction of flow, the hallmark of EC health.

Shear stress are perceived by proteins capable to sense mechanical forces and to transduce them into intracellular signals. These mechanosensitive proteins or mechanosensors are classified into three categories according to their localization in the plasma membrane (Wolpe et al. 2021). First, PECAM1, VEGFR2 and VE-Cadherin build altogether the junctional mechanosome at the junction between cells-cells (Conway et Schwartz 2015). Secondly, integrins are found at the endothelial basement membrane in interaction with the extracellular matrix (ECM) (Janoštiak et al. 2014). Thirdly, G protein-coupled receptors (GPCR), tyrosine kinase receptors (TKR) are located at the apical plasma membrane, together with primary cilia, glycocalyx and caveolae (Givens et Tzima 2016). This third family also gathers mechanosensitive ions channels, such as the K⁺ channels Kir2.1 and the non-selective cation channels, TRPV4 and Piezo1 (Gerhold et Schwartz 2016).

Other ion channels such as voltage-gated Na⁺ channels (Nav channels) are expressed in EC (Andrikopoulos et al. 2011) and regulate ERK1/2 activation by shear stress (Traub et al. 1999). These ion channels are mechanosensitive but their involvement in mechanosignaling are still not yet fully elucidated (Körner et al. 2018; Maroni et al. 2019; Morris 2011; Strege et al. 2019). Nav channels are composed of two subunits, an α -subunit that forms a pore selective for Na⁺ and an auxiliary β -subunit, belonging to the Ig-CAM family, which regulates channel activity (Catterall 2012). In mammals genome, nine genes (*SCN1-5A* and *SCN8-11A*) encode as many as Nav channel α -subunit isoforms (Nav1.1 to Nav1.9) and four genes (*SCN1B* to *SCN4B*) encode Nav channel β -subunit isoforms (Nav β 1 to Nav β 4, and also Nav β 1B isoform resulting from alternative splicing of *SCN1B*) (Catterall, Goldin, et Waxman 2005). Nav channels are mainly expressed in neurons, myocytes and

cardiomyocytes, allowing action potential generation and propagation (Catterall 2012). Since two decades, noncanonical roles of Nav channels have emerged in EC where they are involved in the modulation of ERK pathway induced by shear stress (Traub et al. 1999) and in angiogenesis (Andrikopoulos et al. 2011). However, the role of Nav channels in endothelium function still need to be clarified.

To investigate the role of Nav channels in endothelial mechanotransduction, we used two human EC models, one from umbilical vein (HUVEC) and the other from aorta (TeloHAEC). We first studied the expression of the different Nav channels in response to LSS in both models of EC. We found that in these two types of EC, LSS during 96 h induced cell alignment and elongation and activated the atheroprotective signaling pathway (*KLF2/KLF4* and *NOS3*). This physiological shear stress also modulated Nav channel gene expression. Interestingly, *SCN3B* encoding for Nav β 3 protein was strongly upregulated under LSS in both EC and siRNA *SCN3B* induced the impairment of alignment and elongation of HUVEC upon LSS. The proteomic analysis of Nav β 3 co-immunoprecipitation revealed that mTOR is a putative interacting partner of Nav β 3. Thus, we hypothesize that Nav β 3, through its direct interaction with mTOR, inhibits mTOR pathway and then promotes autophagic flux leading to cell alignment.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals Reagents

All reagents and solvents were obtained from Sigma-Aldrich Merck (Saint-Louis, MO, USA) or Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) except RapiGest SF Surfactant that was obtained from Waters Corporation (186001861, Milford, MA, USA).

2.2. Cell Lines

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) were supplied from pooled donors (from up to four different umbilical cords) (C-12203; PromoCell, Heidelberg Germany). HUVEC were cultured from passage 2 until passage 5 at 37°C with 5% CO₂ in endothelial basal medium 2 (EBM-2; C-

22211; PromoCell) supplemented with the SupplementMix (C-39216; PromoCell) called endothelial growth medium 2 (EGM-2). Human aortic endothelial cells (TeloHAEC) (CRL-4052; LGC Standards, Molsheim, France) were cultured from passage 2 until passage 25 at 37°C with 5% CO₂ in endothelial basal medium from microvascular vessels (EBM-MV2; C-22221; PromoCell) supplemented with the SupplementMix (C-39226; PromoCell) called endothelial growth medium 2 (EGM-MV2). HUVEC and TeloHAEC were routinely cultivated in Flask T175 in EGM-2 or EGM-MV2 medium respectively and when 80% confluence was reached, split in a ratio of 1/5 (HUVEC) or 1/10 (TeloHAEC) in a new Flask T175 using the DetachKit (C-41210; PromoCell). COS-7 cells were cultivated in a Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 medium (P04-41550, Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% foetal bovine serum (Lonza), 1 mM L-glutamine, 1 mM of penicillin/streptomycin and 1 mM of pyruvate in an incubator with 5% CO₂ at 37°C. COS-7 cells were routinely cultivated in Flask T75, and when 80% confluence was reached, split in a ratio of 1/10 in a new Flask T75.

2.3. In vitro shear stress procedure

EC were seeded at 90% confluence (350, 000 cells) onto μ -slides 0.4 Luer (80176; Ibidi GmbH, Munich, Germany) 24 h before shear stress experiments. The μ -slides with cells were connected to the Ibidi pump system (10902) with a perfusion set of 15 cm, inner diameter 1.6 mm (10962) according to the Ibidi manufacturer's instruction (AN 13: HUVECs under Perfusion). The μ -slides with cells were incubated at 37°C with 5% CO₂. Cells were exposed to a laminar unilateral shear stress (LSS) of 20 dyn/cm² with these flow parameters (31.9 mbar pressure, 21.7 mL/min flow rate, 0.007 dyn x s/cm² viscosity) for 24 h or 4 days. Static condition corresponded to cells cultivated onto Ibidi μ -slides 0.4 Luer without shear stress application. For this static condition, cell medium was changed every day.

2.4. Cell alignment and elongation quantification

Cell alignment was assessed using local gradient orientation method with the directionality plugins in ImageJ – Fiji software. Briefly, to quantify cell alignment with the flow, the angle formed between

the orientation vector of the flow direction and the vector given by orientation of the main axe of each cell was calculated. When cell is totally aligned with the flow, the angle value is 0°. Quantification of cell orientation measured by elongation factor (cell length along flow direction divided by cell width) was performed with Image J software where 15 cells per field were counted of each replicate of each condition (static or LSS).

2.5. SiRNA or Plasmid Transfection

HUVEC were transfected with *SCN3B* siRNA Oligo Duplex sequence (Locus ID 55800 – SR310954) called SiRNA *SCN3B* or with an universal scrambled negative control siRNA duplex (OriGene, Rockville, MD, USA) called SiRNA CTL, using Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Cat No. 13778-150, Invitrogen Life technologies, Thermo Fisher Scientific). Briefly, HUVEC were seeded at a density of 500,000 cells/well in a 6-well plate. The day after, cells were transfected with a mix of 1:1 v/v lipofectamine: siRNA (10 nM final) for 24 h. Cells were then trypsinized and seeded at 90% confluence (350,000 cells) onto μ -slides 0.4 Luer 24 h before shear stress experiment for 24 h.

To overexpress Nav β 3 in EC, pCMV3-SP-N-Myc-SCN3B expression plasmid (or pMyc-SCN3B) encoding Human *SCN3B* with a N-terminal enhanced Myc-tag (10 amino acid EQKLISEEDL) was purchased commercially (Cat No. HG13897-NM, Sino Biological Europe, Düsseldorf, Germany). pCMV3-SP-N-Myc-SCN3B without SCN3B has been used as negative control pCMV empty vector. TeloHAEC were transfected using Lipofectamine 2000 Reagent (Cat No. 11668-027, Invitrogen Life technologies) whereas COS-7 cells were reverse transfected using Polyethylenimine (PEI, Cat No. 23966, Polysciences) according to the manufacturer's instructions. For each transfection, 1 μ g of plasmid has been used per 100 000 cells (TeloHAEC) or 300 000 cells (COS7).

2.6. Reverse transcription and Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction

After flow experiments, cells were washed with ice-cold PBS and total RNA was extracted using the RNeasy[®] micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. In total, 500 ng to 1 μ g of total RNA was processed for cDNA synthesis using random hexamers and the QuantiTect[®] Reverse Transcription kit (Qiagen). PCR assays were assessed on a LightCycler 480

Instrument II (Roche, Meylan, France) using Sybr® Select Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) and 10 ng of cDNA in duplicate, and gene-specific primers (Supplementary Table S1) previously designed using the PrimerQuest Tool on Integrated DNA Technologies (IDT) and validated by testing PCR efficiency using standard curve as MIQE guidelines (dMIQE Group et Huggett 2020). Amplification specificity was confirmed by one peak-melting curve at the end of the amplification process. Relative quantification of gene expression was normalized to the mean of the expression of two validates housekeeping genes TBP (Tata-box protein) and/or UBC (Ubiquitin C) and by using the $2^{-\Delta Cq}$ or $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method, where Cq is the Cycle quantitative (Bustin et al. 2009).

2.7. Western Blotting

After flow experiments, cells were washed with ice-cold PBS, and lysed at 4°C in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 12 mM sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, pH 8) supplemented with Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail and EDTA (78444, Thermo Fisher Scientific). Cells lysates were centrifuged for 20 min at 14,000 rpm at 4°C, and supernatants were collected. After protein quantification (Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat No. 23235), 10 to 20 µg of HUVEC were separated by 8 to 12% SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and were transferred onto a nitrocellulose membrane 0.22 µm (Thermo Fisher Scientific). The primary antibodies (diluted in 1/1000 in TBST 5% BSA, expect when dilution factor was indicated) used were : anti-eNOS/NOS Type III (1/500, mouse, 610297, BD Biosciences), anti-KLF2 (rabbit, HPA055964, Atlas Antibodies), anti-Myc tag [9E10] (mouse, ab32, Abcam), anti-Nav1.5 (1/500, rabbit, ASC-005, alomone labs), anti-Nav1.6 (1/500, rabbit, ASC-009, alomone labs), anti-Nav1.7 (1/500, mouse, 75-103, NeuroMab), anti-Navβ1 (rabbit, 13950, Cell Signaling), anti-Navβ3 (rabbit, PA5-87803, Thermo Fisher Scientific) and anti-β-actin (1/2000, mouse, A5316, Sigma) or anti-HSC70 (1/10 000, mouse, sc-7298, Santa Cruz Biotechnology) were used as loading control. Peroxidase-conjugated secondary antibodies (Goat anti-Mouse IgG, Cat No. 72-8062, and Goat anti-Rabbit IgG, Cat No. 72-8073, Tonbo Biosciences) and Clarity Western ECL Substrate (170-5061, BioRad) or maximum sensitivity substrate SuperSignal™ West Femto (34095, Thermo Fisher Scientific) were used before

visualization using a LAS-3000 imager (Fujifilm, Tokyo, Japan). The image acquisition was performed with Image Labs (BioRad) and protein normalization and densitometry analysis were done by adjusting background and comparing the adjust volume of each band of the interest protein to the adjust volume of band of the loading control (HSC70).

2.8. Immunoprecipitation and pull-down assay

After pMyc-SCN3B or pCMV vector transfection for 24 h, TeloHAEC were washed with ice-cold PBS, collected, and lysed with IP lysis buffer (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton) containing Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail and EDTA (78444, Thermo Fisher Scientific). Cell lysates were centrifuged for 20 min at 14,000 rpm at 4°C, and supernatants were collected. After protein quantification (Pierce BCA Protein Assay Kit), 500 µg of lysed cells were incubated with washed binding control magnetic agarose beads (Cat No. bmab-20, Chromotek) and rotated end-over-end for 1 h at 4°C. Beads were separated with a magnet until the supernatant was clear. The supernatant was incubated with washed Myc-Trap magnetic agarose beads (Cat No. ytma-10, Chromotek) overnight at 4°C. The next day, beads were separated with a magnet until the supernatant was clear. The supernatant was collected and named Flow Through or FT. Beads were washed twice with IP lysis buffer and the first wash was collected and named Wash in order to verify that Navβ3 still attached to beads. After washing with IP lysis buffer without Triton, beads were boiled in NH₄CO₃ buffer (50 mM pH 8) or with Laemmli buffer. The obtained supernatant (or elution named IP) was subjected to a western blot or mass spectrometry experiments.

For the pull-down assay, COS-7 cells were transfected with pMyc-SCN3B plasmid or vector alone pCMV for 48 h. After collected FT and Wash1, 1 mg of freshly HUVEC protein lysate was incubated with magnetic beads for 1 h at 4°C in a rotating platform. Then, beads were washed twice with IP lysis buffer and once with IP lysis buffer without Triton.

2.9. Sample preparation and MS/MS analysis.

For MS/MS analysis, immunoprecipats were resuspended in 200 µL of Rapigest SF (Waters), and dithiothreitol (DTT) was added to a final concentration of 5 mM (AppliChem, Darmstadt, Germany).

Samples were incubated in a thermo shaker at 95°C for 1 h, and sonication performed twice using an ultrasonic processor (130W, 20 KHz) (Thermo Fisher Scientific). Subsequently, cysteine residues were alkylated by adding 200 mM S-Methyl methanethiosulfonate (MMTS) to a final concentration of 10 mM (incubated at 37°C for 10 min). Sequencing-grade trypsin was added in a ratio ≥ 2 μ g per 100 μ g of protein (incubated at 37°C overnight). The reaction was stopped with formic acid (9% final concentration), and incubated at 37°C for 1 h, and the acid-treated samples were centrifuged at 16,000 g for 10 min. Salts were removed from the supernatant and collected in new reaction microtubes using self-packed C18 STAGE tips. Peptide concentrations were finally determined with the Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). 200 ng of each sample were analyzed by LC-MS/MS with a nanoHPLC UHPLC system (Bruker Daltonik GmbH, Billerica, MA, USA) with an Aurora series reversed-phase C18 column (25 cm $\times$ 75 μ m i.d., 1.6 μ m C18, IonOpticks) heated to 50°C and coupled to a TimsTOF Pro2 (Bruker Daltonik GmbH). A gradient of 2–35% B, where mobile phase A was 0.1% formic acid in water and B was 0.1% formic acid in acetonitrile, was used for 1 h. The total run times, including a ramp up to 35–95% B to clean the column, and prep for the next sample. The mass spectrometer was set to PASEF scan mode for DDA acquisition spanning 300–1250 m/z with 10 PASEF ramps. The TIMS settings were 100 ms ramp and accumulation time (100% duty cycle) and a ramp rate of 9.42 Hz; this resulted in 1.17 s of total cycle time. Linear precursor repetitions were set at a 20,000 target intensity with a 2,500 intensity threshold. Active exclusion was enabled with a 0.4min release. The collision energy remained at default with a base of 1.6 1/K0 [V s/cm²] set at 59 eV and 0.6 1/K0 [V s/cm²] at 20 eV. Isolation widths were set at 2 m/z at <700 m/z and 3 m/z at >800 m/z. TIMS ranges were set initially from one range of 0.6–1.6 1/K0 [V s/cm²] as seen in most published studies and further optimized and tested at a narrower range of 0.75–1.25 1/K0 [V s/cm²]. Mass spectrometry data were analyzed with Protein Pilot software (v4.5, Sciex®) using the following parameters: (1) search against a database composed by Homo sapiens from SwissProt (release at September 2022, with 26,610 reviewed entries); (2) MMTS as fixed modification; (3) trypsin digestion (with a miss cleavage factor of 0.75, Paragon™ Algorithm). An independent False

Discovery Rate (FDR) analysis using the target-decoy approach provided by Protein Pilot™ was used to assess the quality of identifications. Positive identifications were considered when identified proteins and peptides reached a 5% local FDR.

2.10. Data analysis. Statistical analysis.

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.02 (La Jolla, CA, USA). To analyse the distribution of data, the Shapiro-Wilk test (for the normal (Gaussian) distribution test) was used. When appropriated, parametric or non parametric statistical tests were used to analyse significance. To assess the difference between two groups, Mann-Whitney tests were used. A difference with p -value <0.05 was considered statistically significant (ns: non significant, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). Data are mean $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. Effects of LSS on cell alignment and elongation in HUVEC and TeloHAEC

The application of a LSS of 20 dyn/cm², corresponding to physiological condition (Chatterjee 2018) led to modification of cell phenotype of both HUVEC and TeloHAEC (**Fig. 1**). As shown in cell photography, cell alignment and elongation in the same direction of flow were observed from 24 to 96 h (**Fig. 1A and B**). Alignment analyses indicated that in static condition or in the beginning of flow (0 h), the EC main axis was randomly distributed whereas LSS strongly enhanced cell alignment (**Fig. 1B**). Indeed, cells started to be aligned to the flow direction (angle value of 0°) from 24 h with a maximal peak at 96 h for HUVEC whereas for TeloHAEC, almost all cells were already aligned from 24 h (**Fig. 1B**). Moreover, the length of HUVEC was increased under flow by 2-fold (from $54.3 \pm 1.8 \mu\text{m}$ to $117.2 \pm 3.4 \mu\text{m}$ after 96 h of shear stress, $p<0.001$) (**Fig. 1C, left panel**) whereas the length of TeloHAEC significantly increased, but to a lesser extent (from $75.9 \pm 1.9 \mu\text{m}$ to $101.7 \pm 3.8 \mu\text{m}$ after 96 h of shear stress, $p<0.001$) (**Fig. 1C, left panel**), probably because TeloHAEC were longer than HUVEC in static condition. Furthermore, LSS decreased cell width in the same range value for both EC (in HUVEC from $16.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ to $11.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $p<0.001$, and in

TeloHAEC from $16.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ to $10.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$, $p < 0.001$) (**Fig. 1C, middle panels**). As consequence, cell elongation factor (ratio of cell length/cell width) was significantly higher after 96 h of LSS compared to static condition (**Fig. 1C, right panel**) with HUVEC by 3-fold (from $3.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ to $10.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$ after 96 h of shear stress, $p < 0.001$) and TeloHAEC by 2-fold (from $4.8 \pm 0.16 \mu\text{m}$ to $9.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ after 96 h of shear stress, $p < 0.001$).

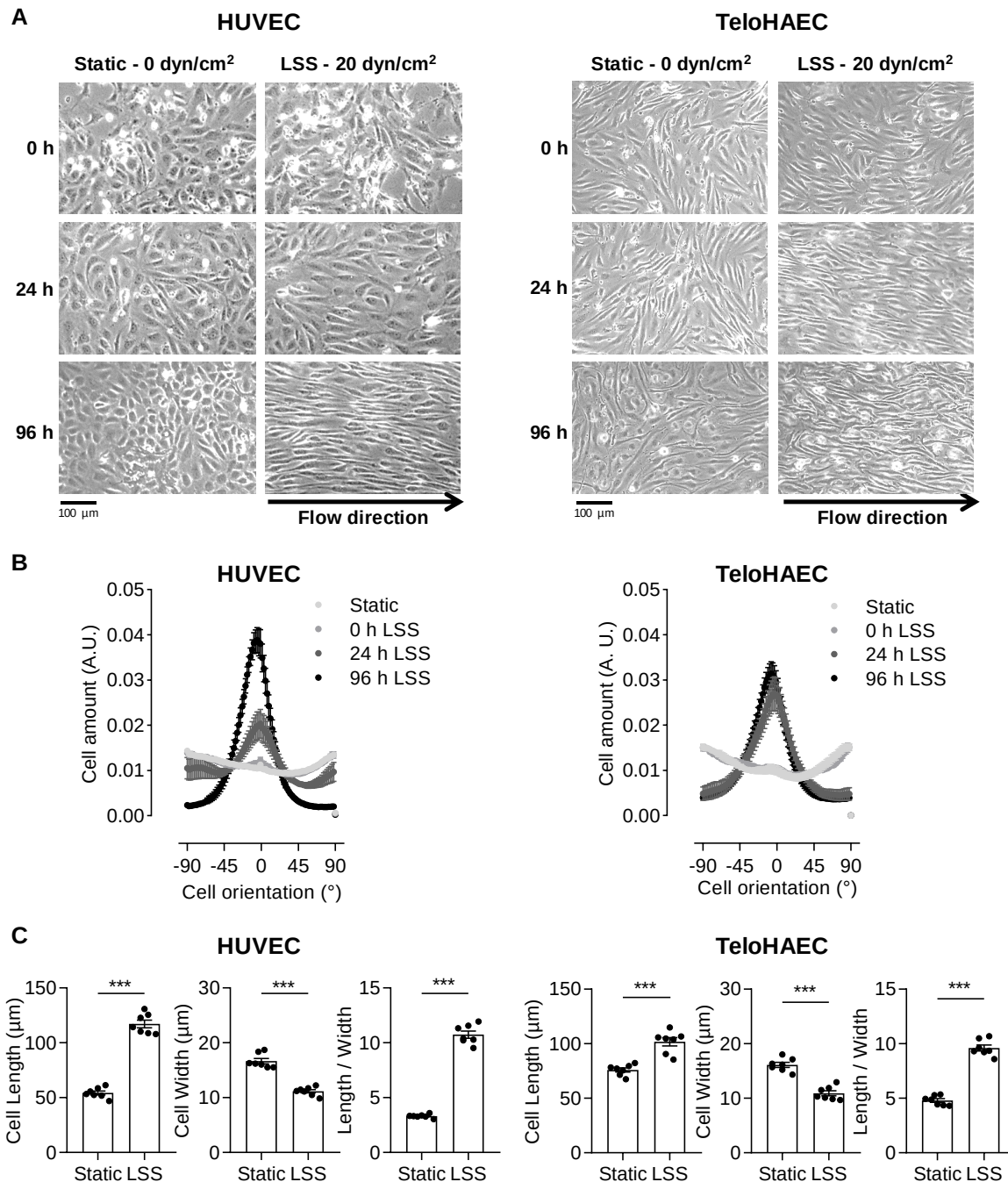


Figure 1. Laminar shear stress (LSS) leads to cell alignment and elongation in the direction of flow in both HUVEC and TeloHAEC.

(A) Representative phase contrast microscopy images of HUVEC and TeloHAEC cultivated under static condition (Static, 0 dyn/cm²) or under laminar shear stress (LSS, 20 dyn/cm²) at the beginning of the experiment (0 h) or after 24 hours (24 h) or after 96 hours of flow (96 h). (B) HUVEC and TeloHAEC alignment quantification using local gradient orientation method with Fiji software at 0, 24 and 96 h of LSS or under static condition. 0° correspond to angle of the flow direction. (C) Elongation of HUVEC and TeloHAEC was determined as the cell length along flow direction (left panel) divided by cell width (middle panel) giving the elongation factor (right panel) after 96 h of LSS. Values are means $\pm$ SEM are shown (n=7). One-tailed Mann–Whitney tests were performed. *** $p < 0.001$.

3.2. Effects of LSS on atheroprotective and atheroprone signaling pathway in HUVEC and TeloHAEC

To examine whether atheroprotective signaling pathway was activated in EC under 96 h of LSS, the expression of *KLF2/KLF4*, *NOS3*, *KLF6* and *VCAM1* transcripts was measured. *KLF2* expression did not significantly change in HUVEC ($p=0.42$) and TeloHAEC ($p=0.34$) (**Fig. 2A**). *KLF4* expression was significantly increased in both cells with a fold change value of 8.3 for HUVEC ($p<0.01$) and 5.4 for TeloHAEC ($p<0.05$). *NOS3* mRNA expression was also significantly increased in HUVEC (3.9-fold change, $p<0.01$), but not in TeloHAEC (1.6-fold change, $p=0.06$). Despite no significant increase of *KLF2* mRNA under LSS for both EC, *KLF2* protein expression was significantly induced in LSS condition compared to static condition with fold change values of 2.1 in HUVEC ($p<0.05$) and 6.7 in TeloHAEC ($p<0.05$) (**Fig. 2B**). eNOS protein expression was also significantly increased in both cells with a fold change value of 6.5 for HUVEC ($p<0.01$) and 1.9 for TeloHAEC ($p<0.05$) (**Fig. 2B**). Concerning the atheroprone signaling pathway, *KLF6* and *VCAM1* transcript expressions were decreased (fold change value of 0.5 ($p<0.05$) and 0.2 ($p<0.05$), respectively) in HUVEC (**Fig. 2C**). Surprisingly, this down regulation of the atheroprone pathway was shown in HUVEC but not in TeloHAEC, where *KLF6* expression did not significantly change ($p=0.24$) and *VCAM1* expression was undetectable ($Cq>35$) (**Fig. 2C**). Altogether, these data showed that 96 h of LSS activated the atheroprotective signaling pathway (*KLF2/KLF4/NOS3*) and downregulated the atheroprone signaling pathway (*KLF6/VCAM1*) in HUVEC. Concerning TeloHAEC, responses to 96 h of LSS differed from those of HUVEC, showing only a significant induction of *KLF4* transcript expression with an increase expression of *KLF2* and eNOS protein.

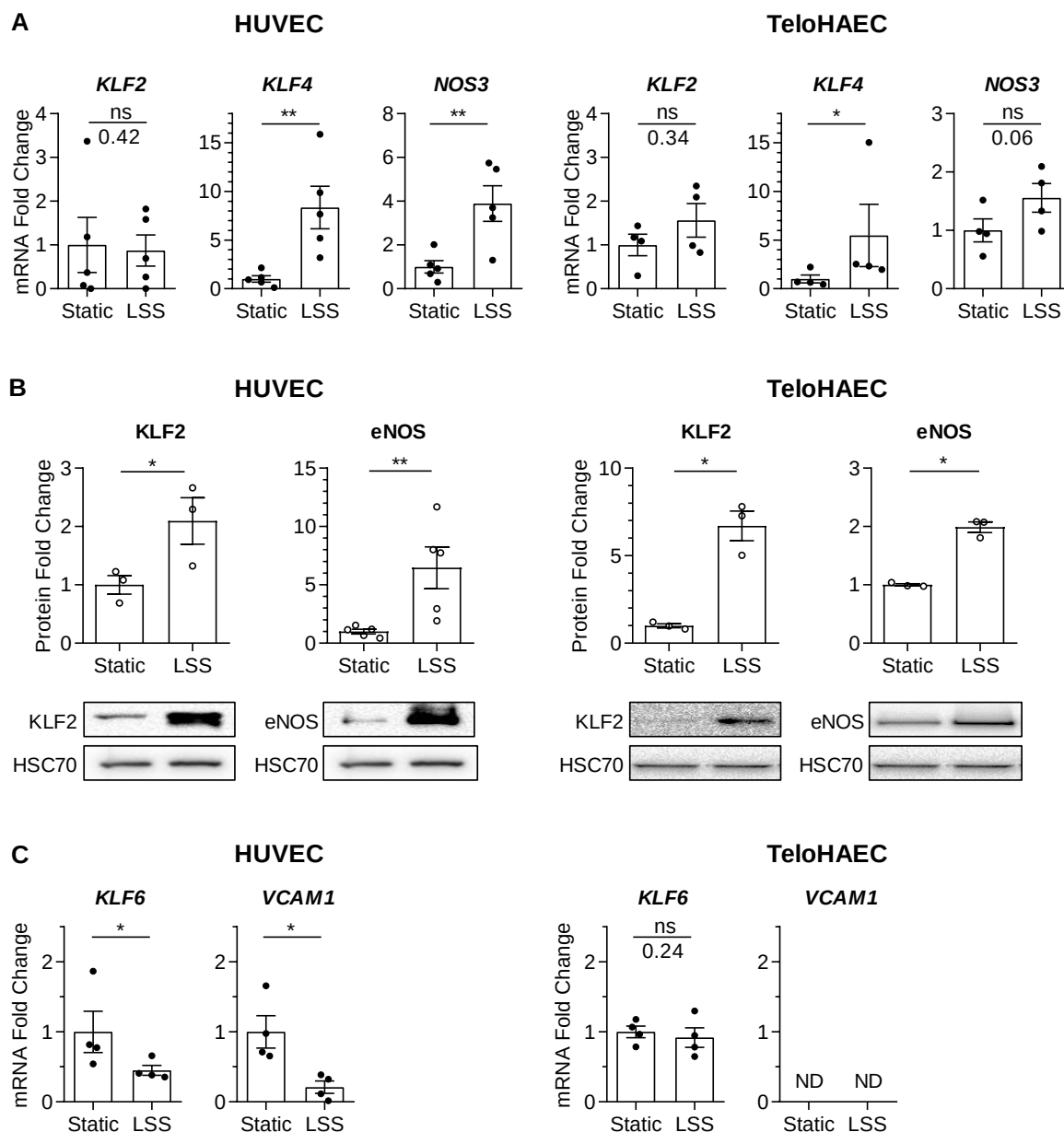


Figure 2. Laminar Shear Stress (LSS) activates the atheroprotective signaling pathway in both HUVEC and TeloHAEC and downregulates the atheroprone signaling pathway only in HUVEC after 96 h of flow.

(A) mRNA expression of the atheroprotective signaling pathway (*KLF2*, *KLF4* and *NOS3*) in static and LSS (20 dyn/cm² - 96 h) conditions in HUVEC and TeloHAEC. (B) Densitometry analysis of immunoblot for *KLF2* and *eNOS* normalized to HSC70 (loading control) and immunoblot representative images of *KLF2*, *eNOS* and HSC70 protein expression in HUVEC or TeloHAEC cultivated under static or LSS (20 dyn/cm²) conditions for 96 h. (C) mRNA expression of the atheroprone signaling pathway (*KLF6* and *VCAM1*) in static and LSS (20 dyn/cm² - 96 h) conditions in HUVEC and TeloHAEC. Values of fold change (mRNA and protein) are expressed as mean $\pm$ SEM for at least 3 or 5 independent experiments and compared to static condition, given the arbitrary value of 1 using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method for RT-qPCR experiments. ND: Not Detected ($C_q > 35$). One-tailed Mann-Whitney tests were performed. ns: non significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.3. Expression of Nav channel subunits in HUVEC and TeloHAEC

We then characterized the expression of Nav channels in HUVEC and TeloHAEC by RT-qPCR and immunoblotting (**Fig. 3**). Three of the nine α subunits mRNA were detected in both EC by RT-qPCR, corresponding to *SCN5A*, *SCN8A* and *SCN9A* transcripts, whereas *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN4A*, *SCN10A* and *SCN11A* transcripts were amplified at very low levels ($C_q > 35$), and were neglected (**Fig. 3A**). In HUVEC, the expression level of *SCN8A* transcript was 5-fold higher than those of *SCN5A* and *SCN9A*, while in TeloHAEC these three genes exhibited similar expression levels (**Fig. 3A**). At protein levels, Nav1.5 and Nav1.6 were detected in HUVEC and TeloHAEC, in agreement with RT-qPCR data (**Fig. 3B**). However, Nav1.7 was not detected in both HUVEC and TeloHAEC, suggesting the absence or a very low expression of this Nav channel subtype which is in agreement with the low expression of *SCN9A* ($C_q > 29$ for 10 ng of cDNA).

Concerning β subunits, *SCN1B* and *SCN3B* cDNAs were detected in both EC, but *SCN1B* exhibited the highest expression level. *SCN2B* and *SCN4B* cDNAs were not detected in HUVEC and TeloHAEC (**Fig. 3C**). Both Nav β 1 and Nav β 3 were also detected in EC at protein levels (**Fig. 3D**). Nav β 1 was detected in EC at a molecular weight lower in comparison to mouse brain protein extract whereas Nav β 3 was detected in EC at higher molecular weight than mouse heart protein extracts. Altogether, these data showed that Nav1.5 and Nav1.6 channel subtypes in combination with Nav β 1 and Nav β 3 subunits are expressed in HUVEC and TeloHAEC.

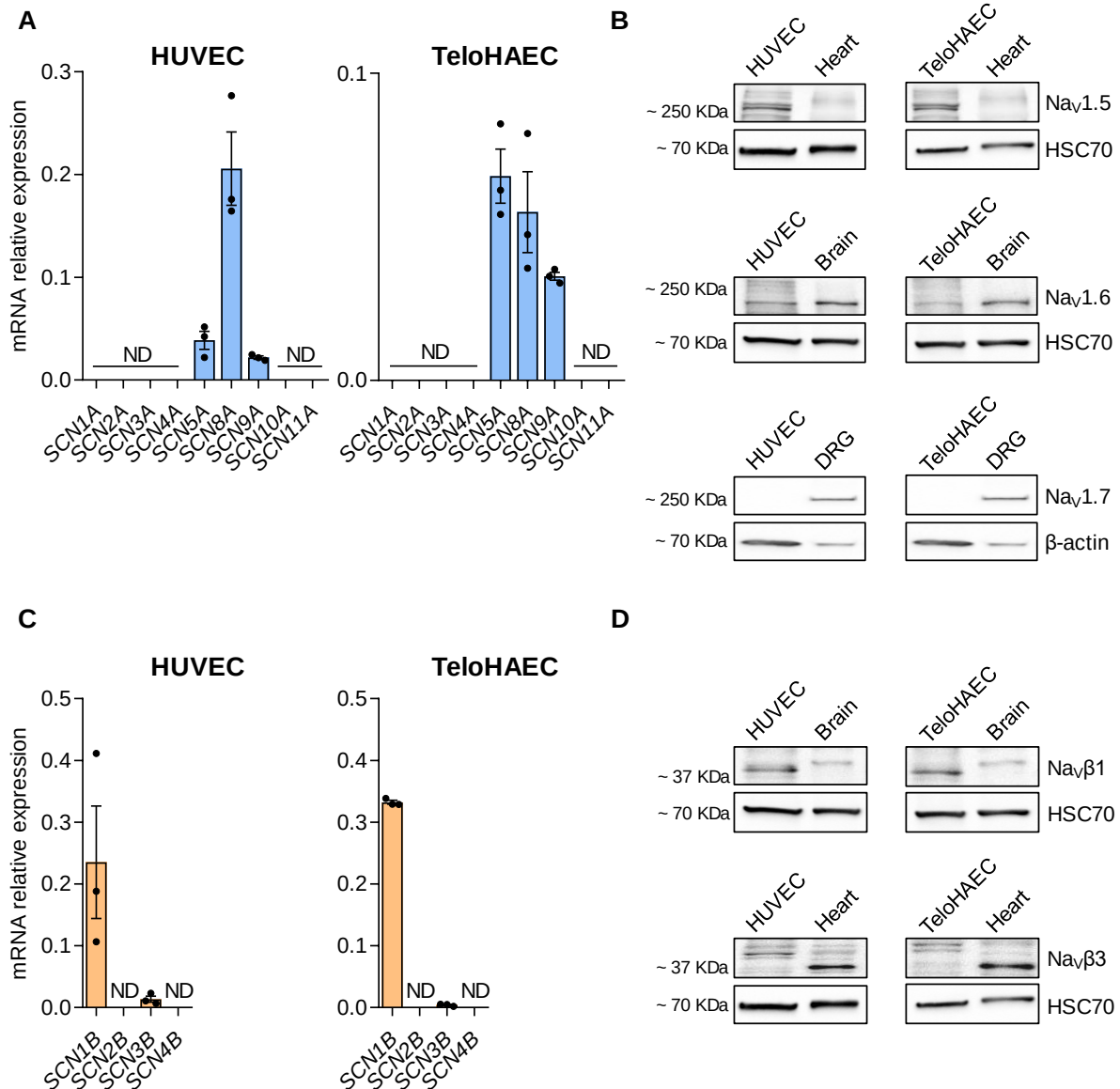


Figure 3. Transcript and protein expression profiles of Nav channel subunits endogenously expressed in HUVEC and TeloHAEC.

(A, C) Gene expression profile of Nav channel subunits (*SCN1A* to *SCN11A* and *SCN1B* to *SCN4B*) in HUVEC and TeloHAEC. The mRNA relative expression of Nav channel subunits was determined by relative RT-qPCR. The data are mean of mRNA relative expression $\pm$ SEM ($n=3$) with the $2^{-\Delta C_q}$ method using two housekeeping genes TBP (Tata-box protein) and UBC (Ubiquitin C). ND: Not Detected ($C_q > 35$). (B, D) Protein expression of Nav channel subunits (Nav1.5, Nav1.6 and Nav1.7 and Navβ1 and Navβ3) in HUVEC and TeloHAEC. The expression of Nav1.5, Nav1.6 and Nav1.7 (B) and Navβ1 and Navβ3 (D) was evaluated by western blot in comparison to control tissues as mouse heart (Nav1.5 and Navβ3), brain (Nav1.6 and Navβ1) or dorsal root ganglion neurons (DRG) (Nav1.7). Fifty μ g of cell protein extracts (HUVEC and TeloHAEC) and 20 μ g of protein from control tissue (heart, brain and DRG) were loaded on 8% SDS-PAGE. HSC70 and β-actin were used as a loading control.

3.4. Effects of LSS on Nav channels expression in HUVEC and TeloHAEC

We next decided to study the impact of LSS in EC under 96 h on Nav channels transcript expression. We observed a downregulation of *SCN5A* transcript after 96 h of LSS in both HUVEC and TeloHAEC with a significant fold change value of 0.2 ($p<0.05$) and 0.4 ($p<0.05$), respectively (**Fig. 4A**). The expression levels of *SCN8A* and *SCN9A* were increased in HUVEC (fold change values of 1.4 and 2.1, respectively) but not significantly ($p=0.69$ and $p=0.34$, respectively) after 96 h of LSS. In contrast, the expression of these genes were decreased by 0.68-fold for *SCN8A* and by 0.6-fold for *SCN9A* in TeloHAEC after 96 h of LSS but not significantly ($p=0.20$ and $p=0.06$, respectively) (**Fig. 4A**). Interestingly, while *SCN1B* transcript expression did not significantly changed in both EC (fold change value of 1.9 for HUVEC ($p=0.24$) and 1.3 for TeloHAEC ($p=0.34$)), *SCN3B* expression was significantly strongly increased after 96 h of LSS by 7.1-fold in HUVEC ($p<0.01$) and by 2.9-fold in TeloHAEC ($p<0.05$) (**Fig. 4B**). We then only examined the expression of Nav β 3 by western blot, showing 2.1- and 2.9- fold increase in HUVEC ($p=0.10$) and TeloHAEC ($p=0.20$), respectively (**Fig. 4C**).

Altogether, these data demonstrated that LSS modulated Nav channels expression in both HUVEC and TeloHAEC, showing a significant downregulation of *SCN5A* expression and a significant upregulation of *SCN3B* expression under LSS.

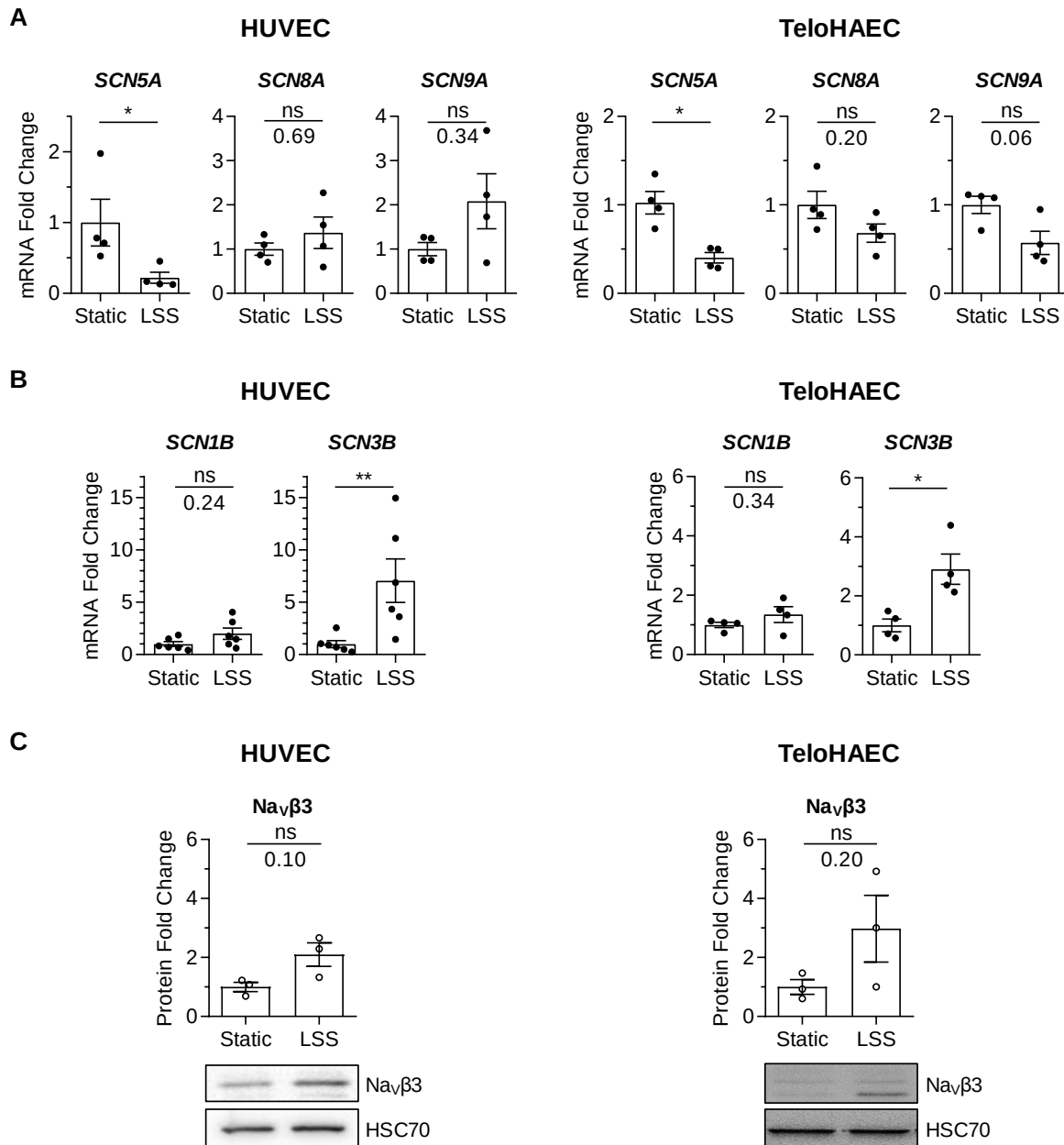


Figure 4. Laminar Shear Stress (LSS) modulates Nav channel expression profiles in both HUVEC and TeloHAEC after 96 h of flow.

(A) *SCN5A*, *SCN8A* and *SCN9A* and (B) *SCN1B* and *SCN3B* transcript expression in LSS (20 dyn/cm² - 96 hours) compared to static condition in HUVEC or TeloHAEC. (C) Densitometry analysis of immunoblot for Nav β 3 normalized to HSC70 (loading control) and immunoblot representative images of Nav β 3 and HSC70 protein expression in HUVEC and TeloHAEC cultivated under static or LSS (20 dyn/cm²) condition for 96 h. Values of fold change (mRNA and protein) are expressed as mean $\pm$ SEM for at least 3 or 6 independent experiments and compared to static condition, given the arbitrary value of 1 using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method for RT-qPCR experiments. Two-tailed Mann-Whitney test were performed. ns: non significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.5. *SCN3B* SiRNA effects on cell alignment and length of HUVEC under LSS.

To investigate the role of Nav β 3 in endothelial response to LSS, HUVEC were transfected with a selective SiRNA against *SCN3B* (SiRNA *SCN3B*) or a scramble SiRNA (SiRNA CTL) as negative control. SiRNA *SCN3B* inhibited up to 40% *SCN3B* expression in static condition in comparison to SiRNA CTL (**Fig. 5A**). After 24 h of LSS, *SCN3B* mRNA expression level was increased by 2.4-fold in HUVEC treated with SiRNA CTL, whereas with SiRNA *SCN3B* a 1.6-fold decrease of *SCN3B* mRNA expression was observed (**Fig. 5A**), corresponding to an inhibition of 40% of *SCN3B* expression under LSS. This relatively low diminution of *SCN3B* expression under LSS was sufficient to impact cell alignment as observed in cell microscopic photography where HUVEC seemed to be less aligned in SiRNA *SCN3B* condition compared to SiRNA CTL (**Fig. 5B**). Indeed, the quantification of HUVEC alignment showed that, in the presence of SiRNA CTL, the majority of HUVEC were aligned at the angle value of 0°, corresponding to the flow direction, in comparison to HUVEC cultivated in static condition, where cells were randomly distributed all along the angle value axis (**Fig. 5C, left panel**). After SiRNA *SCN3B* transfection, HUVEC cells were randomly distributed all along the angle value axis under LSS as upon static condition (**Fig. 5C, right panel**) demonstrating that HUVEC were less aligned to the flow direction in the presence of SiRNA *SCN3B*. Furthermore, HUVEC length was also impacted by SiRNA *SCN3B* (**Fig 5D, left panel**). Indeed, SiRNA *SCN3B* led to a significant decrease of HUVEC length after 24 h of LSS (from $91.9 \pm 2.5 \mu\text{m}$ with SiRNA CTL to $80.9 \pm 0.8 \mu\text{m}$ with SiRNA *SCN3B*, $p < 0.01$). However, compared to SiRNA CTL condition, SiRNA *SCN3B* did not significantly change HUVEC width (from $13.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$ with SiRNA CTL to $12.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ with SiRNA *SCN3B*, $p = 0.69$) (**Fig. 5D, middle panel**), neither elongation factor (from $7.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ with SiRNA CTL to $6.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$ with SiRNA *SCN3B*, $p = 0.48$) after 24 h of LSS (**Fig. 5D, right panel**). Taken together, these results demonstrated that when *SCN3B* expression is decreased under LSS, HUVEC are less aligned suggesting that Nav β 3 is important in cell alignment and length under LSS.

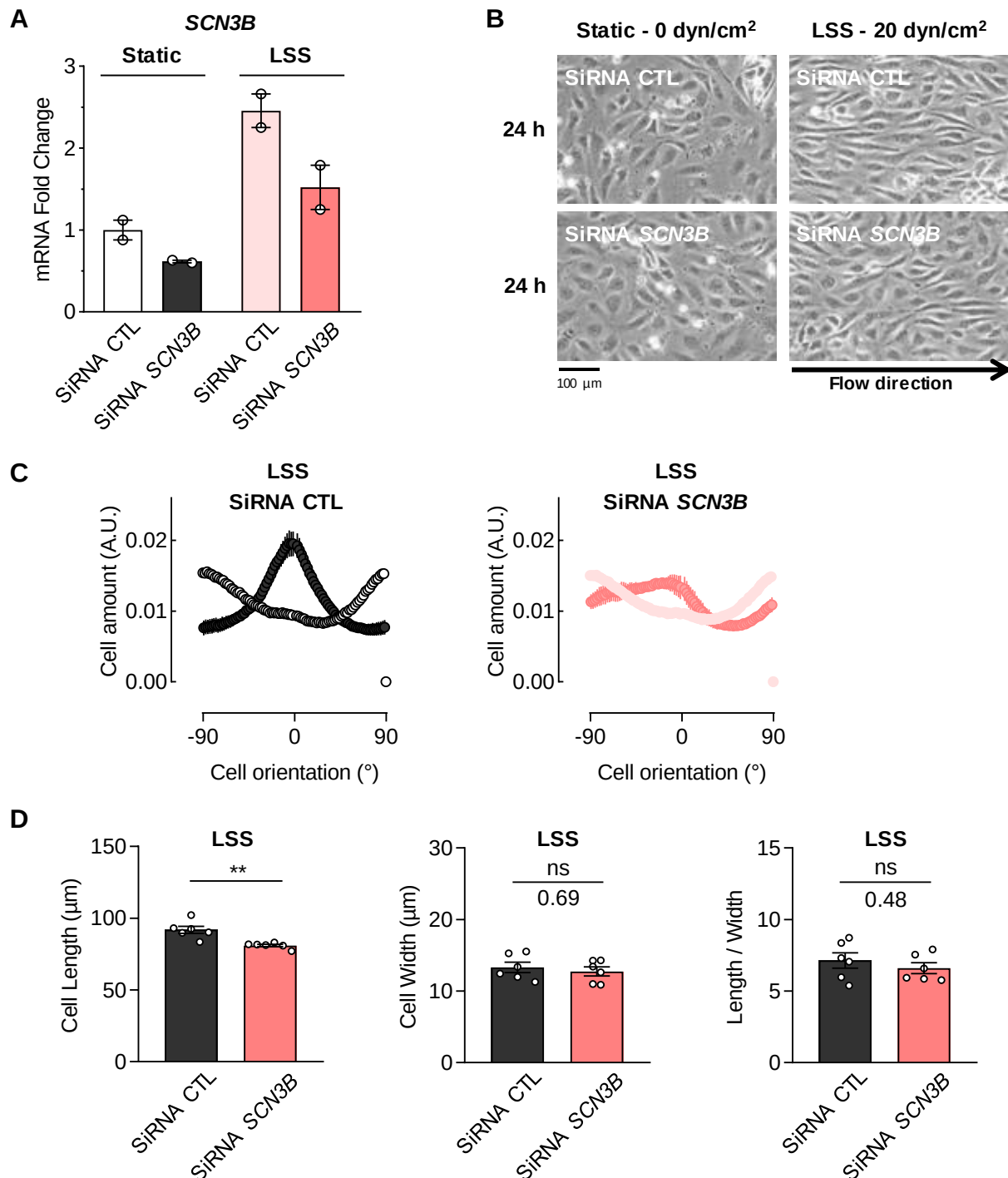


Figure 5. SiRNA *SCN3B* decreased alignment and length of HUVEC after 24 h of LSS.

(A) mRNA expression of *SCN3B* in static or LSS (20 dyn/cm² - 24 h) conditions in HUVEC transfected with SiRNA Control (SiRNA CTL) or SiRNA against *SCN3B* (SiRNA *SCN3B*). Values of *SCN3B* mRNA fold change are expressed as mean $\pm$ SEM for at least 2 independent experiments and compared to static condition with SiRNA CTL, given the arbitrary value of 1 using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method. (B) Representative phase contrast microscopy images of HUVEC cultivated under static condition (Static, 0 dyn/cm²) or under laminar shear stress (LSS, 20 dyn/cm²) after 24 h of flow with SiRNA CTL or SiRNA *SCN3B*. (C) HUVEC cell alignment quantification by local gradient orientation method with Fiji software after 24 h of LSS. 0° correspond to the angle of flow direction. (D) Elongation of HUVEC was determined as the cell length along flow direction (left panel) divided by cell width (middle panel) giving the elongation factor (right panel) after 24 h of LSS. Values are means $\pm$ SEM are shown (n=7). Two-tailed Mann-Whitney test have been performed. ns: non significant, ** $p < 0.01$.

3.6. Identification of protein partners of Navβ3 by proteomic analysis

To further characterize the role of Navβ3 in cell alignment, we aimed to identify its protein partners in EC. Thus, following transfection with pMyc-SCN3B or pCMV used as negative control, Myc tag fusion Navβ3 protein was immunoprecipitated and purified using anti-Myc-Trap magnetic agarose beads in COS-7 cells and TeloHAEC (**Fig. 6A and B**). The immunoprecipitated Navβ3 protein in COS-7 cells was used for pull-down assay using whole HUVEC protein lysate before LC-MS/MS analysis (**Fig. 6A**) whereas in TeloHAEC, the intrinsic proteins bound to Navβ3 were directly subjected to LC-MS/MS (**Fig. 6B**). In both set of experiments and in comparison to cells transfected with empty plasmid (pCMV), Myc tag-Navβ3 proteins were immunoprecipitated either in COS-7 cells/HUVEC or TeloHAEC (**Fig. 6A and B**). Analysis with DDA approach allowed the identification of 510 potential partner proteins of Navβ3 in COS-7 cells/HUVEC and 289 Navβ3 protein interacts in TeloHAEC (**Fig. 6C**). Among these proteins identified, 51 belonging COS-7/HUVEC and fourteen from TeloHAEC were already described to be interacting partners of Navβ3 in the NCBI Bank among which 200 interactants of Navβ3 have been identified (**Fig. 6C**). Interestingly, COS-7/HUVEC and TeloHAEC shared 76 interacting proteins with Navβ3. To propose possible roles that Navβ3 could mediate through its partners in EC, a gene ontology (GO)-term enrichment analysis using ToppGene database with these 76 proteins shared was conducted, focusing on the four first GO-terms related to biological process and cellular component (**Fig. 6D**). All GO-terms of the biological process category of which ten to twenty Navβ3 interacting proteins belong each category were related to golgi vesicle transport, protein transport, endomembrane system organization and establishment of protein localization. Concerning cellular component, organelle subcompartment, endoplasmic reticulum (ER) membrane, ER subcompartment and nuclear outer membrane-ER network were the GO-terms identified and which for each thirty to forty Navβ3 interacting proteins have been related to each GO-terms category (**Fig. 6D**). Among these 76 potential partner proteins, eleven have been already described in the NCBI Bank including mTOR which is found in all cellular component GO-Terms.

Since mTOR is the key signaling pathway involved in the regulation of autophagy and since autophagy is a crucial component for cell alignment upon shear stress (Vion et al. 2017; Park et al. 2019; Meng et al. 2022), we next decided to characterize the interaction between Nav β 3 and mTOR in EC (**Fig. 6E and F**). Immunoprecipitation of Myc tag-Nav β 3 protein were performed in both COS-7 cells/HUVEC and TeloHAEC transfected either with pCMV or pMyc-SCN3B. The protein mTOR was detected only in cells transfected with pMyc-SCN3B in input and IP conditions and not in cells transfected with negative control plasmid (pCMV) in COS-7/HUVEC (**Fig. 6E**) and TeloHAEC (**Fig. 6F**). Thus, our data demonstrated that among Nav β 3 partners identified by proteomic approach, mTOR protein interacts physically with Nav β 3 in EC, suggesting the implication of Nav β 3 in mTOR signaling. Altogether, our data suggest that Nav β 3, through a direct interaction with mTOR, inhibit it and indirectly allow the activation of autophagic flow necessary for cell alignment in response to physiological flow.

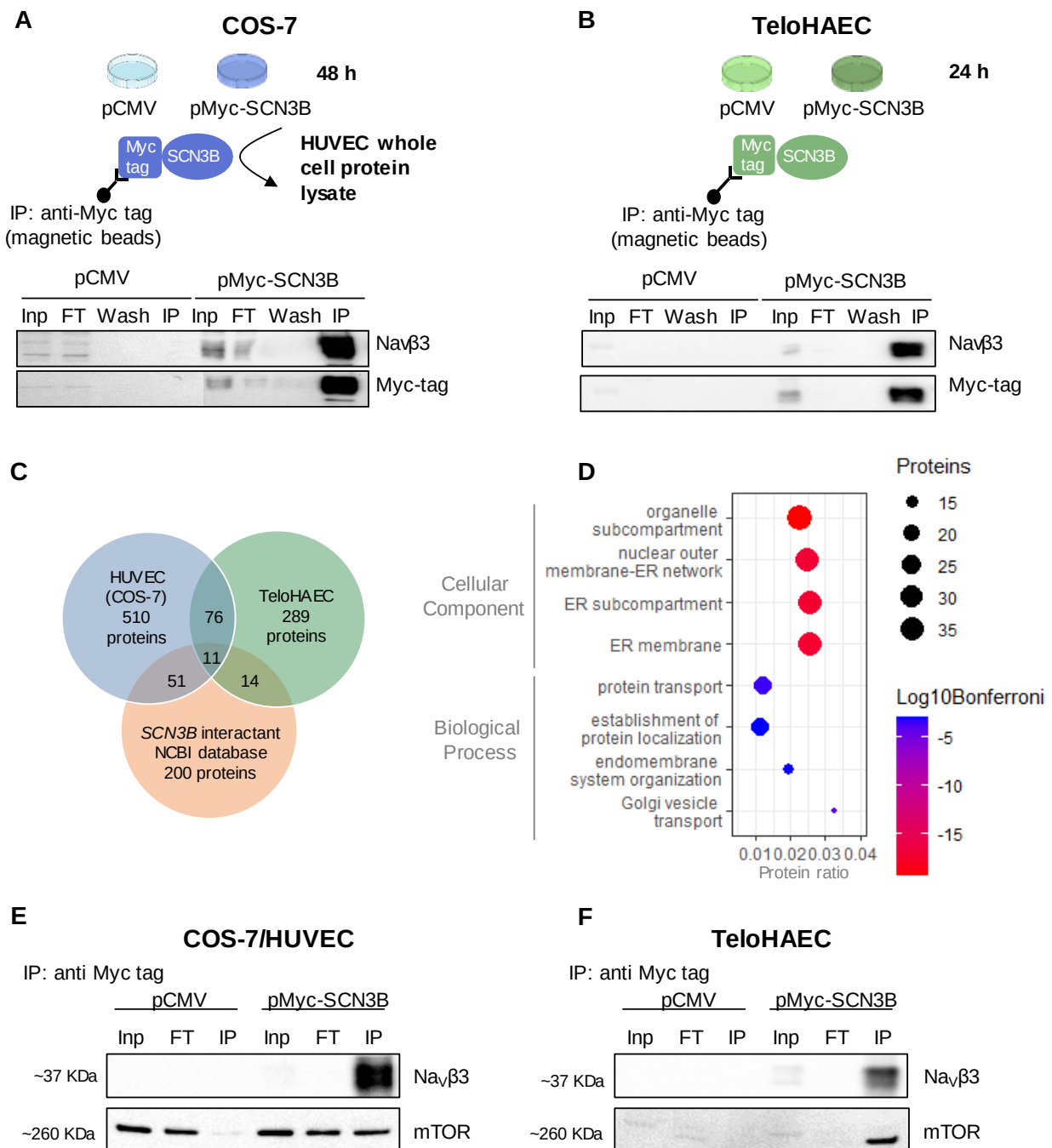


Figure 6. Proteomic analysis of Navβ3-interacting partners.

Schematic representation of the Navβ3 immunoprecipitation (IP) procedure. pMyc-SCN3B plasmid was used to overexpress Navβ3 in COS-7 for 48 h (A) or in TeloHAEC for 24 h (B). pCMV (empty vector) plasmid was used as negative control. After 24 h or 48 h, Myc tag-Navβ3 has been immunoprecipitated using anti-Myc tag magnetic beads in COS-7 and used for pull-down experiment using HUVEC whole cell protein lysate (A) or in TeloHAEC to looking for direct partners (B). Immunoblot representation after using anti-Myc tag for IP and anti-Navβ3 or anti-Myc tag antibodies for western blot. Input corresponded to whole cell extract proteins after transfection, FT correspond to Flow through i.e. the supernatant recuperated after incubation with magnetic beads, Wash permit to check that Navβ3 protein is still attached to beads and IP is the boiled beads in order to detach beads to Navβ3. Images are representative of the 3 replicates. (C) Venn Diagram indicating the number of proteins identified in HUVEC and TeloHAEC after mass spectrometry (MS) screens. Among the 76 potential Navβ3 binding partners found in common in COS-7/HUVEC and TeloHAEC,

11 have been already described to be Nav β 3 protein partners including mTOR. **(D)** Bubble plots of Gene ontology (GO)-term enrichment analysis of the 76 potential Nav β 3 binding partners. The vertical items are the name of the four first GO-terms belonging biological process and cellular component categories. The horizontal axis indicates the protein ratio (number of proteins in our dataset compared to number of proteins in annotation). The bubble size and colour intensity reflect the number of proteins and the numerical value of Log10 Bonferroni, respectively. **(E)** Representative Nav β 3 and mTOR immunoblots of immunoprecipitated Nav β 3 with Myc tag antibody in HUVEC (COS-7) and TeloHAEC. Immunoblots are representative of the 3 replicates.

Supplementary Table

Gene name	GenBank accession number	Protein name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>SCN1A</i>	NM_001165963	Na _v 1.1	CCTACATCGCCTGTTGGAC	TCAGTTTCAGTGGTTGTTCCA
<i>SCN2A</i>	NM_001040142	Na _v 1.2	CCATGGAATTGGTTGGATT	TGCTCGGAGAACTCTGAATG
<i>SCN3A</i>	NM_001081676	Na _v 1.3	TTTTACGTTTCTTCGTGATCCA	ATTGCCAGGTCCACAAAC
<i>SCN4A</i>	NM_000334	Na _v 1.4	CAGCCTGAGGAGTGCTTCA	CGCAGAGTCCACCACTTCTT
<i>SCN5A</i>	NM_001160160	Na _v 1.5	CTGCACGCGTTCACCTTTCCT	CAGCCAGCTTCTTCACAGACT
<i>SCN8A</i>	NM_001177984	Na _v 1.6	AGATCAGATGGAAGAACGTGAAG	ATGTCCATCCAGCCTTTGAA
<i>SCN9A</i>	NM_001365536	Na _v 1.7	CAACTTTTAAGGGATGGACGA	TCATATTTGGGCTGCTTGCT
<i>SCN10A</i>	NM_001293306	Na _v 1.8	TCACGTACCTGAGAGATCCTTG	TCCCACGGAGATCTATGCT
<i>SCN11A</i>	NM_001349253	Na _v 1.9	TCCTCCTTTTGAGAGAGTCTGG	TTGGTTTGCTCTAGGAGCTGT
<i>SCN1B</i>	NM_001037	Na _v β1	GGCACTGAGGAGTTTGCAAG	GATCCTGCAGGTCTTTGGTG
<i>SCN2B</i>	NM_004588	Na _v β2	ACGGGGCTCAGTCTCTTTT	TCAGAGCCATTGAGGACGTT
<i>SCN3B</i>	NM_001040151	Na _v β3	GATTGTTTCCCCTGGCTTCT	GTCTCCGACGGCACTTCC
<i>SCN4B</i>	NM_001142348	Na _v β4	GTCATCGGGCTCCTCATC	GGAGCTCACGAGACACTCCTT
<i>KLF2</i>	NM_016270	KLF2	AGGAGGTGACCAGTCTGGAA	AGGAGGTGACCAGTCTGGAA
<i>KLF4</i>	NM_001314052	KLF4	TTCCCATCTCAAGGCACACC	GCGAATTTCATCCACAGCC
<i>KLF6</i>	NM_001300	KLF6	AAGCTCCCACTTGAAAGCACA	AAAACGCCACTCACACCCTT
<i>NOS3</i>	NM_000603	eNOS	GACCCTCACCGCTACAACAT	CCGGGTATCCAGGTCCAT
<i>VCAM1</i>	NM_001078	VCAM1	TGCACAGTGACTTGTGGACATA	GCCACCCTCATCTCGATT
<i>ICAM1</i>	NM_000201	ICAM1	AACCTCAGCCTCGCTATGG	GATGACTTTTGAGGGGGACA
<i>TBP</i>	NM_003194	TBP	GAGCCAAGAGTGAAGA ACAGTC	GCTCCCCACCATATTCTGAATCT
<i>UBC</i>	NM_021009	UBC	GGGATTTGGGTGCGAGTTCT	CACGAAGATCTGCATTGTCAAGT

Supplementary Table S1. Table of primers used for RT-qPCR.

References

- Andrikopoulos, Petros, Scott P. Fraser, Lisa Patterson, Zahida Ahmad, Hakan Burcu, Diego Ottaviani, James K. J. Diss, Carol Box, Suzanne A. Eccles, et Mustafa B. A. Djamgoz. 2011. « Angiogenic Functions of Voltage-Gated Na⁺ Channels in Human Endothelial Cells: Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (19): 16846-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187559>.
- Baeyens, Nicolas, Chiroosree Bandyopadhyay, Brian G. Coon, Sanguk Yun, et Martin A. Schwartz. 2016. « Endothelial Fluid Shear Stress Sensing in Vascular Health and Disease ». *Journal of Clinical Investigation* 126 (3): 821-28. <https://doi.org/10.1172/JCI83083>.
- Bustin, Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. « The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments ». *Clinical Chemistry* 55 (4): 611-22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Catterall, William A. 2012. « Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology ». *The Journal of Physiology* 590 (Pt 11): 2577-89. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204>.
- Catterall, William A., Alan L. Goldin, et Stephen G. Waxman. 2005. « International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels ». *Pharmacological Reviews* 57 (4): 397-409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>.
- Chatterjee, Shampa. 2018. « Endothelial Mechanotransduction, Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways ». *Frontiers in Physiology* 9 (juin): 524. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00524>.
- Conway, Daniel E, et Martin A Schwartz. 2015. « Mechanotransduction of Shear Stress Occurs through Changes in VE-Cadherin and PECAM-1 Tension: Implications for Cell Migration ». *Cell Adhesion & Migration* 9 (5): 335-39. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.968498>.
- Deanfield, John E., Julian P. Halcox, et Ton J. Rabelink. 2007. « Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance ». *Circulation* 115 (10): 1285-95. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>.
- dMIQE Group, et Jim F. Huggett. 2020. « The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020 ». *Clinical Chemistry* 66 (8): 1012-29. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa125>.
- Gerhold, Kristin A., et Martin A. Schwartz. 2016. « Ion Channels in Endothelial Responses to Fluid Shear Stress ». *Physiology* 31 (5): 359-69. <https://doi.org/10.1152/physiol.00007.2016>.
- Givens, Chris, et Ellie Tzima. 2016. « Endothelial Mechanosignaling: Does One Sensor Fit All? ». *Antioxidants & Redox Signaling* 25 (7): 373-88. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6493>.
- Janoštiak, Radoslav, Andreea Csilla Pataki, Jan Brábek, et Daniel Rösler. 2014. « Mechanosensors in Integrin Signaling: The Emerging Role of P130Cas ». *European Journal of Cell Biology* 93 (10-12): 445-54. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.002>.
- Körner, Jannis, Jannis Meents, Jan-Philipp Machtens, et Angelika Lampert. 2018. « B1 Subunit Stabilises Sodium Channel Nav1.7 against Mechanical Stress: Nav B1 Subunit as Mechanical Stabiliser ». *The Journal of Physiology* 596 (12): 2433-45. <https://doi.org/10.1113/JP275905>.
- Kroon, Jeffrey, Niels Heemskerk, Martin J. T. Kalsbeek, Vivian de Waard, Jos van Rijssel, et Jaap D. van Buul. 2017. « Flow-Induced Endothelial Cell Alignment Requires the RhoGEF Trio as a Scaffold Protein to Polarize Active Rac1 Distribution ». Édité par Manuel Théry. *Molecular Biology of the Cell* 28 (13): 1745-53. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-06-0389>.
- Maroni, Michele, Jannis Körner, Jürgen Schüttler, Beate Winner, Angelika Lampert, et Esther Eberhardt. 2019. « B1 and B3 Subunits Amplify Mechanosensitivity of the Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 ». *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 471 (11-12): 1481-92. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02324-w>.

- Maurya, Mano R., Shakti Gupta, Julie Yi-Shuan Li, Nassim E. Ajami, Zhen B. Chen, John Y.-J. Shyy, Shu Chien, et Shankar Subramaniam. 2021. « Longitudinal Shear Stress Response in Human Endothelial Cells to Atheroprone and Atheroprotective Conditions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (4): e2023236118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023236118>.
- Meng, Qingyu, Luya Pu, Mingran Qi, Shuai Li, Banghao Sun, Yaru Wang, Bin Liu, et Fan Li. 2022. « Laminar Shear Stress Inhibits Inflammation by Activating Autophagy in Human Aortic Endothelial Cells through HMGB1 Nuclear Translocation ». *Communications Biology* 5 (1): 425. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03392-y>.
- Morris, Catherine E. 2011. « Voltage-Gated Channel Mechanosensitivity: Fact or Friction? » *Frontiers in Physiology* 2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00025>.
- Nakajima, Hiroyuki, et Naoki Mochizuki. 2017. « Flow Pattern-Dependent Endothelial Cell Responses through Transcriptional Regulation ». *Cell Cycle* 16 (20): 1893-1901. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1364324>.
- Park, Seul-Ki, D. Taylor La Salle, James Cerbie, Jae Min Cho, Amber Bledsoe, Ashley Nelson, David E. Morgan, et al. 2019. « Elevated Arterial Shear Rate Increases Indexes of Endothelial Cell Autophagy and Nitric Oxide Synthase Activation in Humans ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 316 (1): H106-12. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00561.2018>.
- Strege, Peter R., Arnaldo Mercado-Perez, Amelia Mazzone, Yuri A. Saito, Cheryl E. Bernard, Gianrico Farrugia, et Arthur Beyder. 2019. « *SCN5A* Mutation G615E Results in Na^v 1.5 Voltage-Gated Sodium Channels with Normal Voltage-Dependent Function yet Loss of Mechanosensitivity ». *Channels* 13 (1): 287-98. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1632670>.
- Traub, O., T. Ishida, M. Ishida, J. C. Tupper, et B. C. Berk. 1999. « Shear Stress-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation Is Regulated by Sodium in Endothelial Cells. Potential Role for a Voltage-Dependent Sodium Channel ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (29): 20144-50.
- Vion, Anne-Clemence, Marouane Kheloufi, Adel Hammoutene, Johanne Poisson, Juliette Lasselin, Cecile Devue, Isabelle Pic, et al. 2017. « Autophagy Is Required for Endothelial Cell Alignment and Atheroprotection under Physiological Blood Flow ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (41). <https://doi.org/10.1073/pnas.1702223114>.
- Wolpe, Abigail G., Claire A. Ruddiman, Phillip J. Hall, et Brant E. Isakson. 2021. « Polarized Proteins in Endothelium and Their Contribution to Function ». *Journal of Vascular Research*, janvier, 1-27. <https://doi.org/10.1159/000512618>.

2. Étude 2 : Les HUVEC présentent des signatures protéiques distinctes en réponse à un flux laminaire athéroprotecteur ou oscillatoire athéropone

Dans ce second travail, nous avons étudié l'influence du shear stress sur le profil d'expression protéique global des HUVEC en utilisant les fonctionnalités séparatives performantes de la spectrométrie de masse basée sur le TIMS TOF (Timed Ion Mobility Spectrometry Time Of Flight). Ce dispositif assez récent permet d'ajouter une dimension séparative entre la dimension chromatographique et la séparation en masse des molécules analysées. De plus, cette technologie accroît considérablement la sensibilité de l'analyse et permet l'accès au protéome dit « profond » (plus de 7-8000 protéines) à partir de petites quantités de matériel biologique (200 ng). Enfin, la capacité d'analyse bio-informatique à l'aide du logiciel Spectronaut™ a permis d'exploiter les données « SWATH » désormais appelées DIA (Data Independent Analysis).

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'un shear stress laminaire (LSS) de 20 dyn/cm² correspondant à un flux physiologique athéroprotecteur, ou à un shear stress oscillatoire (OSS) de 20 dyn/cm² avec une fréquence de 1 Hertz, simulant un flux pathologique athéropone, pendant 24 heures en comparaison à des HUVEC cultivées de manière statique c'est-à-dire sans flux, sur le phénotype des CE. Les deux types de flux influent sur la morphologie des CE. En effet, en comparaison aux HUVEC cultivées de manière statique, nous avons montré que le LSS induit une elongation et un alignement des HUVEC dans la direction du flux, tandis qu'un OSS augmente la largeur des cellules et conduit à un changement de la morphologie des CE qui prennent une forme dite « pavée ».

L'analyse protéomique globale a été réalisée à partir des extractions de protéines totales, pour 4 réplicats biologiques par condition de culture *i.e.* LSS, OSS et Statique. Parmi les 5964 protéines identifiées, l'analyse LIMMA (Linear Models for Microarray Data) nous a permis de montrer que l'expression de 447 protéines est significativement modulée entre nos conditions de culture : statique, LSS et OSS. Nous avons identifié deux principaux clusters : le premier concerne les protéines dont l'expression est surrégulée, et le second regroupe les protéines dont l'expression est réprimée, par un LSS comparé aux conditions statique ou OSS. En conséquence, dans la catégorie des processus biologiques, les GO-terms regroupés sont liés au développement du vaisseau sanguin, à la morphogenèse et à l'adhésion cellulaire, et ceux associés aux constituants cellulaires font référence aux interactions cellule-cellule ou avec la MEC, et à la membrane plasmique.

La méthode SAM (Significance Analysis MicroArray) nous a ensuite permis de déterminer les protéines régulées différemment (DRP), entre les conditions LSS vs statique ou OSS vs statique, avec comme critères de fold-change une augmentation supérieure à 2 ou une diminution inférieure à 0,5 et une valeur de Q-value < 5%. Parmi ces DRP, nous avons retrouvé des protéines signatures du LSS avec KLF4 et eNOS qui voient leur expression augmentée dans la condition LSS vs Static mais non modulées par un OSS alors que la protéine pro-inflammatoire thrombospondine 1 (THBS1) voit son expression augmentée en OSS mais diminuée en LSS. L'enrichissement des GO-terms de ces DRP nous a montré que les processus biologiques intervenants lors d'un LSS sont associés à la physiologie de la CE tandis que ceux liés à un OSS sont plutôt associés à l'inflammation et au stress cellulaire. En parallèle, dans la catégorie des constituants cellulaires, nous avons observé une modulation de l'expression des protéines associées à la réorganisation de la MEC et à la membrane plasmique principalement lors du LSS.

Enfin, nous avons distingué deux groupes dans les DRP, les DRP dont l'expression est augmentée par un LSS et réprimée par un OSS qui pourraient être des marqueurs de l'athéroprotection, les DRP dont l'expression est réprimée par un LSS et augmentée par un OSS qui seraient des marqueurs de la physiopathologie de l'athérosclérose.

Ces protéines identifiées comme potentiels candidats intéressants à étudier sont détaillées dans la discussion de ce manuscrit.

HUVEC exhibits distinct proteomic signatures in response to atheroprotective and atheroprone shear stress

Léa Réthoré ^{1, #}, Benjamin Barré ^{2, #}, Anne-Laure Guihot ¹, Linda Grimaud ¹, Coralyne Proux ¹, Alice Boissard ², Cécile Henry ², Catherine Guette ², François Guillonnet ², Daniel Henrion ¹, Christian Legros ^{1, #}, Claire Legendre ^{1, #, *}

¹ Univ Angers, INSERM, CNRS, MITOVASC, Equipe CarME, SFR ICAT, 49000 Angers, FRANCE

² Univ Angers, INSERM, CRCINA, ICO Cancer Center, 49000 Angers, FRANCE

[#] These authors contributed equally to this work.

^{*} Author to whom correspondence should be addressed.

claire.legendre@univ-angers.fr. Tel.: +33 244 688 286

1. Introduction

Endothelial cells (EC), lining inner wall of blood vessels, play critical roles in vascular homeostasis by regulating vascular tone, monocyte adhesion and vascular permeability, coagulation with platelet aggregation and angiogenesis. EC are considered as a keeper of cardiovascular health since endothelial dysfunction can lead to many cardiovascular pathologies such as arterial hypertension or atherosclerosis (Baeyens et al. 2016). The main stimulus to keep functional endothelium is the fluid shear stress exerted by the laminar blood flow called laminar shear stress (LSS). This LSS exerts a frictional force parallel to the blood vessel between 10 to 60 dyn/cm² according to the type of arteries and concerns uniform and linear vessels (Chatterjee 2018). In opposition, a disturbed and turbulent oscillatory flow called oscillatory shear stress (OSS) takes place at the bifurcation or curvature of the vessels and will participate to endothelial dysfunction. As such, LSS and OSS control phenotype and function of EC in an opposite way.

The ability of EC to perceive these external mechanical stimuli and transduce them to intracellular biochemical pathways allowing a cellular adaptive response is called mechanotransduction. This

response includes plasmalemmal mechanosensors, signaling pathways and mechanosensitive transcription factors (MSTF) that cooperate all together to lead to the expression of various endothelial genes.

LSS is associated to structural cell reorganization leading to EC alignment and orientation in the same direction that flow (Kroon et al. 2017). This cell alignment by LSS is govern by Rho pathway (Shiu et al. 2004) and is accompanied by the subsequent activation of the MSTF KLF2 (Parmar 2005); (Dekker et al. 2002) and KLF4 (Hamik et al. 2007). This lead the induction of genes necessary for EC stability and quiescence, including *NOS3* encoding for eNOS which promotes vasodilation and prevents inflammation (Nakajima et Mochizuki 2017). Hence, LSS protects against atherosclerosis by contributing to atheroprotective EC phenotype.

In contrary, OSS activates preferentially KLF6, HIF-1 α and NF-kB pathways that cooperate to promote phenotypic remodeling associated with endothelial activation and dysfunction with activation of inflammatory mediators favourable to the development of atherosclerotic plaques (Nakajima et Mochizuki 2017).

Despite molecular pathways including governing EC phenotype related to either LSS or OSS are relatively well characterized through transcriptomic approaches (Ajami et al. 2017; Maurya et al. 2021; Morel et al. 2021), proteomic analysis are more rare (Béguin et al. 2020) and have never focus on proteomic signatures and main biological functions affected by physiological flow (LSS) and pathological flow (OSS).

In this work, we aimed to characterize the proteomic signatures of EC subjected to LSS and OSS in order to identify differentially regulated proteins (DRP). Thereby, we used the EC model, HUVEC and by a global quantitative proteomic analysis we seeked for proteins where expression could be associated to atheroprotection or proatherogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

RapiGest SF buffer was obtained from Waters Corporation (186001861, Milford, MA, USA). All other reagents and solvents were obtained from Sigma-Aldrich Merck (Saint-Louis, MO, USA) or Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.2. Endothelial cell culture and shear stress procedure

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) (Cat No. C-12203, PromoCell, Heidelberg, Germany) from pooled donors were cultivated in endothelial basal medium (EBM-2) (Cat No. C-22211, PromoCell) supplemented with EGM-2 growth factors (Cat No. C-22211, PromoCell) in an incubator at 37°C with 5% of CO₂. Cells from passages 2 to 5 were used for flow experiments. The Ibidi® pump system (Fluidic Unit: Cat No. 10902; Perfusion set 15 cm, ID 1.6 mm: Cat No. 10962; slide I 0.4 Luer: Cat No. 80176, Ibidi GmbH, Munich, Germany) was used to expose EC to flow. The pump system was set up according to the Ibidi manufacturer's instruction (AN 13: HUVEC under Perfusion) in an incubator at 5% CO₂ and 37°C. The flow parameters (31.9 mbar pressure, 21.70 mL/min flow rate, 0.007 dyn x s/cm² viscosity) were calibrated to generate a laminar shear stress (LSS) of 20 dyn/cm² and an oscillatory shear stress (OSS) of 20 dyn/cm² with a frequency of 1 Hz. HUVEC were seeded with 90% confluency onto μ -slides 0.4 Luer (Cat No. 80176, Ibidi) 24 hours before starting flow experiments and incubated at 37°C 5% CO₂. The next day, the μ -slides with HUVEC were connected and controlled by the Ibidi® pump system and subjected to shear stress (LSS or OSS) for 24 hours. Static conditions were exposed to complete growth medium without any medium circulation, and the medium of static slides were changed each day. Afterwards, the EC were washed with cold PBS, scraped in the appropriate buffer and collected for protein extraction.

2.3. Measurement of cell alignment and elongation

Cell alignment was assessed using local gradient orientation method with the directionality plugins in ImageJ – Fiji software. Briefly, to quantify cell alignment with the flow, we calculated the angle formed between the orientation vector of the flow direction and the vector given by orientation of the

main axis of each cell. When cell is totally aligned with the flow, the angle value is 0°. Quantification of cell elongation factor (cell length along flow direction divided by cell width) was performed with Image J software where 15 cells per field were counted of each replicate of each condition (static, LSS or OSS).

2.4. Total Protein extraction and membrane protein enrichment

For whole cell lysate, HUVEC were washed with cold PBS, incubated 10 min on ice in RapiGest SF buffer reconstituted in 50 mM ammonium bicarbonate, and collected for mass spectrometry.

For membrane enrichment, HUVEC exposed to flow (LSS or OSS) were washed with cold PBS, incubated 10 min on ice in buffer containing 50 mM TrisHCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 250 mM sucrose supplemented with Halt™ Protease and EDTA (78444, Thermo Fisher Scientific). The clear lysate was collected after a centrifugation at 10,000 g for 10 min at 4°C and drop in an open-top thickwall polycarbonate tube (No. 343775; Beckman Coulter, Brea, CA, USA), then ultra-centrifuged at 150,000 g for 2 hours at 4°C (TLA-100 fixed angle-rotor, Beckman Coulter). The pellet was resuspended in the RapiGest SF buffer to obtain a membrane fraction and collected for mass spectrometry.

2.5. Sample Preparation and MS/MS analysis

For MS/MS analysis, cell pellets were resuspended in 200 µL of Rapigest SF (Waters), and dithiothreitol (DTT) was added to a final concentration of 5 mM (AppliChem, Darmstadt, Germany). Samples were incubated in a thermo shaker at 95°C for 1 hour, and sonication performed twice using an ultrasonic processor (130W, 20 KHz) (Thermo Fisher Scientific). Subsequently, cysteine residues were alkylated by adding 200 mM S-Methyl methanethiosulfonate (MMTS) to a final concentration of 10 mM (incubated at 37°C for 10 min). Sequencing-grade trypsin was added in a ratio ≥ 2 µg per 100 µg of protein (incubated at 37°C overnight). The reaction was stopped with formic acid (9% final concentration), and incubated at 37°C for one hour, and the acid-treated samples were centrifuged at 16,000 g for 10 minutes. Salts were removed from the supernatant and collected in new reaction microtubes using self-packed C18 STAGE tips. Peptide concentrations were finally determined with

the Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). 200 ng of each sample were analyzed by LC-MS/MS with a nanoHPLC UHPLC system (Bruker Daltonik GmbH, Billerica, MA, USA) with an Aurora series reversed-phase C18 column (25 cm × 75 µm i.d., 1.6 µm C18, IonOpticks) heated to 50°C and coupled to a TimsTOF Pro2 (Bruker Daltonik GmbH). A gradient of 2–35% B, where mobile phase A was 0.1% formic acid in water and B was 0.1% formic acid in acetonitrile, was used for 1 hour. The total run times, including a ramp up to 35–95% B to clean the column, and prep for the next sample. Measurements were acquired in DIA-PASEF mode (data independent acquisition parallel accumulation serial fragmentation). The DIA-PASEF mode was used with a 60 min gradient on 200 ng of peptides. The m/z range default was 400–1201 with an IM range of 0.6–1.43 1/K0 [V s/cm²], which corresponded to an estimated cycle time of 1.80 s. DIA-PASEF windows, and collision energy were also left to default with a base of 0.85 1/K0 [V s/cm²] set at 20 eV and 1.30 1/K0 [V s/cm²] set at 59 eV. DIA windows are listed in supporting information in Supplemental Table 1. TIMS and mass calibration were performed linearly using three calibrant ions at 622, 922, and 1222 m/z (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) at different ranges to match $\Delta 1/K0$ of each respective set of ranges. Mass spectrometry data were analyzed using Spectronaut™ v16.0 (Biognosys AG, Schlieren, Switzerland). The direct DIA workflow in Spectronaut™ was used for analyzing the DIA-PASEF dataset with no need to build a library from the DDA runs (library-free) with default analysis settings. Retention time prediction type was set to dynamic iRT and calibration mode was set to automatic. These settings also included mutated decoy method and cross run normalization was enabled. The FDR (false discovery rate) was estimated with the mProphet approach and q-value cut-off for both precursor and protein was set to 1%. Interference correction was enabled for quantification which required a minimum of 2 precursor ions and 3 fragment ions. The term protein refers to protein groups as determined by the algorithm implemented in Spectronaut™. The statistical testing for differential abundance is performed by paired Student's t-test using Spectronaut™.

2.6. Statistical Analysis

The statistical analyses of cell length and width were expressed as mean $\pm$ SEM and performed using GraphPad Prism 7.02 (La Jolla, CA, USA) software. To analyse the distribution of data, the Shapiro-Wilk test was used, and to analyse the significance between two groups, a non-parametric Mann-Whitney test was used. Probability values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Laminar Shear stress (LSS) induced HUVEC elongation and alignment in the direction that flow in comparison to Static or Oscillatory Shear Stress (OSS) conditions.

First, we compared the phenotype of HUVEC subjected to 24 h LSS and OSS to that of HUVEC kept in static condition for the same duration. As shown by microscopic photographs, only LSS exposure induced cellular morphology modifications, such as elongation, and alignment in the direction of flow, compared to HUVEC cultivated in static condition (no flow, 0 dyn/cm²) or under OSS (**Fig. 1A**). Moreover, in static condition, some EC were detached, and floated in cell culture medium compared to LSS or OSS conditions, because of the lack of circulation of cell medium by the pump. Alignment analyses showed that after 24 h of LSS, a majority of EC were aligned through the axis 0° corresponding to the orientation of the flow direction, while HUVEC cultivated in static condition or with OSS were randomly distributed all along the cell orientation axis (**Fig. 1B**). Furthermore, cell length was significantly higher (p -value<0.05) in LSS compared to static and OSS conditions (65.9 ± 1.4 μ m in LSS versus 30.6 ± 1.2 μ m for Static and 36.1 ± 1.1 μ m for OSS, respectively) (**Fig. 1C, left panel**) whereas cell width was significantly smaller in LSS (p -value<0.05) in comparison to static and OSS conditions (14.0 ± 0.5 μ m in LSS versus 17.1 ± 0.2 μ m for Static and 22.0 ± 0.5 μ m for OSS, respectively) (**Fig. 1C, middle panel**). Then, elongation factor (cell length/cell width) was 2.6-fold higher (p <0.05) in LSS condition than in static or OSS conditions (**Fig. 1C, right panel**). Taken together, these results show that physiological LSS induces a cell alignment and elongation of HUVEC in a direction of flow whereas pathological OSS does not.

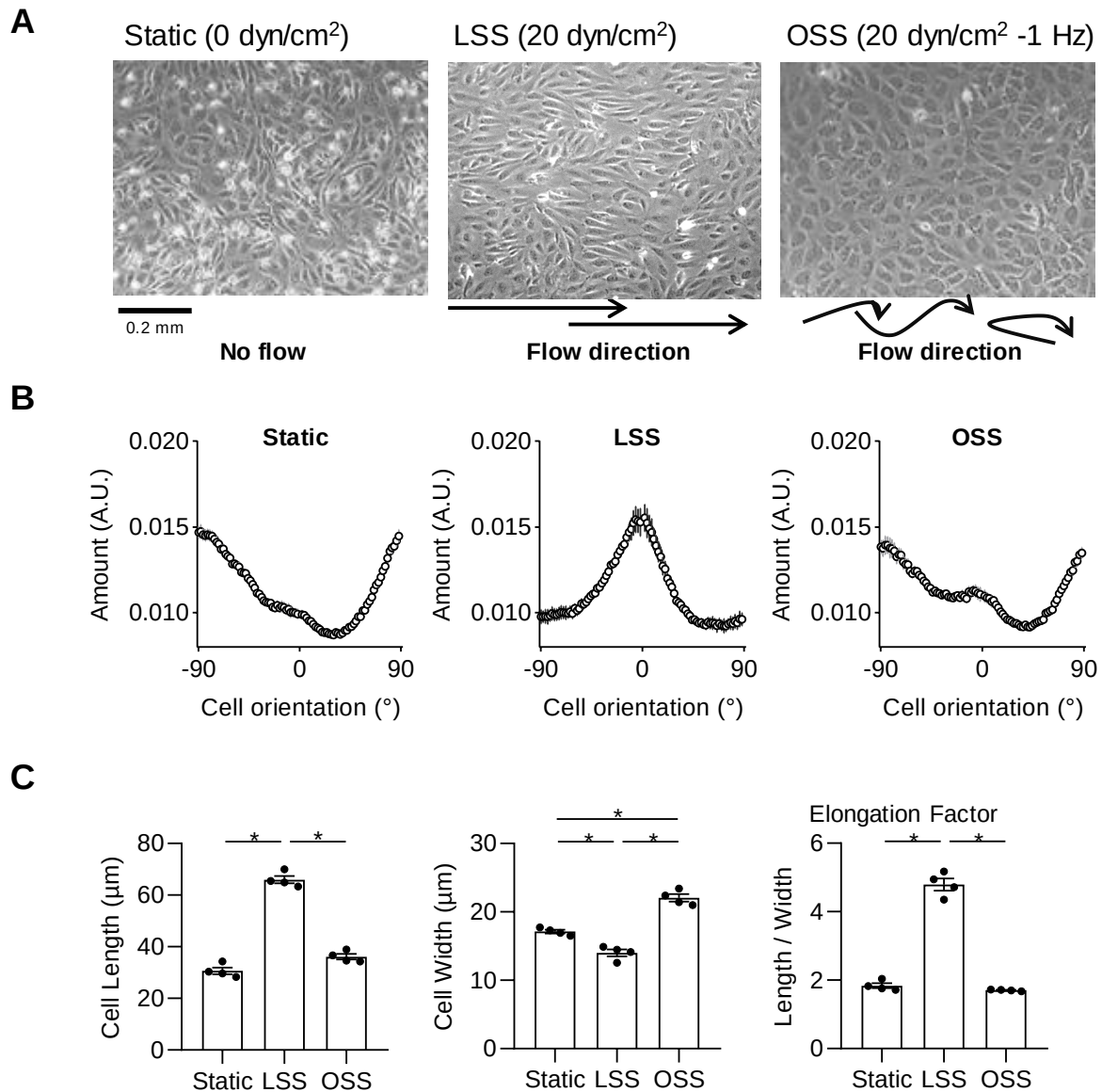


Figure 1. Laminar Shear stress (LSS) induced HUVEC elongation and alignment in the direction of flow in comparison to Static or Oscillatory Shear Stress (OSS) conditions. **A** Representative microscopic photographs of HUVEC cultivated under static condition *i.e.* without flow (0 dyn/cm²) or under LSS condition (20 dyn/cm²) or OSS condition (20 dyn/cm², with a frequency of 1 Hz) during 24 hours (original magnification x 40). **B** HUVEC alignment quantification was determined by measuring amount of cell orientation using local gradient orientation method with the directionality plugins in ImageJ (Fiji software) under static, LSS or OSS conditions. Angle 0° corresponds to the orientation of the flow direction. Mean $\pm$ SEM are shown (n=4). **C** HUVEC elongation was determined as cell length along flow direction (C, left panel) divided by cell width (C, middle panel) giving the elongation factor (C, right panel). Mean $\pm$ SEM are shown (n=4). * *p*-value<0.05, one-tailed Mann–Whitney test.

3.2. HUVEC cultivated upon static, LSS or OSS conditions present different protein expression profiles.

The DIA (data independent acquisition) proteomic analysis of HUVEC cultivated under static or shear condition and DIA analysis, led to the identification of 5934 proteins. Principal component analysis (PCA) performed with MetaboAnalyst platform showed that differences in protein profiles between groups with four reproducible replicates were found (**Fig. 2A**). Indeed, the differences within the four groups of samples were small, whereas the between-group differences were large, indicating that the quality of proteomic results was high. Then, heat map analysis showed that among the 447 proteins where expression was significantly changed, several clusters could be described (**Fig. 2B**). In accordance with cell morphology modifications, DRP heatmaps of HUVEC in OSS and static were more closed to each other than to those of HUVEC cultivated in LSS condition. Among the most important clusters of proteins in LSS compared to static and/or OSS condition, a first cluster concerned upregulated proteins and the second one gathered downregulated proteins. To better understand the functional consequences of these up/downregulations of protein expression, a gene ontology (GO)-term enrichment was conducted (**Fig. 2C and D**). All GO-terms of biological process category were related to blood vessel development and morphogenesis (blood vessel, tube and vasculature development and blood vessel and tube morphogenesis as well as circulatory system development) except for one which was related interestingly to cell adhesion with 95 proteins from our data set belonging to this GO-term (**Fig. 2C**). Accordingly, cellular component GO-term enrichment was mainly related to extracellular matrix (ECM) and cell-cell interactions with ECM and collagen-containing ECM but also cell surface, external encapsulating structure and basement membrane such as plasma membrane region (**Fig. 2D**).

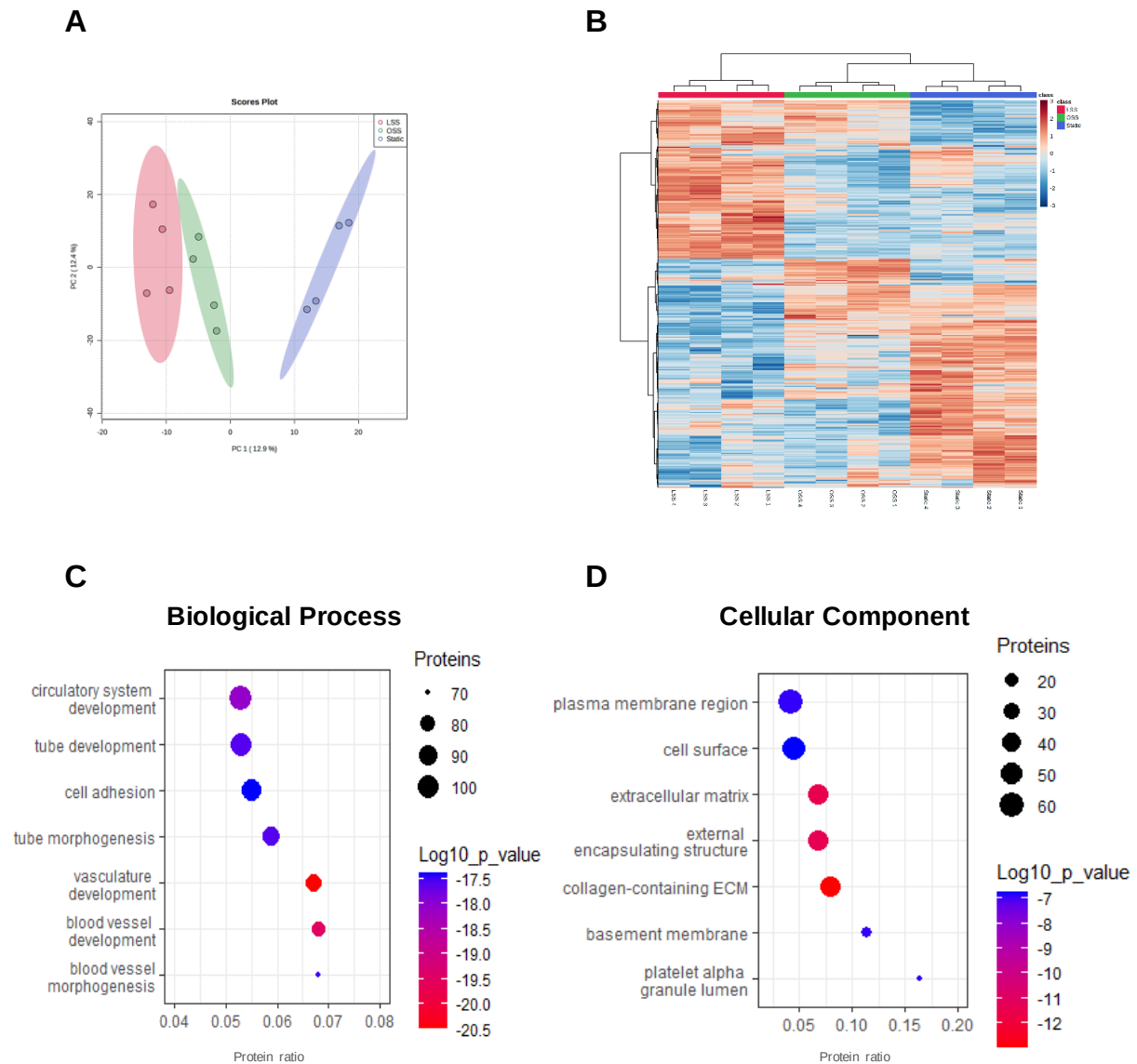


Figure 2. Proteomic analysis of HUVEC cultivated under Static, LSS or OSS conditions.

A Principal component analysis of three groups (n=4 for each group) where 5934 proteins were quantified. HUVEC were cultivated under static (Static), laminar shear stress (LSS) or oscillatory shear stress (OSS) conditions for 24 h. **B** Heatmap representation of the significant 447 differentially regulated proteins (DRP) in each group. Z-scored intensities are depicted in which red and blue represent increased and decreased values, respectively. Bubble plots of Top seven Gene Ontology (GO)-terms enrichment analysis of the significant 447 DRP for Biological Process (**C**) and Cellular Component (**D**). The vertical items are the name of the GO terms. The horizontal axis indicates the protein ratio (number of proteins in our dataset compared to number of proteins in annotation). The bubble size and colour intensity reflect the protein number and the numerical value of Log10 (p -value), respectively.

3.3. LSS and OSS modified endothelial cell protein expression and impact different GO-terms related to biological process and cellular content.

Since HUVEC cultivated upon static, LSS or OSS conditions present different protein expression profiles, we decided to determinate the differentially regulated proteins (DRP) by comparing protein expression in LSS *versus* (vs) static condition and OSS vs static condition using Significance Analysis of Microarray (SAM) method. Among the 5934 identified proteins, 199 DRP were corresponded to LSS vs static condition containing 79 upregulated DRP and 120 downregulated DRP (**Fig. 3A**). When OSS condition was compared to static condition, 83 DRP were counted with only 26 DRP whose expression were increased and 57 whose expression were decreased (**Fig. 3B**).

The peptidase inhibitor 16 (PI16), inhibitor of MMP2 (matrix metalloproteinase-2), was upregulated by LSS with the highest FC value (13.8) whereas its expression was unchanged by OSS (FC=1.1) (**Fig. 3A and B**). KLF4 and NOS3 expressions were increased by LSS with FC values of 5.9 and 2.1 respectively whereas expression of these proteins, were not modified by OSS (FC values of 0.7 for KLF4 and 0.9 and for NOS3). In addition, anti-inflammatory thrombospondin 1 (THBS1) expression was strongly repressed by LSS (FC=0.1) but induced by OSS (FC=1.7) (**Fig. 3A**). However, some protein expressions were upregulated or downregulated either by LSS or OSS such as Heme oxygenase 1 (HMOX1) where expression was increased by LSS (FC value of 10.0) as well as by OSS (FC value of 7.9). Interleukin 33 (IL33) expression was decreased by both shear stress with a FC value of 0.2 for LSS and 0.1 for OSS.

GO-terms enrichment analysis was also conducted for DRP found in LSS vs Static and OSS vs Static comparisons (**Fig. 3C and D**). Biological process category highlighted that LSS vs Static shared almost all the same GO-term names found with heat map analysis (**Fig. 2C**) *i.e.* blood vessel, tube and vasculature development, blood vessel and tube morphogenesis as well as circulatory system development. Only cell adhesion GO-term was not found in LSS vs Static in comparison to heat map data set in favor of angiogenesis (**Fig. 3C**). OSS vs Static condition led to different to biological process signature where response to hypoxia/decreased oxygen levels were found as well as response

to nutrient levels, wound healing and response to wounding (**Fig. 3C**). Taken together, biological process GO-term enrichment shows that LSS impact GO-terms in link with endothelial physiology whereas OSS impact GO-terms in link with cellular stress and inflammation.

Concerning cellular component, more GO-terms were shared between LSS vs Static and OSS vs Static including ECM, collagen-containing ECM and external encapsulating structure (**Fig. 3D**). Indeed, these three terms were also in common with GO-terms from heatmap analysis (**Fig. 2D**). Interestingly, among GO-terms not in common, collagen trimer, caveola, membrane microdomain and membrane raft were only found in LSS vs Static comparison whereas GO-term in link to kinetochore structure (NMS and Ncd80 complexes), mitochondrial respiratory chain complex II with succinate dehydrogenase complex (SDHB and SDHD) and laminin-5 complex with LAMA5 and LAMB3 were found only in OSS vs Static (**Fig. 3D**). As such, LSS and OSS led to different cellular component reorganization, in link with interaction with ECM (ECM, collagen-containing ECM, collagen trimer) and plasma membrane reorganization (caveola, membrane raft, membrane microdomain, external encapsulating structure) for LSS and only in link with ECM and kinetochore structure and subsequent cell division for OSS.

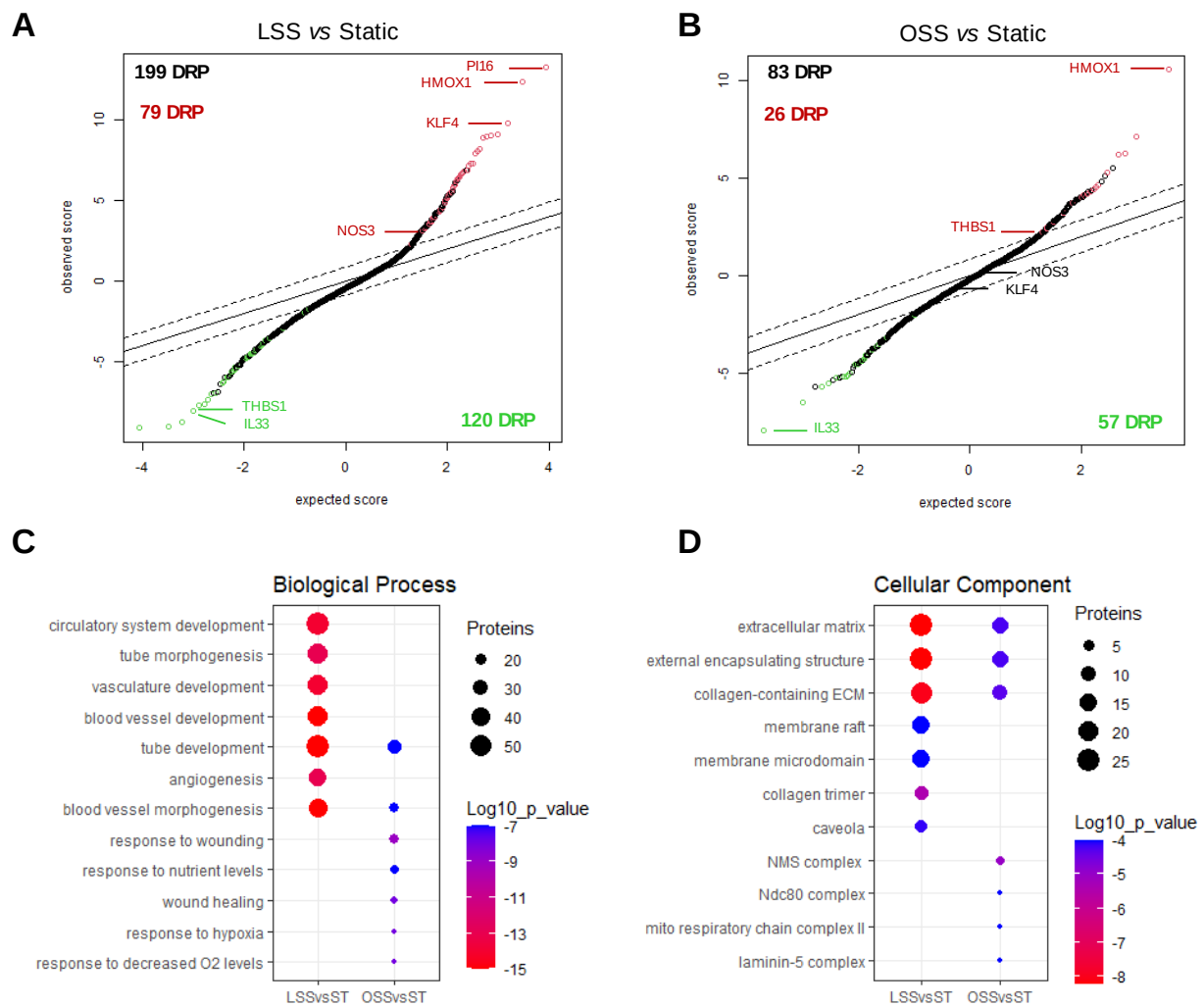


Figure 3. Differentially regulated proteins (DRP) of HUVEC LSS vs Static or OSS vs Static comparisons.

Significance Analysis of Microarray (SAM) plots with the numbers of DRP with a fold change of 2-fold in red and 0.5-fold in green ($\text{Log}_2 \text{FC} > 1$ or < -1 , respectively) and q -value $< 5\%$ in LSS vs Static condition (A) or OSS vs Static condition (B). Some DRP names are indicated in plot. ToppGene Bubble plots of Gene ontology (GO)-terms enrichment analysis of the significant DRP for biological process (C) and cellular component (D). The vertical items are the name of the GO-terms related to biological process or cellular component. The horizontal axis indicates the comparison between LSS vs Static or OSS vs Static. The bubble size and color intensity reflect the protein number and $\text{Log}_{10} p$ -value, respectively.

References

- Ajami, Nassim E., Shakti Gupta, Mano R. Maurya, Phu Nguyen, Julie Yi-Shuan Li, John Y.-J. Shyy, Zhen Chen, Shu Chien, et Shankar Subramaniam. 2017. « Systems Biology Analysis of Longitudinal Functional Response of Endothelial Cells to Shear Stress ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (41): 10990-95.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1707517114>.
- Baeyens, Nicolas, Chiroosree Bandyopadhyay, Brian G. Coon, Sanguk Yun, et Martin A. Schwartz. 2016. « Endothelial Fluid Shear Stress Sensing in Vascular Health and Disease ». *Journal of Clinical Investigation* 126 (3): 821-28. <https://doi.org/10.1172/JCI83083>.
- Béguin, Eelke P., Esmée F.J. Janssen, Mark Hoogenboezem, Alexander B. Meijer, Arie J. Hoogendijk, et Maartje van den Biggelaar. 2020. « Flow-Induced Reorganization of Laminin-Integrin Networks Within the Endothelial Basement Membrane Uncovered by Proteomics ». *Molecular & Cellular Proteomics* 19 (7): 1179-92.
<https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.001964>.
- Chatterjee, Shampa. 2018. « Endothelial Mechanotransduction, Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways ». *Frontiers in Physiology* 9 (juin): 524.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00524>.
- Dekker, Rob J., Simone van Soest, Ruud D. Fontijn, Sonia Salamanca, Philip G. de Groot, Ed VanBavel, Hans Pannekoek, et Anton J. G. Horrevoets. 2002. « Prolonged Fluid Shear Stress Induces a Distinct Set of Endothelial Cell Genes, Most Specifically Lung Krüppel-like Factor (KLF2) ». *Blood* 100 (5): 1689-98. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0046>.
- Hamik, Anne, Zhiyong Lin, Ajay Kumar, Mercedes Balcells, Sumita Sinha, Jonathan Katz, Mark W. Feinberg, Robert E. Gerszten, Elazer R. Edelman, et Mukesh K. Jain. 2007. « Kruppel-like Factor 4 Regulates Endothelial Inflammation ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (18): 13769-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700078200>.
- Kroon, Jeffrey, Niels Heemskerk, Martin J. T. Kalsbeek, Vivian de Waard, Jos van Rijssel, et Jaap D. van Buul. 2017. « Flow-Induced Endothelial Cell Alignment Requires the RhoGEF Trio as a Scaffold Protein to Polarize Active Rac1 Distribution ». Édité par Manuel Théry. *Molecular Biology of the Cell* 28 (13): 1745-53. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-06-0389>.
- Maurya, Mano R., Shakti Gupta, Julie Yi-Shuan Li, Nassim E. Ajami, Zhen B. Chen, John Y.-J. Shyy, Shu Chien, et Shankar Subramaniam. 2021. « Longitudinal Shear Stress Response in Human Endothelial Cells to Atheroprone and Atheroprotective Conditions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (4): e2023236118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2023236118>.
- Morel, Sandrine, Sabine Schilling, Mannekomba R. Diagboug, Matteo Delucchi, Marie-Luce Bochaton-Piallat, Sylvain Lemeille, Sven Hirsch, et Brenda R. Kwak. 2021. « Effects of Low and High Aneurysmal Wall Shear Stress on Endothelial Cell Behavior: Differences and Similarities ». *Frontiers in Physiology* 12 (octobre).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.727338>.
- Nakajima, Hiroyuki, et Naoki Mochizuki. 2017. « Flow Pattern-Dependent Endothelial Cell Responses through Transcriptional Regulation ». *Cell Cycle* 16 (20): 1893-1901.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1364324>.
- Parmar, K. M. 2005. « Integration of Flow-Dependent Endothelial Phenotypes by Kruppel-like Factor 2 ». *Journal of Clinical Investigation* 116 (1): 49-58.
<https://doi.org/10.1172/JCI24787>.
- Shiu, Yan-Ting, Song Li, William A. Marganski, Shunichi Usami, Martin A. Schwartz, Yu-Li Wang, Micah Dembo, et Shu Chien. 2004. « Rho Mediates the Shear-Enhancement of Endothelial Cell Migration and Traction Force Generation ». *Biophysical Journal* 86 (4): 2558-65.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74311-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74311-8).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Avant propos : Les perspectives ont été intégrées à la partie discussion et afin de les différencier, elles seront identifiées par un changement de couleur du texte.

1. Partie 1 – Implication de la sous-unité Nav β 3 dans la mécanotransduction endothéliale

Au sein de ce travail, nous avons cherché tout d'abord à préciser l'expression des différentes isoformes des sous-unités α et β des canaux Nav, dans des modèles de CE humaines, puis à étudier les variations d'expression en condition de flux laminaire physiologique. Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle d'une sous-unité β des canaux Nav dans la réponse au flux des CE.

1.1. Validation du modèle

1.1.1. Les HUVEC et TeloHAEC s'alignent dans le sens du flux et activent la voie de signalisation athéroprotectrice lorsqu'elles sont exposées à un flux physiologique.

L'alignement et l'élongation des CE dans le sens du flux lors d'un shear stress laminaire (LSS) de 20 dyn/cm² ont été confirmés dans les HUVEC et ont été montrés pour la première fois dans les TeloHAEC. Dans les HUVEC principalement, et dans les TeloHAEC dans une moindre mesure, nous avons montré que le LSS à 4 jours a activé la voie de signalisation athéroprotectrice (*KLF2/KLF4* et *NOS3* en transcrits et KLF2 et eNOS en protéines) et a réprimé la voie athéropone (*KLF6* et *VCAM1* en transcrits). Ces données sont en accord avec la littérature pour les HUVEC (Maurya et al. 2021; Nakajima et Mochizuki 2017) et sont présentées de manière nouvelle pour les TeloHAEC, plaçant cette lignée de CE comme un nouveau modèle d'étude *in vitro* de la physiologie et du comportement des CE en réponse au flux, proche de la physiologie artérielle puisque ces CE sont issues d'aorte humaine (Krause et al. 2018; D'Onofrio et al. 2021).

1.1.2. Limites des modèles cellulaires utilisés

Bien qu'étant issues de veine ombilicale humaine, les HUVEC sont un modèle cellulaire primaire d'étude *in vitro* reconnu depuis de nombreuses années. Les TeloHAEC représentent un modèle plus proche de la physiologie artérielle puisque ces CE sont issues d'aorte humaine (Krause et al. 2018; D'Onofrio et al. 2021) néanmoins ces dernières ont été immortalisées par le virus SV40. Il est intéressant de noter que bien que les TeloHAEC s'alignent fortement en réponse à un LSS à 4 jours et ce dès les premières 24 heures, les voies de signalisation sont moins induites que pour les HUVEC, ceci pouvant être dû au fait que ces cellules sont transformées. D'autres modèles de cultures primaires de CE ont été utilisés dans des études récentes pour étudier l'effet du LSS comme les HAEC (human aortic endothelial cells) (Maurya et al. 2021) ou encore les BOEC (Blood Outgrowth Endothelial Cell) (Béguin et al. 2020) qui sont des CE circulantes isolées à partir de prélèvement sanguin, ou encore les CE d'aorte bovine (Morel et al. 2021). Ainsi, il pourrait être intéressant de voir si l'expression de Nav β 3 est augmentée dans ces deux modèles.

1.2. Canaux Nav endothéliaux et flux laminaire

1.2.1. Les sous-unités α et β des canaux Nav sont exprimées dans les CE vasculaires.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à déterminer l'expression des différentes isoformes des canaux Nav dans les deux modèles de CE : HUVEC et TeloHAEC. Parmi les 9 isoformes de la sous-unité α des canaux Nav, les transcrits *SCN5A*, *SCN8A* et *SCN9A* codant respectivement pour les isoformes Nav1.5, Nav1.6 et Nav1.7 ont été détectés dans ces CE. Ce profil d'expression a également été retrouvé dans l'étude de Andrikopoulos sur les HUVEC (Andrikopoulos et al. 2011) mais est différent de celui observé dans l'étude de Traub (Nav1.4 et Nav1.6) (Traub et al. 1999). Cependant, dans l'étude d'Andrikopoulos, l'expression de Nav1.6 détectée en PCR a été exclue suite à la présence de 2 bandes d'amplification sur le gel. Ces 2 bandes pourraient correspondre à une forme tronquée de Nav1.6 détectée par Diss et al. dans une lignée cellulaire issue du cancer de la prostate (J. K. Diss et al. 2001). En effet, différentes isoformes des sous-unités α des canaux Nav dont Nav1.6 peuvent subir un épissage alternatif avec la perte d'un exon néonatal ou un saut d'exon aboutissant à un défaut de la transcription et à une forme tronquée qui, par conséquent, ne produit pas de canaux fonctionnels (Lopez-Charcas et al. 2018). De manière similaire à l'étude d'Andrikopoulos, les HUVEC utilisées dans notre projet sembleraient également exprimer la forme tronquée de l'isoforme Nav1.6 tout comme les TeloHAEC (résultats non présentés). De plus l'isoforme de Nav1.6 a bien été identifié au niveau protéique mais avec un poids moléculaire plus faible ce qui est en faveur d'une forme tronquée dans ces CE. Ainsi, le rôle de Nav1.6 pourrait être en lien avec l'invasion cellulaire et l'activité des MMP2 (protéases sécrétées impliquées dans la dégradation des composants de la membrane basale et de la MEC), comme démontré dans les cellules cancéreuses (Lopez-Charcas et al. 2018).

Concernant les sous-unités β des canaux Nav, 2 des 4 isoformes, Nav β 1 et Nav β 3 ont été détectées au niveau transcriptionnel et protéique dans les CE. Ces 2 sous-unités Nav β ont la particularité de former des liaisons non-covalentes avec les sous-unités α des canaux Nav et sont les mêmes qui ont été détectées dans l'étude d'Andrikopoulos.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que les principales isoformes exprimées dans les CE humaines sont Nav1.5, Nav1.6, Nav β 1 et Nav β 3. [Afin de préciser ces valeurs, la technique de quantification absolue des données de qPCR pourrait être utilisée](#) comme elle a été réalisée chez la souris par notre équipe (résultats non présentés et non publiés). Nos résultats indiquent que chez les souris (C57BL/6J) mâles adultes, les CE issues des artères mésentériques isolées puis mises en culture n'expriment pas les mêmes isoformes que celles retrouvées dans les HUVEC et TeloHAEC. En effet, dans ces CE murines, nous retrouvons par ordre d'abondance *Scn3a* > *Scn2a* > *Scn5a*. Concernant les sous-unités Nav β , nous retrouvons le même profil d'expression que dans les HUVEC et TeloHAEC c'est-à-dire une forte expression de *Scn1b* et une faible expression de *Scn3b*.

1.2.2. L'expression des sous-unités α et β des canaux Nav dans les CE vasculaires est différenciellement régulée par un flux laminaire physiologique.

Suite à la caractérisation de l'expression des isoformes des canaux Nav dans les CE, nous avons montré qu'un LSS de 96 heures induit une variation de l'expression de certaines isoformes des canaux Nav présentes dans les CE.

En comparaison aux CE cultivées en condition statique, l'expression de **SCN5A** codant pour la sous-unité Nav1.5, est significativement diminuée dans les CE exposées à un LSS de 20 dyn/cm² pendant 96 heures et ce dans les deux types de CE étudiées : HUVEC et TeloHAEC. Cette diminution de l'expression de *SCN5A* lors d'un LSS pourrait être due à l'activation du facteur de transcription Foxo1 (via la sirtuine 1) qui a été montré pour se lier au promoteur du gène *Scn5a* et induire la répression de l'expression et de l'activité de Nav1.5 (Mao et al. 2012; Cai et al. 2014; Han et al. 2015; J. Liu et al. 2015).

L'étude d'Andrikopoulos ayant montré que l'activité canalaire du canal Nav1.5 dans la CE est impliqué dans la tubulogenèse (Andrikopoulos et al. 2011), nous émettons l'hypothèse que la répression de l'expression de Nav1.5 lors d'un LSS pourrait être associée à la diminution de la prolifération des CE exposées au LSS. De plus, l'expression et/ou l'activité de Nav1.5 a été montrée pour être sur-régulée dans plusieurs types de cellules cancéreuses (cancer du sein, colorectal, ovaire, leucémie) et pour favoriser la prolifération, la migration et le potentiel invasif des cellules cancéreuses (Lopez-Charcas et al. 2021).

En comparaison aux CE statiques, l'expression de **SCN9A** codant pour la sous-unité Nav1.7 est régulée inversement dans les HUVEC et TeloHAEC puisqu'elle est augmentée de manière non significative dans les HUVEC, et est diminuée de manière non significative dans les TeloHAEC, exposées à un LSS de 20 dyn/cm² pendant 96 heures. Ainsi, avec ces résultats, il semble difficile de conclure quant à son rôle. Dans la littérature, il a été montré que le stress mécanique impactait l'activité du canal Nav1.7 (Körner et al. 2018). En effet, un stress mécanique (appliqué par un système de perfusion qui induit une force sur la surface membranaire) résulte en un décalage de la dépendance de l'activation et de l'inactivation du courant Na⁺ médié par Nav1.7 (HEK293 exprimant Nav1.7 de façon stable) et la sous-unité Navβ1 empêche l'effet de la stimulation mécanique sur le courant Na⁺ (Körner et al. 2018). Cependant, les auteurs n'ont pas étudié l'effet de ce stress mécanique sur l'expression transcriptionnelle et protéique de Nav1.7.

Enfin, l'expression de **SCN3B** codant pour la sous-unité Navβ3 est significativement régulée par le flux dans les CE. En comparaison aux CE statiques, l'expression de *SCN3B* est significativement augmentée par un LSS de 20 dyn/cm² pendant 24 heures (fold change $2,1 \pm 0,3$, $n = 5$, p -value < 0,05 ; résultats non présentés), 96 heures (fold change $7,05 \pm 2,1$, $n = 7$, p -value < 0,01) et 7 jours (fold change $14,6 \pm 3,6$, $n = 2$; résultats non présentés) dans les HUVEC. L'expression de *SCN3B* dans les TeloHAEC est significativement augmentée par un LSS de 20 dyn/cm² pendant 96 heures (fold change $2,9 \pm 0,5$, $n = 4$, p -value < 0,05). De plus, nous avons remarqué qu'un LSS de faible intensité (5 dyn/cm²) pendant 96 heures induit un alignement des HUVEC dans le sens du flux de manière moins importante qu'un LSS de 20 dyn/cm², et induit une augmentation non-significative de l'expression de *SCN3B* (fold change $4,9 \pm 0,4$, $n = 4$, p -value = 0,1), par comparaison aux CE statiques (résultats non présentés). De plus, un shear stress oscillatoire (OSS) pendant 24 heures n'induit pas d'alignement des cellules dans le sens du flux, ni d'activation de la voie de signalisation athéroprotectrice (*KLF2/KLF4/NOS3*), ni d'augmentation de l'expression de *SCN3B* (fold change $1,7 \pm 0,2$, $n = 5$, p -value = 0,2 ; résultats non présentés). Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous indiquent que l'expression de la sous-unité Navβ3 semble être dépendante de l'intensité du flux laminaire et que son expression sous flux pourrait être régulée de manière temps-dépendante dans les HUVEC. De plus, un flux pathologique de 24 heures n'augmente pas de manière

significative l'expression de *SCN3B* contrairement à un flux physiologique de 24 heures suggérant un rôle de *SCN3B* dans l'athéroprotection en lien avec l'alignement cellulaire.

Dans la littérature, peu d'études ont montré l'expression de *SCN3B* dans les CE et sa régulation par le flux vasculaire. Sabbagh et al. a montré l'expression de *SCN3B* dans des CE de poumon par RNA-seq (Sabbagh et al. 2018) et l'étude d'Andrikopoulos dans les HUVEC (Andrikopoulos et al. 2011). L'étude de Hermkens publiée en 2019 a montré que l'expression de *SCN3B* était différentiellement régulée en fonction du type de shear stress (Hermkens et al. 2019). Ils ont détecté une diminution de l'expression de *SCN3B* dans les CE artérielles intra crânielles humaines (artère basilaire) où le flux vasculaire est faible, comparé aux CE artérielles extra crânielles (artère carotide) où le flux est plus important (RNAseq sur prélèvement d'artères crânielles humaines *post-mortem*). Cependant, dans ce même travail, les auteurs ont montré que les CE cérébrales humaines (hCMEC/D3) exposées à un shear stress laminaire de 10 dyn/cm² présentaient une diminution de l'expression de *SCN3B* comparée aux CE en condition statique (Hermkens et al. 2019), à l'inverse de nos résultats. Néanmoins, dans la base de données NCBI GeoProfile, nous avons identifié une analyse transcriptomique qui a montré que l'expression de *SCN3B* dans des HUVEC soumises à un LSS élevé de 75 dyn/cm² était augmentée par rapport aux CE exposées à un LSS de 15 dyn/cm² (White et al. 2011). Cette étude a également montré que l'expression transcriptionnelle de *KLF2* et de *KLF4* est augmentée par un LSS élevé comparé à un LSS de 15 dyn/cm² (White et al. 2011).

Enfin, nous n'avons pas pu identifier l'expression de Navβ3 dans notre analyse protéomique (partie 2). Pour expliquer ceci, nous avons plusieurs hypothèses : i) soit Navβ3 est trop faiblement exprimé ii) soit parce que Navβ3 est insérée dans les membranes (plasmiques ou des organites) mais nous ne l'avons pas non plus retrouvé lors de l'analyse du protéome suite à un enrichissement membranaire (résultats non présentés) iii) soit parce que Navβ3 est clivée par des secretases (cf paragraphe de discussion 3.2.3. c) Navβ3 est-elle exprimée sous la forme totale ou clivée dans la cellule endothéliale ?). Or lors des manipulations de surexpression de Navβ3 pour les expériences d'IP, nous n'avons pas détecté plus de fragments peptidiques correspondant à la partie intracellulaire ICD.

1.2.3. Navβ3 et réponse au flux vasculaire

Avant-propos : Pour des raisons techniques, seules les TeloHAEC ont été transfectées avec le plasmide d'expression codant pour SCN3B (pCMV-SP-N-Myc-SCN3B) qui génère une protéine de fusion avec un tag Myc de 10 acides aminés en N-terminal extracellulaire. En effet, nous n'avons pas réussi à transfecter ce plasmide tout comme le plasmide codant pour KLF2 dans les HUVEC. Pour les expériences de SiRNA, seules les HUVEC ont été testées **mais nous envisageons également d'utiliser les TeloHAEC.**

a) Quel est le rôle de Navβ3 dans la cellule endothéliale ?

Dans le but de déterminer le rôle de la sous-unité Navβ3 dans les CE en réponse au flux, nous avons utilisé une stratégie de diminution de son expression par ARN interférence dans les HUVEC. Le SiRNA *SCN3B* nous a permis d'obtenir une diminution de l'expression transcriptionnelle de *SCN3B* d'environ 40% dans les HUVEC en condition statique ou en condition de flux, en comparaison au SiRNA CTRL. Cependant, malgré la présence du SiRNA *SCN3B*, le flux a engendré une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *SCN3B*, similaire à celle observée en présence du SiRNA CTRL (multiplié par 2,4 en flux) ou en l'absence de SiRNA à 24 heures (multiplié par 2,1 en

flux). Ces analyses transcriptionnelles mettent en avant la capacité des CE exposées à un flux à surexprimer la sous-unité Navβ3 malgré la présence d'un SiRNA diminuant son expression.

Néanmoins, la diminution de l'expression de *SCN3B* dans les HUVEC induit une **diminution de l'alignement des cellules dans la direction du flux** et une diminution de la longueur des CE sous flux à 24 heures. De plus, nous avons remarqué que plus les cellules s'alignent au flux laminaire dans le temps (LSS de 24 heures, 4 jours et 7 jours) et plus l'expression de *SCN3B* est augmentée dans les CE, ce qui suggère que la sous-unité Navβ3 est importante dans l'alignement des CE au flux. [Nous envisageons de réaliser ces mêmes expériences de SiRNA dans les TeloHAEC afin d'observer si dans ce modèle cellulaire, nous avons aussi une diminution de l'alignement en réponse au flux.](#)

Dans l'objectif de comprendre le rôle de Navβ3 dans l'alignement cellulaire en réponse à un flux, nous avons conduit des expériences d'immunoprécipitation (IP) de Navβ3 suite à sa surexpression dans les TeloHAEC et les COS-7 (transfection du plasmide pCMV-SP-N-Myc-SCN3B puis IP avec des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-Myc tag) afin d'identifier les partenaires protéiques de Navβ3. Suite à l'IP de Navβ3 dans les cellules COS-7, nous avons ensuite fait passer un lysat total de protéines d'HUVEC (expérience de pull down assay) afin de retenir les protéines endothéliales qui interagissent avec Navβ3. Des transfections avec le plasmide vide suivies de l'IP ont servi de condition de contrôle négatif. L'analyse protéomique par spectrométrie de masse des deux types d'IP nous a permis d'identifier 76 protéines communes. Parmi elles, et après validation par des expériences de co-IP, nous avons montré que la protéine **mTOR est un partenaire spécifique de Navβ3**. mTOR étant un inhibiteur du flux autophagique (Guo et al. 2014; Gatica et al. 2015; Vion et al. 2017) et l'autophagie étant nécessaire à l'alignement des CE lors d'un flux laminaire (J. Liu et al. 2015; Vion et al. 2017), nous émettons donc **l'hypothèse suivante : Navβ3, par une interaction directe avec mTOR, séquestrerait ce dernier et permettrait indirectement l'activation du flux autophagique nécessaire à l'alignement cellulaire en réponse au flux physiologique**. [Afin de valider cette hypothèse, nous sommes en train d'étudier si la diminution de l'expression de *SCN3B* par SiRNA dans les HUVEC exposées à un LSS perturbe les acteurs de la voie de signalisation de mTOR \(RAPTOR, RICTOR, mSLT8, S6K, 4E-BP1, ULK1 ...\) et/ou de la voie autophagique \(Beclin 1, ATG5, P62, LC3B-I, LC3B-II ...\).](#) Nos résultats préliminaires montrent que l'expression protéique du fragment II de LC3B est augmentée dans les HUVEC après 24 heures de LSS en comparaison aux HUVEC cultivées de manière statique (résultats non présentés) comme décrit dans la littérature (Guo et al. 2014; J. Liu et al. 2015; Vion et al. 2017). [De plus, afin de savoir si Navβ3 est impliquée dans l'autophagie endothéliale médiée par le shear stress, des expériences de shear stress en présence de molécules inhibant l'autophagie comme la chloroquine ou la wortmannin ou la bafilomycine A1 \(Klionsky et al. 2021\) pourraient être envisagées pour observer si l'expression de Navβ3 est toujours augmentée dans les CE sous ces conditions de traitement et de LSS où l'alignement cellulaire n'a plus lieu. Il pourrait également être intéressant d'utiliser des inhibiteurs de mTOR comme la rapamycine qui active l'autophagie dans les CE et voir l'effet de ces traitements sur l'expression de *SCN3B*.](#)

En parallèle, nous avons réalisé des analyses d'enrichissement par Gene Ontology (GO-terms) *via* la base de données ToppGene sur les 76 potentiels interactants de Navβ3. Dans la catégorie des processus biologiques, la plupart des termes GO font référence au transport des vésicules de Golgi, au transport des protéines, à l'organisation du système endomembranaire et à l'établissement de la localisation des protéines. Concernant la

catégorie composants/constituants cellulaires, les termes GO retrouvés sont les organelles, la membrane du RE, le sous-compartiment du RE et le réseau de la membrane externe nucléaire. Ainsi, ces termes suggèrent un rôle de Navβ3 dans le trafficking protéique et une localisation dans les organites ce qui correspond à son rôle de **protéine chaperonne** précédemment décrit et qui pourrait être en accord avec notre hypothèse quant à son rôle dans l'autophagie avec une localisation au niveau des autophagosomes. De plus, il est important de noter que la protéine mTOR est retrouvée dans l'ensemble de ces termes GO cités ci-dessus, renforçant notre hypothèse quant au lien entre l'interaction Navβ3/mTOR et le flux autophagique dans les CE sous flux.

b) Où Navβ3 est localisée dans la cellule endothéliale ?

Cependant, sa localisation potentielle dans les organites intracellulaires peut paraître surprenante pour une protéine membranaire décrite comme une molécule d'adhésion membranaire faisant partie de la superfamille des Ig-CAM. Or ces résultats convergent avec le travail récent de Haworth et al. publié dans JBC montrant que la localisation de Navβ1 (forme totale) était principalement intracellulaire (particulièrement dans le RE et les vésicules endo/lysosomales) tandis que le domaine intracellulaire de Navβ1 (domaine ICD obtenu suite au clivage de Navβ1 cf paragraphe de l'introduction 3.4.2. Navβ et signalisation par protéolyse intramembranaire régulée (RIP)) a été retrouvé dans les endosomes et le noyau où il régule l'expression de gènes, en particulier *SCN1A* et *SCN9A* (Haworth et al. 2022) dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. L'étude de Bouza publiée dans JCI Insight en 2021 par le Pr. Isom a quant à elle montré que le fragment ICD de Navβ1 diminue l'expression de *SCN1A* et augmente l'expression de *SCN4A* et *SCN5A* dans les cellules de fibroblastes CHL (Bouza et al. 2021). Ces données confortent le fait que la sous-unité Navβ3 pourrait également être localisée au niveau des **organites intracellulaires** (forme entière ou clivée, cf paragraphe de l'introduction 3.4.2. Navβ et signalisation par protéolyse intramembranaire régulée (RIP)) et réguler l'expression d'autres gènes dont *SCN5A* qui est réprimée par le flux dans nos deux modèles cellulaires. **Ainsi, nous avons souhaité explorer la localisation cellulaire de Navβ3 dans nos modèles.** Nos résultats préliminaires ont montré une localisation de Navβ3 qui semble plutôt au niveau d'organites intracellulaires (marquage sur des TeloHAEC surexprimant Navβ3 (protéine de fusion myc tag-Navβ3) cultivées en condition statique (résultats non présentés). **Un co-marquage avec des marqueurs des lysosomes (LAMP1) ou de l'autophagosome (LC3B) est envisagé tout comme des immunomarquages de Navβ3 dans des CE cultivées sous flux laminaire versus CE statiques afin d'observer si une localisation de Navβ3 est détectable et modifiée par le flux.**

Néanmoins, notre hypothèse de départ sur la localisation cellulaire de Navβ3 était plutôt au niveau de la **membrane plasmique** et plus précisément au niveau du **mécanosome jonctionnel** avec PECAM1, VEGFR2, VE-cadherin (Givens et Tzima 2016) et ce pour plusieurs raisons :

- i) Navβ3 est une protéine appartenant à la superfamille des Ig-CAM avec une boucle Ig-like tout comme VEGFR2 et PECAM1 ce qui permettrait son interaction avec ces protéines ;
- ii) Une étude a montré que Navβ3 était localisée au niveau du pôle jonctionnel des cellules de la médullosurrénale de rat PC12 (Namadurai et al. 2015) et enfin ;
- iii) Parmi les protéines partenaires de Navβ3 identifiées par l'analyse protéomique, la protéine JUP (Junction Plakoglobin, également appelée γ-caténine) a été détectée dans l'IP pour les COS-7/HUVEC et est identifiée dans la banque de données du NCBI comme interagissant de Navβ3. Ce candidat nous paraissait fortement intéressant car cette γ-caténine interagit avec la VE-cadhérine au niveau de la membrane jonctionnelle des CE pour maintenir

l'intégrité des jonctions endothéliales en réponse à un LSS (Schnittler, Püschel, et Drenckhahn 1997; Muramatsu et al. 2017). Cependant, nous n'avons pas pu valider JUP comme partenaires protéiques de Navβ3 lors de nos expériences de co-IP. En effet, suite à l'IP Myc tag-Navβ3, une faible bande correspondant à la protéine JUP a été détectée, mais elle était également présente dans les contrôles négatifs (c'est à dire suite à l'IP de Myc tag-Navβ3 dans la condition de transfection avec le plasmide vide ; résultats non présentés), montrant la non-spécificité de l'interaction dans nos conditions expérimentales.

Enfin, nous avons formulé une dernière hypothèse concernant la localisation de Navβ3. Cette protéine serait présente au niveau de la **membrane plasmique à la surface basale** et elle interagirait avec des intégrines et la matrice extracellulaire comme démontré pour Navβ1 (cf paragraphe de l'introduction 3.4.1. Navβ et molécules d'adhésion cellulaire). De plus, parmi les 76 interactants protéiques de Navβ3 identifiées, l'intégrine α5 (ITG5A pour Integrin Subunit Alpha 5) a été trouvée dans les deux IP et n'est pas décrite comme interactant de Navβ3 dans la banque de données du NCBI. Cette protéine est importante dans la réponse au flux puisqu'il a été montré qu'en réponse à un flux perturbé, la phosphatase PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B) déphosphoryle l'annexine A2 (ANXA2) qui peut alors se lier avec l'intégrine α5, favorisant l'activation du complexe intégrine α5β1 et par conséquent l'activation des CE, permettant la formation et la progression de l'athérosclérose (C. Zhang et al. 2020). Cependant, dans nos expériences de validation des partenaires de Navβ3, nous avons détecté dans la condition input des TeloHAEC transfectées avec le plasmide vide pCMV et le plasmide pCMV-SP-N-Myc-SCN3B, la protéine ITG5A mais pas dans la condition IP (résultats non présentés).

Ainsi, notre hypothèse, qui reste à démontrer, serait que **Navβ3 soit localisée au niveau des organites intracellulaires, particulièrement au niveau des autophagosomes, et en séquestrant mTOR, permettrait l'activation de l'autophagie nécessaire à l'alignement des CE exposées à un flux laminaire**. Cependant, étant confrontés à des difficultés pour visualiser la protéine Navβ3, nous nous sommes donc posés la question de savoir si cette dernière n'était pas clivée par le système RIP (Regulated Intracellular Proteolysis) (cf paragraphe de l'introduction 3.4.2. Navβ et signalisation par protéolyse intramembranaire régulée).

c) Navβ3 est-elle exprimée sous la forme totale ou clivée dans la cellule endothéliale ?

En effet, Navβ3, comme les autres sous-unités Navβ, a été identifiée comme le substrat pour le clivage protéolytique régulé ou RIP par BACE1 et la γ-secretase (Wong et al. 2005). Nous avons donc souhaité savoir si Navβ3 subissait ce clivage dans les CE. Pour l'instant, nous n'avons pas pu mettre en évidence que ce clivage avait lieu dans les CE cultivées en condition statique ou soumises à un flux. En effet, des expériences préliminaires avec des inhibiteurs de BACE1 (MG-132, utilisé à 1 μM pendant 6 ou 24 heures) et de la γ-secretase (DAPT utilisé à 1 μM pendant 6 ou 24 heures) ainsi que les deux inhibiteurs ensemble (MG-132 et DAPT utilisés à 1 μM de chaque pendant 6 ou 24 heures) ont été effectuées sur des HUVEC cultivées en condition statique mais n'ont pas permis de voir une accumulation de la protéine Navβ3 et donc de conclure à un éventuel clivage (résultats non présentés). Cependant ces expériences sont à poursuivre car dans ces conditions de traitement, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression protéique de SOD-1 (superoxide dismutase-1) et HO-1 (heme oxygenase-1), dont l'expression est connue pour être induite suite à un traitement avec le MG-132 dans les HUVEC (Dreger et al. 2010). De plus, l'anticorps anti-Navβ3 que nous utilisons (PA5-87803, Thermo Fisher Scientific) reconnaît que la partie extracellulaire de Navβ3. **Il serait donc intéressant d'utiliser des anticorps dirigés**

spécifiquement vers la forme totale comme celui de chez Neuromab (N396/29) ou encore un anticorps spécifique de la forme clivée intracellulaire (ICD) de Navβ3 pour observer si un clivage par BACE1 et/ou par la γ-secretase a lieu et si ce clivage est inhibé dans les CE lors du flux laminaire sans avoir recours aux inhibiteurs MG-132 et DAPT peu spécifiques. Néanmoins, l'anticorps spécifique de la partie ICD de Navβ3 n'est pas disponible commercialement, il faudrait donc le synthétiser à façon et les devis que nous avons reçus nous indiquent un coût d'environ 2 000 € pour un anticorps polyclonal et plus de 4 000 € pour un anticorps monoclonal. Il serait également intéressant de déterminer les niveaux d'expression transcriptionnelle et protéique de BACE1 dans les CE vasculaires et s'ils varient en condition de flux physiologique et pathologique. En effet, plusieurs études ont montré que BACE1 est présent dans l'endothélium vasculaire et que sa surexpression entraîne un clivage excessif de protéines comme l'occludine diminuant l'expression et l'activité de la eNOS et réduisant la production de NO (H. Zhou et al. 2022) et serait associée à des pathologies vasculaires tout comme il l'est dans la maladie d'Alzheimer. En effet, dans cette pathologie, BACE1 voit son expression et son activité augmentées, à cause du stress oxydatif, ce qui engendre un clivage excessif de l'APP (amyloid precursor protein) et l'accumulation de peptides Aβ (amyloid β), caractéristiques principales de cette neuropathologie (Pak et al. 2005; Kwak et al. 2011). De plus, une réduction de l'expression de la eNOS a été montrée dans les cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ; d'ailleurs les souris APP/PS1/eNOS^{+/-}, modèle d'étude plus proche de cette maladie, présentent un niveau d'expression protéique de BACE1 supérieur aux souris APP/PS1 (Ahmed et al. 2022). Il serait donc intéressant de déterminer si lors d'un flux oscillatoire, induisant un stress oxydatif et une diminution de l'expression de la eNOS, l'expression de BACE1 est modifiée.

d) Comment Navβ3 est-elle régulée, quels sont les facteurs de transcription impliqués ?

Afin de déterminer quelles voies de signalisation sont impliquées dans l'augmentation de l'expression de Navβ3 induite par un flux physiologique, nous avons recherché *in silico* des éléments de réponse dans le promoteur du gène *SCN3B*, (database Tf2DNA) et avons identifié KLF2 comme potentiel facteur de transcription de *SCN3B*. Ce facteur de transcription étant une des molécules signatures du LSS (Huddleson et al. 2004), nous avons cherché à étudier son implication dans l'expression de Navβ3. Pour cela, nous avons transfecté les TeloHAEC avec un vecteur d'expression pour KLF2 (pcDNA3.1-KLF2, don de Candice Chapouly, INSERM 1034, Bordeaux) et également traiter les HUVEC avec du resvératrol qui est connu pour augmenter l'expression et l'activité de KLF2 (par l'activation de la sirtuine 1 *via* la voie dépendante de MEK5/MEF2 et indépendante de ERK5) (Gracia-Sancho et al. 2010). La transfection du plasmide d'expression pour KLF2 dans les TeloHAEC a bien permis l'augmentation de l'expression protéique de KLF2 dans notre modèle et a également induit une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *SCN3B* à 24 heures mais de manière non significative (fold change $1,7 \pm 0,9$, $n = 5$, p -value = 0,9 ; résultats non présentés). Un traitement par le resvératrol (100 μM) a induit une augmentation de l'expression de KLF2 tout comme une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *SCN3B* dans les HUVEC à 48 heures mais de manière non significative (fold change $1,9 \pm 0,07$, $n = 3$, p -value = 0,10 ; résultats non présentés). Afin de compléter ces données, il serait intéressant de tester un traitement au resvératrol avec différentes concentrations et de réaliser ces traitements sur des temps plus précoces dans les HUVEC et TeloHAEC. En effet, le resvératrol est également connu pour augmenter l'expression de KLF4 qui est également induit lors d'un LSS dans nos modèles ainsi que dans la littérature (Villarreal et al. 2010; Maurya et al. 2021). Ainsi, si nous souhaitons montrer de manière directe que KLF2 régule l'expression transcriptionnelle de *SCN3B*, il faudrait

réaliser des expériences d'inactivation de KLF2 (par siRNA) en condition de flux et observer l'effet sur l'expression de *SCN3B*. Il pourrait être également envisager de réaliser des expériences de précipitation de chromatine (ChIP) en immunoprécipitant KLF2 (suite à un LSS ou suite à une surexpression avec le vecteur d'expression dans les TeloHAEC) puis en amplifiant par RT-qPCR la région promotrice de *SCN3B* où les éléments de réponse de KLF2 sont présents.

D'une manière intéressante, il a également été montré que le resvératrol stimule l'autophagie dans les CE *via* l'activation de la voie de l'AMPK en favorisant l'activité de la sirtuine 1 (M.-L. Chen et al. 2013) et *via* l'activation du facteur de transcription EB (TFEB) (X. Zhou et al. 2019). Cette stimulation de l'autophagie ainsi que ses propriétés antioxydantes font que le resvératrol est une molécule dite vasculoprotectrice impliquée dans l'athéroprotection (Berrougui et al. 2009; H. Li et al. 2019). Ainsi, si l'autophagie est induite par le resvératrol dans nos conditions expérimentales (à vérifier avec les marqueurs de la voie autophagique comme Beclin 1, P62, LC3B-II) et que *SCN3B* voit son expression augmentée, cela serait un argument en faveur de notre hypothèse quant au rôle de Navβ3 dans le flux autophagique, dans l'alignement cellulaire et dans l'athéroprotection.

e) Navβ3, en contribuant à la mécanotransduction endothéliale, est-elle un nouveau candidat pour l'athéroprotection comme elle l'est pour la protection du rythme cardiaque ?

Nous faisons l'hypothèse que Navβ3, de par son rôle dans l'alignement cellulaire en réponse à un flux laminaire physiologique, participerait à l'athéroprotection. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'expression de Navβ3 est augmentée de manière significative seulement en réponse à un LSS (fold change $2,1 \pm 0,3$, $n = 5$, p -value $< 0,05$), et non en réponse à un flux oscillatoire pathologique (OSS) (fold change $1,7 \pm 0,2$, $n = 5$, p -value $= 0,19$; résultats non présentés) dans les HUVEC à 24 heures qui ne s'alignent pas en présence de flux perturbé. L'OSS est connu pour induire une forte prolifération et migration des CE ainsi que l'activation des voies de signalisation inflammatoires conduisant à un phénotype endothélial qualifié d'athéropone (Baeyens et al. 2016). Afin de mieux positionner Navβ3 dans la réponse inflammatoire, nous avons traité les HUVEC avec la cytokine pro-inflammatoire l'IL1β, et observé l'effet de ce traitement sur l'expression de *SCN3B*. Après un traitement de 24 heures, l'IL1β (10 ng/mL) induit une augmentation de l'expression transcriptionnelle de molécules d'adhésion comme *VCAM1* et *ICAM1* ainsi qu'une diminution de l'expression transcriptionnelle de *NOS3* comme attendu et en accord avec la littérature (Kawasaki et al. 2015). Ce traitement avec l'IL1β a tendance à diminuer l'expression transcriptionnelle de *SCN3B* de manière non significative (fold change $0,6 \pm 0,08$, $n = 5$, p -value $= 0,1$; résultats non présentés).

De plus, afin d'étudier le rôle de Navβ3 dans le phénotype prolifératif et migratoire de la CE, nous souhaiterions utiliser l'Incucyte S3 qui permet, par l'acquisition et l'analyse d'images des cellules au cours du temps, de quantifier la prolifération et la migration cellulaire, en travaillant avec des HUVEC et TeloHAEC dont l'expression de *SCN3B* sera diminuée par siRNA ou surexprimée par vecteur d'expression afin d'observer dans ces conditions l'impact d'une modification de l'expression de Navβ3 sur le phénotype de la CE. L'ensemble de cette partie sur le rôle de Navβ3 dans la réponse inflammatoire et migratoire de la CE est à poursuivre afin de positionner Navβ3 comme une protéine impliquée dans l'athéroprotection.

Navβ3 est une protéine fortement exprimée au niveau cardiaque et régule l'activité et l'expression de Nav1.5 (Ishikawa et al. 2013; Maroni et al. 2019; Salvage et al. 2019). Chez l'Homme, certaines mutations codant dans

le gène *SCN3B* sont associées à des pertes de fonction au niveau électrophysiologique et se traduisent par des pathologies cardiaques, principalement des arythmies dont des fibrillations ventriculaires idiopathiques (Valdivia et al. 2010) et le syndrome de Brugada (D. Hu et al. 2009; Ishikawa et al. 2013). Les souris KO totale pour Navβ3 sont viables mais présentent également des arythmies cardiaques spontanées (Hakim et al. 2010). Récemment, il a été montré que Navβ3 serait impliquée dans la modification des propriétés électrophysiologiques du canal Nav1.5 cardiaque lors d'un shear stress (Maroni et al. 2019). Maroni suggère que cette régulation mécanosensible pourrait permettre de raccourcir la durée du potentiel d'action lors de tachycardie et ainsi d'éviter les arythmies (Maroni et al. 2019). Cela pose la question suivante : Est-ce que les mutations dans le gène de *SCN3B* chez l'Homme engendreraient un défaut de régulation au stress mécanique responsable d'arythmies ?

De plus, pour mieux comprendre le rôle de Navβ3 au niveau de la physiologie vasculaire, nous avons développé un projet *in vivo* en utilisant le KO total de *Scn3b* chez la souris C57BL/6N (projet APAFIS 27905). Nous souhaitons donc savoir si l'extinction de Navβ3 modifie la vasomotricité et les réponses endothéliales des artères de résistance isolées dans les souris KO pour *Scn3b* par rapport aux souris WT. Pour cela, les techniques de myographie et d'artériographie seront utilisées. Nous explorerons dans un deuxième temps si les souris *Scn3b*^{-/-} développent les mêmes processus physiopathologiques en lien avec l'athérosclérose (croisement avec des souris *Ldlr*^{-/-} et un régime hyperlipidique enrichi en cholestérol).

2. Partie 2 – Les HUVEC présentent des signatures protéiques distinctes en réponse à un flux laminaire athéroprotecteur ou oscillatoire athéropone

La CE est le chef d'orchestre de l'homéostasie vasculaire et sa dysfonction peut conduire à de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose. Le stimulus clé de la fonction endothéliale et de l'athéroprotection est le flux sanguin laminaire ou laminar shear stress (LSS). En opposition, un flux oscillatoire turbulent ou oscillatory shear stress (OSS) est considéré comme pathologique car propice au développement de plaques d'athérome. En effet, ce flux perturbé favorise l'infiltration des lipoprotéines dans l'intima des vaisseaux, d'une part parce que les LDL restent plus longtemps dans cette zone, et d'autre part, parce que le flux turbulent induit *via* l'activation des mécanosenseurs et mécanotransducteurs, une perturbation de l'intégrité endothéliale avec un état cellulaire qui devient instable et la mise en place d'un environnement inflammatoire (Chistiakov, Orekhov, et Bobryshev 2017; Jebari-Benslaiman et al. 2022).

Bien que les voies moléculaires en réponse au shear stress athéroprotecteur LSS ou athéropone OSS ont été largement caractérisées par des approches transcriptomiques (Ajami et al. 2017; Maurya et al. 2021; Morel et al. 2021), les analyses protéomiques sont plus rares (Béguin et al. 2020) et ne se sont jamais concentrées sur les signatures protéomiques et les principales fonctions biologiques affectées par le flux physiologique athéroprotecteur LSS et le flux pathologique athéropone OSS.

Ainsi, afin de mieux comprendre pourquoi ces deux forces mécaniques engendrent des réponses cellulaires différentes, l'objectif de ce projet protéomique est d'identifier les signatures protéiques des HUVEC soumises à un flux physiologique LSS vs un flux pathologique OSS afin de mettre en évidence de nouveaux candidats potentiellement impliqués dans l'athéroprotection et/ou dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

2.1. Effet du flux sur le phénotype endothélial

Suite à la caractérisation de l'effet du flux sur la morphologie des CE, nous avons mis en évidence qu'un LSS physiologique (20 dyn/cm² pendant 24 heures) induit un alignement et une elongation des HUVEC dans le sens du flux en comparaison des cellules cultivées en condition statique. Un OSS pathologique (20 dyn/cm² avec une fréquence de 1 Hz pendant 24 heures) induit peu de modification phénotypique en comparaison avec des cellules cultivées en statique, seulement une augmentation de la largeur des CE où ces dernières présentent une apparence dite « en pavé ». Ces résultats étant en accord avec les données de la littérature (Ajami et al. 2017; Morel et al. 2021; Mendez et al. 2022), nous avons ensuite réalisé le protéome de ces cellules sous ces 3 conditions de culture. Nous avons utilisé une méthode basée sur le TIMS TOF (Timed Ion Mobility Spectrometry Time Of Flight) qui est une approche sensible donnant accès à un protéome dit profond, avec jusqu'à 8000 protéines identifiées par échantillon à partir de petites quantités de matériel biologique (200 ng).

Parmi les 5934 protéines identifiées par spectrométrie de masse, suite à une analyse LIMMA, 447 protéines voient leur expression significativement modulée représentée sous la forme d'une « heat map » où plusieurs clusters sont distincts et montrent clairement que la condition OSS est plus proche de la condition statique en termes d'expression globale de protéines par rapport à la condition LSS. Ces différences d'expression protéique sont certainement en lien avec la modification phénotypique des cellules où seule dans la condition LSS, les cellules s'alignent, signe d'une mécanotransduction endothéliale efficace.

2.2. Identification de protéines différentiellement régulées (DRP) par le flux

Nous avons ensuite déterminé les protéines dont l'expression était différentiellement régulée (DRP) par le LSS ou l'OSS en comparaison aux CE cultivées de manière statique par une analyse SAM avec comme critère de seuil une modification de l'expression d'un facteur 2 ou 0,5. Suite à ces analyses, nous avons identifié de nombreuses DRP déjà connues pour être augmentées par le LSS comme KLF4 et eNOS (Mun et al. 2011) ou réprimées comme la molécule pro inflammatoire thrombospondine 1 (THBS1) (Kim et al. 2017). Nous avons été surpris de ne pas avoir identifié ni KLF2 ni la protéine Navβ3 dans nos jeux de données et ce malgré la sensibilité de la méthode.

Dans l'objectif d'identifier de nouvelles signatures biologiques et cellulaires spécifiques au LSS et au OSS, nous avons réalisé ensuite une analyse d'enrichissement des termes GO. Dans la condition LSS, les termes qui en ressortent concernant les **processus biologiques** sont en lien avec la physiologie de la CE alors qu'un OSS conduit à une signature différente des processus biologiques, en lien avec le stress cellulaire et l'inflammation comme précédemment décrit dans une étude transcriptomique (Maurya et al. 2021). En ce qui concerne la catégorie **composants cellulaires**, ces contraintes mécaniques conduisent à une réorganisation des composants cellulaires mais d'une manière surprenante pour les deux types de shear stress. En effet, les termes GO retrouvés sont en lien avec l'interaction avec la MEC et la réorganisation de la membrane plasmique pour le LSS et principalement en lien avec la MEC pour l'OSS. Nous avons également été surpris de ne pas mettre en évidence des termes GO en lien avec la réorganisation du cytosquelette ou de l'autophagie. Cependant, ces résultats d'enrichissement des termes GO sur les composants cellulaires sont assez proches de ceux publiés récemment par l'étude protéomique de (Béguin et al. 2020). En effet, dans cette étude, les CE issues de prélèvements sanguins humains (BOEC pour blood outgrowth endothelial cells également appelées CE matures d'excroissance sanguine) ont été soumises à un LSS (sur agitateur orbital pendant 48 heures) et comparées aux conditions statiques. 5200 protéines ont été identifiées dont 104 voient leur expression variée en condition de flux. L'analyse des termes GO de cette étude a mis en évidence tout comme dans notre analyse, des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et en lien avec la MEC (Béguin et al. 2020).

Nous avons ensuite cherché les DRP dans ces différentes catégories de termes GO dont l'expression était induite par un LSS et réprimée par un OSS (AQP1, ITGB4, LGALS9, EFNB1) ou inversement diminuée par un LSS et augmentée (ID3) ou non (EFEMP1 et PTX3) par un OSS. Afin de sélectionner nos candidats, nous avons également comparé les valeurs des fold change (FC) de notre étude avec ceux obtenus lors de l'analyse du protéome des HUVEC soumises à LSS ou un à OSS suite à un enrichissement membranaire (résultats non présentés, mais dont les valeurs des FC seront indiquées dans le tableau 5 ci-dessous). Pour cette analyse de protéome que l'on appellera protéome membranaire, 2230 protéines ont été identifiées mais seulement 29 protéines ont une expression modifiée.

Finalement, nous avons sélectionné une liste de 7 DRP (tableau 5) dont le rôle de chacune est décrit et discuté dans les paragraphes suivants.

Aquaporin 1	AQP1	3,68	0,35	ND	Response to wounding, to hypoxia Blood vessel, vasculature, ..., dvt
Galectin 9	LGALS9	2,52	0,66	4,04	Response to wounding, caveola, ECM, collagen-containing ECM
Ephrin B1	EFNB1	2,29	0,52	7,24	membrane raft, microdomain and caveola
Integrin subunit beta 4	ITGB4	1,95	0,49	3,99	Response to wounding
Inhibitor of DNA binding 3	ID3	0,56	2,37	ND	Response to wounding
EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1	EFEMP1	0,52	1,05	0,11	-
Pentraxin 3	PTX3	0,45	0,73	0,15	-

Tableau 5 : Liste des 7 DRP dont l'expression est augmentée (AQP1, LGALS9, EFNB1 et ITGB4) ou diminuée (ID3, EFEMP1 et PTX3) par un LSS.

Les chiffres représentent les valeurs des fold change calculées suite à la comparaison LSS vs Statique (ST), OSS vs Statique (ST) lors de l'analyse du protéome totale alors que les valeurs des fold change calculées suite à la comparaison LSS vs OSS sont issues de l'analyse du protéome membranaire.

2.2.1. DRP augmentées par un LSS et réprimées par un OSS : marqueur de l'athéroprotection ?

a) Aquaporine-1 (AQP1)

L'expression de l'aquaporine-1 (AQP1) est significativement augmentée par le LSS et diminuée par l'OSS (valeurs de FC de 3,78 et 0,35 respectivement) mais n'a pas été retrouvée dans l'analyse du protéome membranaire bien que cette protéine soit localisée au niveau de la membrane plasmique. En effet, AQP1 forme un canal transmembranaire perméable à l'eau et impliqué dans le transport de l'eau et du NO (Herrera, Hong, et Garvin 2006; Herrera et Garvin 2007). Il a déjà été montré que le LSS (12 dyn/cm² pendant 24 h) induit l'expression de AQP1 dans les HUVEC, ce qui favorise la migration des CE et la cicatrisation après une blessure de l'endothélium (Mun, Jang, et Boo 2013). Le facteur de transcription KLF2 a été montré pour être impliqué dans l'induction de l'expression de AQP1, alors que la cytokine pro-inflammatoire TNF- α régule négativement son expression (Fontijn et al. 2015). Cependant, il n'a jamais été montré que l'AQP1 avait son expression diminuée par un flux perturbé. Néanmoins, il a été montré que l'expression transcriptionnelle de AQP1 est préférentiellement retrouvée dans l'intima d'artères humaines saines en comparaison à l'intima d'artères humaines présentant des plaques d'athérosclérose précoces ou avancées (Fontijn et al. 2015). De plus, le niveau d'expression de AQP1 dans les artères présentant des malformations artério-veineuses (favorisées par un OSS) est diminué comparé aux artères physiologiques (Ryu et al. 2021). Il a également été montré que dans des anneaux d'aorte de souris où l'expression de AQP1 est supprimée, un défaut de vasorelaxation dépendante du NO est observé et est associé à une diminution de l'efflux de NO endothélial (Herrera et Garvin 2007). Ainsi, ces données suggèrent que l'expression de AQP1 est augmentée par le LSS de manière KLF2 dépendante et est associée à un phénotype endothélial athéroprotecteur en facilitant la libération du NO, alors que sa diminution d'expression semble être associée à la dysfonction endothéliale, en lien avec nos résultats qui montrent que l'expression de AQP1 est réprimée par un flux OSS pathologique, signature d'un environnement inflammatoire propice au développement des plaques d'athérome.

b) Intégrine $\beta 4$ (ITGB4)

L'expression de l'intégrine $\beta 4$ (ITGB4) est significativement augmentée par le LSS (valeur de FC de 1,95) et est diminuée par l'OSS (valeur de FC de 0,49, significatif) et lors de l'analyse du protéome membranaire, la comparaison du LSS vs OSS nous donne une valeur de FC significative de 3,99. Cette protéine a retenu notre attention car l'étude protéomique de Béguin sur les BOEC a montré que le flux laminaire induit un remodelage du réseau de laminines et la redistribution des intégrines associées à la laminine sur la surface endothéliale basale (Béguin et al. 2020). Dans ce travail, la majorité des DRP identifiées sont associées à l'adhésion cellule-MEC. Ils ont montré ainsi que le flux laminaire induit une augmentation de l'expression des laminines $\alpha 5$ (LAMA5), $\beta 2$ (LAMB2), $\beta 3$ (LAMB3) et $\gamma 2$ (LAMC2) sans modifier l'expression des laminines $\alpha 4$ (LAMA4), $\beta 1$ (LAMB1), et $\gamma 1$ (LAMC1) (Béguin et al. 2020). De plus, ils ont montré que flux a induit une augmentation de l'expression des intégrines $\alpha 6$ (ITG6A), $\alpha 9$ (ITG9A) et $\beta 4$ (ITGB4) et la distribution fibrillaire des intégrines $\alpha 6\beta 4$ qui co-localisent avec le réseau de laminines (LAMA5 en particulier) (Béguin et al. 2020). De manière intéressante, nous avons montré que l'expression de ITGB4 est induite par le LSS mais réprimée par le flux pathologique, suggérant que la localisation des intégrines et laminines sur la membrane basale des CE s'effectue selon un procédé flux-dépendant.

c) Galectine-9 (LGALS9)

L'expression de la galectine-9 (LGALS9) est augmentée par le LSS (valeur de FC de 2,52) et est diminuée par l'OSS (valeur de FC de 0,66) et lors de l'analyse du protéome membranaire, la comparaison du LSS vs OSS nous indique une valeur de FC significative de 4,04. Les galectines -1/-3/-8/-9 sont présentes dans l'endothélium (Thijssen 2021) mais leur expression n'a jamais été décrite pour être augmentée par un flux physiologique. La galectine-9, qui peut être libérée dans le milieu extracellulaire et se lier à son récepteur Tim-3, est présentée comme un immunomodulateur (Thijssen 2021). En effet, elle peut avoir dans certains cas un rôle immunosuppresseur et dans d'autres, une implication dans l'activation des cytokines pro-inflammatoires (Thijssen 2021). L'étude de Foks et al. en 2013 la présentait (avec Tim-3 son récepteur) comme une potentielle cible thérapeutique pour prévenir le développement des lésions athérosclérotiques (Foks et al. 2013). Cependant, une récente publication a montré que l'expression de LGALS9 est augmentée avec la présence de plaques d'athérome avancées et la rupture de plaques, signifiant que son expression est corrélée avec la progression des plaques d'athérosclérose (G. Zhu et al. 2022). De plus, les souris ApoE^{-/-} Gal-9^{-/-} développent moins de plaques d'athérome que les souris ApoE^{-/-} suite à un régime riche en graisses puisque la galectine-9 soluble induit l'activation des monocytes et le phénotype pro-inflammatoire des macrophages (Krautter et al. 2022). D'après ces données de la littérature, il semble difficile d'expliquer pourquoi le LSS induit une augmentation de la galectine-9 qui est une molécule impliquée dans le recrutement des cellules inflammatoires alors qu'un flux pathologique réprime au contraire son expression.

d) Ephrine B1 (EFNB1)

L'expression de l'éphrine B1 (EFNB1) est augmentée par le LSS (valeur de FC de 2,29) et est diminuée par l'OSS (valeur de FC de 0,52) et lors de l'analyse du protéome membranaire, la comparaison du LSS vs OSS nous donne une valeur de FC de 7,24. Les éphrines sont les ligands des récepteurs hépatocellulaires produisant de

l'érythropoïétine (Ephs) qui font partie de la famille des RTK, et ont un rôle crucial dans la vasculogénèse et l'angiogénèse embryonnaire (Vreeken et al. 2020). La majorité des travaux sur l'effet du flux sur l'expression des éphrines a concerné l'éphrine B2 (EFB2 ou EFNB2) (et son récepteur EphB4) mais les résultats ne donnent pas de consensus. En effet, certains montrent une diminution de l'éphrine B2 dans les CE exposées à un LSS élevé (Goettsch, Augustin, et Morawietz 2004; Korff et al. 2008), alors que d'autres ont suggéré aucune variation ou une augmentation de l'expression de l'éphrine B2 dans les CE exposées à un LSS (Masumura et al. 2009; Meng et al. 2022). L'éphrine B1 a été montrée pour être exprimée par les CE (Vreeken et al. 2020) mais l'effet du flux sur son expression n'a jamais été étudié à notre connaissance. Ainsi, il serait intéressant de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans la physiologie de la CE sachant que la diminution de l'expression par SiRNA de l'éphrine B1 induit l'apoptose des HUVEC, particulièrement dans les HUVEC dites sénescents (Y. Zhu et al. 2015).

En conclusion, les expressions d'ITGB4 et d'AQP1 ont déjà été montrées pour être induites par un flux physiologique mais jamais par un flux pathologique tandis que les expressions de LGALS9 et EFNB1 n'ont jamais été montrées pour être augmentées par un LSS. Quant à la galectine-9, son implication dans le développement des plaques d'athérome vient d'être démontrée et semble contradictoire avec le fait qu'un flux physiologique engendrerait sa surexpression alors que l'OSS entrainerait la diminution de son expression. Ainsi, le candidat qui nous paraît le plus intéressant à étudier serait donc l'éphrine B1 dont ni l'expression, ni son implication dans l'athérosclérose n'a été démontrée jusqu'à aujourd'hui.

2.2.2. **DRP réprimées par un LSS et augmentées par un OSS : marqueur de la physiopathologie de l'athérosclérose ?**

a) Inhibitor of DNA binding 3 (ID3)

L'expression de ID3 est augmentée par l'OSS (valeur de FC de 2,37) et est diminuée par le LSS (valeur de FC de 0,56) mais n'a pas été retrouvée dans les résultats du protéome membranaire, probablement parce que ID3 est une protéine cytosolique. En effet, la famille de gènes ID régule la progression du cycle cellulaire et l'expression de multiples facteurs impliqués dans l'angiogénèse comme le VEGF et son récepteur VEGFR2, ou les intégrines $\alpha\beta4$ (Gadomski et al. 2020). Il a été déjà montré que l'expression de ID3 est significativement augmentée par un flux oscillatoire après 90 min dans des CE issues d'aorte de porc (J. Zhang et Friedman 2012) ou par un flux de faible intensité (1 dyn/cm²) dans les HUVEC après 24 heures (Mendez et al. 2022). Cependant son rôle dans la réponse au flux n'est pas connu. Par contre, et ce de manière contradictoire, dans un modèle murin d'athérosclérose, les souris KO pour *Id3* développent plus d'athérosclérose que les souris contrôle (Doran et al. 2010), suggérant que ID3 serait un facteur athéroprotectif et non athéropone.

b) EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1 (EFEMP1)

L'expression de EFEMP1 est diminuée par le LSS (valeur de FC de 0,52) mais n'est pas modulée par le OSS (valeur de FC de 1,05). Cependant, l'expression de EFEMP1 est fortement réprimée par le LSS en comparaison avec l'OSS à la suite de l'analyse du protéome membranaire avec une valeur de FC de 0,11. EFEMP1 est une protéine qui en se liant à l'EGFR joue un rôle dans l'adhésion cellulaire et la migration des cellules cancéreuses (Camaj et al. 2009; Song et al. 2011). Cependant son rôle dans la CE n'a jamais été décrite. Néanmoins, dans une étude

transcriptomique visant à identifier les gènes impliqués dans la rupture des plaques d'athérome, l'expression de EFEMP1 est significativement diminuée lorsque les plaques se rompent, les auteurs lui conférant ainsi un rôle dans la stabilité des plaques d'athérome (B.-F. Xu et al. 2020).

Ainsi, il semble difficile de corrélérer la diminution de l'expression de protéines lors d'un flux laminaire à une augmentation de son expression par un OSS (ID3) ou non (EFEMP1) à un phénotype athéropone et au développement de plaque d'athérome.

c) Pentraxine 3 (PTX3)

L'analyse protéomique révèle que l'expression de la pentraxine 3 (PTX3) est diminuée dans la condition LSS vs static (valeur de FC de 0,45) et non modifiée significativement dans la condition OSS vs static (valeur de FC de 0,73 non significatif). Concernant les résultats du protéome membranaire, l'expression de PTX3 est fortement et significativement réprimée par le LSS comparé à l'OSS avec une valeur de FC de 0,15. PTX3 est un médiateur de l'immunité innée et est impliqué dans un grand nombre de réponses biologiques incluant l'inflammation, l'angiogenèse, et le remodelage vasculaire, processus déterminants des maladies cardiovasculaires (M. Casula et al. 2017). En réponse à un stimulus inflammatoire comme l'IL1 β ou le TNF- α , les CE activent des facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1 impliqués dans la transcription du gène PTX3, permettant la libération de PTX3 dans la circulation sanguine et la propagation du signal inflammatoire (M. Casula et al. 2017). Une association entre le taux de PTX3 circulant et la dilatation flux-dépendante a été rapportée, montrant que la surexpression de PTX3 limite la production de NO et augmente la dysfonction endothéliale (Yongbo Zhao et al. 2014; Carrizzo et al. 2015). De plus, une corrélation positive entre PTX3 et le développement de plaques d'athérome a été reportée, mais est controversée par la petite taille des échantillons et le manque d'évaluation prospective (Soeki et al. 2011; Y. Xu et al. 2011; Karakas et al. 2013), tandis qu'une large cohorte prospective n'a pas identifié de corrélation entre PTX3 et le développement de l'athérosclérose (Baragetti et al. 2014; M. Casula et al. 2017).

Cependant sa régulation par le flux physiologique ou pathologique n'a jamais été décrite. Ainsi il serait intéressant de comprendre pourquoi PTX3 est moins exprimée lors d'un LSS vs un OSS et de mieux connaître son rôle dans la réponse au flux afin d'établir un lien entre cette régulation et son implication dans la dysfonction endothéliale et la progression de l'athérosclérose.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'ensemble de ce travail, initié lors de mon arrivée en thèse au laboratoire, a permis, par la mise en place et la validation de modèles de culture de CE (HUVEC et TeloHAEC) soumises à un flux laminaire physiologique (LSS) ou à un flux oscillatoire pathologique (OSS), d'identifier un nouveau rôle de la sous-unité Nav β 3 indépendamment de la sous-unité α des canaux Nav, et de mettre en lumière de nouvelles protéines signatures de la réponse au LSS et à l'OSS.

Bien que ce travail ait contribué à la mise en évidence de l'implication de la sous-unité Nav β 3 dans la mécanotransduction des CE en réponse à un flux vasculaire, il soulève de nombreuses questions, à savoir : Quelle est sa contribution dans la physiologie endothéliale ? Quelle est la localisation de Nav β 3 dans les CE ? Par quels mécanismes s'effectue la régulation de son expression ? La sous-unité Nav β 3 peut-elle être considérée comme un candidat à l'athéroprotection ?

Afin de finaliser le premier article présenté, il sera indispensable de vérifier prochainement notre hypothèse sur la séquestration de mTOR par son interaction directe avec Nav β 3 permettant l'induction de l'autophagie nécessaire à l'alignement des CE exposées à un flux laminaire.

La seconde étude de ce travail de thèse s'inscrit dans la recherche de nouvelles protéines signatures d'un flux physiologique LSS vs un flux pathologique OSS afin de mettre en évidence de nouveaux candidats potentiellement impliqués dans l'athéroprotection et/ou dans la physiopathologie de l'athérosclérose. L'éphrine B1, dont l'expression est augmentée par un LSS et diminuée par un OSS pourrait être un nouveau candidat impliqué dans la vasculoprotection alors que la pentraxine 3, dont l'expression est diminuée par un LSS, semble être plutôt associée à un phénotype athéroprone.

Il sera nécessaire de valider l'effet des différents types de forces mécaniques sur l'expression protéique de ces deux candidats potentiels, avant de détailler leur implication dans la mécanotransduction endothéliale en réponse à un flux physiologique ou pathologique.

BIBLIOGRAPHIE

- AbouAlaiwi, Wissam A., Maki Takahashi, Blair R. Mell, Thomas J. Jones, Shobha Ratnam, Robert J. Kolb, et Surya M. Nauli. 2009. « Ciliary Polycystin-2 Is a Mechanosensitive Calcium Channel Involved in Nitric Oxide Signaling Cascades ». *Circulation Research* 104 (7): 860-69. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.192765>.
- Adachi, Katsuya, Minoru Toyota, Yasushi Sasaki, Toshiharu Yamashita, Setsuko Ishida, Mutsumi Ohe-Toyota, Reo Maruyama, et al. 2004. « Identification of SCN3B as a Novel P53-Inducible Proapoptotic Gene ». *Oncogene* 23 (47): 7791-98. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208067>.
- Ahmed, Sara, Yu Jing, Bruce G. Mockett, Hu Zhang, Wickliffe C. Abraham, et Ping Liu. 2022. « Partial Endothelial Nitric Oxide Synthase Deficiency Exacerbates Cognitive Deficit and Amyloid Pathology in the APPswe/PS1ΔE9 Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (13): 7316. <https://doi.org/10.3390/ijms23137316>.
- Ahn, Sang Joon, Ibra S. Fancher, Jing-Tan Bian, Chong Xu Zhang, Sarah Schwab, Robert Gaffin, Shane A. Phillips, et Irena Levitan. 2017. « Inwardly Rectifying K⁺ Channels Are Major Contributors to Flow-Induced Vasodilatation in Resistance Arteries ». *The Journal of Physiology* 595 (7): 2339-64. <https://doi.org/10.1113/JP273255>.
- Ajami, Nassim E., Shakti Gupta, Mano R. Maurya, Phu Nguyen, Julie Yi-Shuan Li, John Y.-J. Shyy, Zhen Chen, Shu Chien, et Shankar Subramaniam. 2017. « Systems Biology Analysis of Longitudinal Functional Response of Endothelial Cells to Shear Stress ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (41): 10990-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707517114>.
- Alharbi, Yasser M., Abdulhadi I. Bima, et Ayman Z. Elsamanoudy. 2021. « An Overview of the Perspective of Cellular Autophagy: Mechanism, Regulation, and the Role of Autophagy Dysregulation in the Pathogenesis of Diseases ». *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 9 (2): 47-54. https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_33_20.
- Aman, T. K., T. M. Grieco-Calub, C. Chen, R. Rusconi, E. A. Slat, L. L. Isom, et I. M. Raman. 2009. « Regulation of Persistent Na Current by Interactions between Subunits of Voltage-Gated Na Channels ». *Journal of Neuroscience* 29 (7): 2027-42. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4531-08.2009>.
- Ando, Joji, et Kimiko Yamamoto. 2013. « Flow Detection and Calcium Signalling in Vascular Endothelial Cells ». *Cardiovascular Research* 99 (2): 260-68. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt084>.
- Andrikopoulos, Petros, Scott P. Fraser, Lisa Patterson, Zahida Ahmad, Hakan Burcu, Diego Ottaviani, James K. J. Diss, Carol Box, Suzanne A. Eccles, et Mustafa B. A. Djamgoz. 2011. « Angiogenic Functions of Voltage-Gated Na⁺ Channels in Human Endothelial Cells: Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (19): 16846-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187559>.
- Ariotti, Nicholas, et Robert G. Parton. 2013. « SnapShot: Caveolae, Caveolins, and Cavins ». *Cell* 154 (3): 704-704.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.009>.
- Audenaert, D., L. Claes, B. Ceulemans, A. Löfgren, C. Van Broeckhoven, et P. De Jonghe. 2003. « A Deletion in SCN1B Is Associated with Febrile Seizures and Early-Onset Absence Epilepsy ». *Neurology* 61 (6): 854-56. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000080362.55784.1c>.
- Ayajiki, Kazuhide, Markus Kindermann, Markus Hecker, Ingrid Fleming, et Rudi Busse. 1996. « Intracellular PH and Tyrosine Phosphorylation but Not Calcium Determine Shear Stress-Induced Nitric Oxide Production in Native Endothelial Cells ». *Circulation Research* 78 (5): 750-58. <https://doi.org/10.1161/01.RES.78.5.750>.
- Baeyens, Nicolas, Chiroosree Bandyopadhyay, Brian G. Coon, Sanguk Yun, et Martin A. Schwartz. 2016. « Endothelial Fluid Shear Stress Sensing in Vascular Health and Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (3): 821-28. <https://doi.org/10.1172/JCI83083>.
- Bagi, Zsolt, John A. Frangos, Jiunn-Chern Yeh, Charles R. White, Gabor Kaley, et Akos Koller. 2005. « PECAM-1 Mediates NO-Dependent Dilation of Arterioles to High Temporal Gradients of Shear Stress ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (8): 1590-95. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000170136.71970.5f>.
- Baker, P. F., A. L. Hodgkin, et T. I. Shaw. 1962. « Replacement of the axoplasm of giant nerve fibres with artificial solutions ». *The Journal of Physiology* 164 (2): 330-354.6.
- Ballermann, Barbara J., Alan Dardik, Eudora Eng, et Ailian Liu. 1998. « Shear Stress and the Endothelium ». *Kidney International, Renal Hemodynamics: Cellular and Molecular Determinants*, 54 (septembre): S100-108. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.06720.x>.
- Baragetti, A., M. Knoflach, I. Cuccovillo, L. Grigore, M. Casula, K. Garlaschelli, A. Mantovani, et al. 2014. « Pentraxin 3 (PTX3) Plasma Levels and Carotid Intima Media Thickness Progression in the General

- Population ». *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD* 24 (5): 518-23. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.10.030>.
- Barakat, Abdul I. 2008. « Dragging Along: The Glycocalyx and Vascular Endothelial Cell Mechanotransduction ». *Circulation Research* 102 (7): 747-48. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.174839>.
- Baratchi, Sara, Khashayar Khoshmanesh, Owen L. Woodman, Simon Potocnik, Karlheinz Peter, et Peter McIntyre. 2017. « Molecular Sensors of Blood Flow in Endothelial Cells ». *Trends in Molecular Medicine* 23 (9): 850-68. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.07.007>.
- Béguin, Eelke P., Esmée F. J. Janssen, Mark Hoogenboezem, Alexander B. Meijer, Arie J. Hoogendijk, et Maartje van den Biggelaar. 2020. « Flow-Induced Reorganization of Laminin-Integrin Networks Within the Endothelial Basement Membrane Uncovered by Proteomics ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 19 (7): 1179-92. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.001964>.
- Beneski, D. A., et W. A. Catterall. 1980. « Covalent Labeling of Protein Components of the Sodium Channel with a Photoactivable Derivative of Scorpion Toxin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (1): 639-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.639>.
- Berrougui, Hicham, Guillaume Grenier, Soumaya Loued, Geneviève Drouin, et Abdelouahed Khalil. 2009. « A New Insight into Resveratrol as an Atheroprotective Compound: Inhibition of Lipid Peroxidation and Enhancement of Cholesterol Efflux ». *Atherosclerosis* 207 (2): 420-27. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.05.017>.
- Beyder, Arthur, James L. Rae, Cheryl Bernard, Peter R. Strege, Frederick Sachs, et Gianrico Farrugia. 2010. « Mechanosensitivity of Nav1.5, a Voltage-Sensitive Sodium Channel ». *The Journal of Physiology* 588 (Pt 24): 4969-85. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199034>.
- Beyder, Arthur, Peter R. Strege, Santiago Reyes, Cheryl E. Bernard, Andre Terzic, Jonathan Makielski, Michael J. Ackerman, et Gianrico Farrugia. 2012. « Ranolazine Decreases Mechanosensitivity of the Voltage-Gated Sodium Ion Channel Na(v)1.5: A Novel Mechanism of Drug Action ». *Circulation* 125 (22): 2698-2706. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.094714>.
- Bhagyalakshmi, A., F. Berthiaume, K. M. Reich, et J. A. Frangos. 1992. « Fluid Shear Stress Stimulates Membrane Phospholipid Metabolism in Cultured Human Endothelial Cells ». *Journal of Vascular Research* 29 (6): 443-49. <https://doi.org/10.1159/000158963>.
- Bharath, Leena P., Robert Mueller, Youyou Li, Ting Ruan, David Kunz, Rebekah Goodrich, Tyler Mills, et al. 2014. « Impairment of Autophagy in Endothelial Cells Prevents Shear-Stress-Induced Increases in Nitric Oxide Bioavailability ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 92 (7): 605-12. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0017>.
- Birukov, Konstantin G. 2009. « Cyclic Stretch, Reactive Oxygen Species, and Vascular Remodeling ». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (7): 1651-67. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2390>.
- Black, Joel A., Shujun Liu, et Stephen G. Waxman. 2009. « Sodium Channel Activity Modulates Multiple Functions in Microglia ». *Glia* 57 (10): 1072-81. <https://doi.org/10.1002/glia.20830>.
- Black, Joel A., et Stephen G. Waxman. 2013. « Noncanonical Roles of Voltage-Gated Sodium Channels ». *Neuron* 80 (2): 280-91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.012>.
- Boccaro, Gilles, Cécile Choby, Jean Marc Frapier, Jean François Quignard, Joël Nargeot, Govindan Dayanithi, et Sylvain Richard. 1999. « Regulation of Ca²⁺ Homeostasis by Atypical Na⁺ Currents in Cultured Human Coronary Myocytes ». *Circulation Research* 85 (7): 606-13. <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.7.606>.
- Bolanowski, S. J., et J. J. Zwislocki. 1984. « Intensity and Frequency Characteristics of Pacinian Corpuscles. II. Receptor Potentials ». *Journal of Neurophysiology* 51 (4): 812-30. <https://doi.org/10.1152/jn.1984.51.4.812>.
- Bon, E., V. Driffort, F. Gradek, C. Martinez-Caceres, M. Anghelin, P. Pelegrin, M.-L. Cayuela, et al. 2016. « SCN4B Acts as a Metastasis-Suppressor Gene Preventing Hyperactivation of Cell Migration in Breast Cancer ». *Nature Communications* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13648>.
- Boo, Yong Chool, et Hanjoong Jo. 2003. « Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285 (3): C499-508. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00122.2003>.
- Boo, Yong Chool, George Sorescu, Nolan Boyd, Ichiro Shiojima, Kenneth Walsh, Jie Du, et Hanjoong Jo. 2002. « Shear Stress Stimulates Phosphorylation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase at Ser1179 by Akt-Independent Mechanisms ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (5): 3388-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108789200>.
- Boon, R. A., et A. J. G. Horrevoets. 2009. « Key Transcriptional Regulators of the Vasoprotective Effects of Shear Stress ». *Hamostaseologie* 29 (1): 39-40, 41-43.
- Bouza, Alexandra A., Nnamdi Edokobi, Samantha L. Hodges, Alexa M. Pinsky, James Offord, Lin Piao, Yan-Ting Zhao, Anatoli N. Lopatin, Luis F. Lopez-Santiago, et Lori L. Isom. 2021. « Sodium Channel B1 Subunits

- Participate in Regulated Intramembrane Proteolysis-Excitation Coupling ». *JCI Insight* 6 (3): 141776. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.141776>.
- Bouza, Alexandra A., et Lori L. Isom. 2018. « Chapter 14: Voltage-gated sodium channel β subunits and their related diseases ». *Handbook of experimental pharmacology* 246: 423-50. https://doi.org/10.1007/164_2017_48.
- Bouza, Alexandra A., Julie M. Philippe, Nnamdi Edokobi, Alexa M. Pinsky, James Offord, Jeffrey D. Calhoun, Mariana Lopez-Florán, Luis F. Lopez-Santiago, Paul M. Jenkins, et Lori L. Isom. 2020. « Sodium Channel B1 Subunits Are Post-Translationally Modified by Tyrosine Phosphorylation, S-Palmitoylation, and Regulated Intramembrane Proteolysis ». *The Journal of Biological Chemistry* 295 (30): 10380-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013978>.
- Boya, Patricia, Fulvio Reggiori, et Patrice Codogno. 2013. « Emerging Regulation and Functions of Autophagy ». *Nature Cell Biology* 15 (7): 713-20. <https://doi.org/10.1038/ncb2788>.
- Boyd, Nolan L., Heonyong Park, Hong Yi, Yong Chool Boo, George P. Sorescu, Michelle Sykes, et Hanjoong Jo. 2003. « Chronic Shear Induces Caveolae Formation and Alters ERK and Akt Responses in Endothelial Cells ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 285 (3): H1113-1122. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00302.2003>.
- Brackenbury, William, et Lori Isom. 2011. « Na⁺ Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family ». *Frontiers in Pharmacology* 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2011.00053>.
- Brackenbury, W.J., T.H. Davis, C. Chen, E.A. Slat, M.J. Detrow, T.L. Dickendesher, B. Ranscht, et L.L. Isom. 2008. « Voltage-Gated Na⁺ Channel β 1 Subunit-Mediated Neurite Outgrowth Requires Fyn Kinase and Contributes to Postnatal CNS Development in Vivo ». *Journal of Neuroscience* 28 (12): 3246-56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5446-07.2008>.
- Bray, Sarah J, et Maria Gomez-Lamarca. 2018. « Notch after Cleavage ». *Current Opinion in Cell Biology, Cell Signalling*, 51 (avril): 103-9. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.12.008>.
- Brohawn, Stephen G., Zhenwei Su, et Roderick MacKinnon. 2014. « Mechanosensitivity Is Mediated Directly by the Lipid Membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ Channels ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (9): 3614-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320768111>.
- Brugada, P., et J. Brugada. 1992. « Right Bundle Branch Block, Persistent ST Segment Elevation and Sudden Cardiac Death: A Distinct Clinical and Electrocardiographic Syndrome. A Multicenter Report ». *Journal of the American College of Cardiology* 20 (6): 1391-96. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(92\)90253-j](https://doi.org/10.1016/0735-1097(92)90253-j).
- Busse, Rudi, et Alexander Mülsch. 1990. « Calcium-Dependent Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cytosol Is Mediated by Calmodulin ». *FEBS Letters* 265 (1-2): 133-36. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80902-U](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80902-U).
- Buul, Jaap D. van, et Peter L. Hordijk. 2004. « Signaling in Leukocyte Transendothelial Migration ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (5): 824-33. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000122854.76267.5c>.
- Cabral, Pablo D., et Jeffrey L. Garvin. 2014. « TRPV4 activation mediates flow-induced nitric oxide production in the rat thick ascending limb ». *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 307 (6): F666-72. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00619.2013>.
- Cai, Benzhi, Ning Wang, Wei-ke Mao, Tao You, Yan Lu, Xiang Li, Bo Ye, Faqian Li, et Haodong Xu. 2014. « Deletion of FoxO1 Leads to Shortening of QRS by Increasing Na⁺ Channel Activity through Enhanced Expression of Both Cardiac NaV1.5 and B3 Subunit ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 74 (septembre): 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.06.006>.
- Calhoun, Jeffrey D., et Lori L. Isom. 2014. « The Role of Non-Pore-Forming β Subunits in Physiology and Pathophysiology of Voltage-Gated Sodium Channels ». *Handbook of Experimental Pharmacology* 221: 51-89. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41588-3_4.
- Caligiuri, Giuseppina. 2020. « CD31 as a Therapeutic Target in Atherosclerosis ». *Circulation Research* 126 (9): 1178-89. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.315935>.
- Camaj, Peter, Hendrik Seeliger, Ivan Ischenko, Stefan Krebs, Helmut Blum, Enrico N. De Toni, Dagmar Faktorova, Karl-Walter Jauch, et Christiane J. Bruns. 2009. « EFEMP1 Binds the EGF Receptor and Activates MAPK and Akt Pathways in Pancreatic Carcinoma Cells ». *Biological Chemistry* 390 (12): 1293-1302. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.140>.
- Cao, X., et T. C. Südhof. 2001. « A Transcriptionally [Correction of Transcriptively] Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60 ». *Science (New York, N.Y.)* 293 (5527): 115-20. <https://doi.org/10.1126/science.1058783>.
- Carrithers, Michael D., Sulayman Dib-Hajj, Lisette M. Carrithers, Gouzel Tokmoulina, Marc Pypaert, Elizabeth A. Jonas, et Stephen G. Waxman. 2007. « Expression of the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 in the Macrophage Late Endosome Regulates Endosomal Acidification ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (12): 7822-32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7822>.

- Carrizzo, Albino, Paola Lenzi, Claudio Procaccini, Antonio Damato, Francesca Biagioni, Mariateresa Ambrosio, Giuseppina Amodio, et al. 2015. « Pentraxin 3 Induces Vascular Endothelial Dysfunction Through a P-Selectin/Matrix Metalloproteinase-1 Pathway ». *Circulation* 131 (17): 1495-1505; discussion 1505. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014822>.
- Casula, Maria A., Paul Facer, Andrew J. Powell, Ian J. Kinghorn, Christopher Plumptre, Simon N. Tate, Chas Bountra, Rolfe Birch, et Praveen Anand. 2004. « Expression of the Sodium Channel Beta3 Subunit in Injured Human Sensory Neurons ». *Neuroreport* 15 (10): 1629-32. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000134927.02776.ae>.
- Casula, Matteo, Fabrizio Montecucco, Aldo Bonaventura, Luca Liberale, Alessandra Vecchié, Franco Dallegri, et Federico Carbone. 2017. « Update on the Role of Pentraxin 3 in Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases ». *Vascular Pharmacology* 99 (décembre): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.10.003>.
- Catterall, William A. 2000. « From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels ». *Neuron* 26 (1): 13-25. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81133-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81133-2).
- Catterall, William A. 2012. « Voltage-Gated Sodium Channels at 60: Structure, Function and Pathophysiology ». *The Journal of Physiology* 590 (11): 2577-89. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204>.
- Catterall, William A., Alan L. Goldin, et Stephen G. Waxman. 2005. « International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels ». *Pharmacological Reviews* 57 (4): 397-409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>.
- Catterall, William A., Alan L. Goldin, Stephen G. Waxman, et International Union of Pharmacology. 2003. « International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Sodium Channels ». *Pharmacological Reviews* 55 (4): 575-78. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.7>.
- Chachisvilis, Mirianas, Yan-Liang Zhang, et John A. Frangos. 2006. « G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (42): 15463-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607224103>.
- Chang, Y. S., J. A. Yaccino, S. Lakshminarayanan, J. A. Frangos, et J. M. Tarbell. 2000. « Shear-Induced Increase in Hydraulic Conductivity in Endothelial Cells Is Mediated by a Nitric Oxide-Dependent Mechanism ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (1): 35-42.
- Chatterjee, Shampa. 2018. « Endothelial Mechanotransduction, Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways ». *Frontiers in Physiology* 9: 524. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00524>.
- Chatzizisis, Yiannis S., Ahmet Umit Coskun, Michael Jonas, Elazer R. Edelman, Charles L. Feldman, et Peter H. Stone. 2007. « Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling: Molecular, Cellular, and Vascular Behavior ». *Journal of the American College of Cardiology* 49 (25): 2379-93. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.059>.
- Chen, Chunling, Vandana Bharucha, Yuan Chen, Ruth E. Westenbroek, Angus Brown, Jyoti Dhar Malhotra, Dorothy Jones, et al. 2002. « Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel β 2-subunits ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (26): 17072-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.212638099>.
- Chen, Chunling, Jeffrey D. Calhoun, Yanqing Zhang, Luis Lopez-Santiago, Ningna Zhou, Tigwa H. Davis, James L. Salzer, et Lori L. Isom. 2012. « Identification of the Cysteine Residue Responsible for Disulfide Linkage of Na⁺ Channel α and β 2 Subunits ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (46): 39061-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397646>.
- Chen, Chunling, Ruth E. Westenbroek, Xiaorong Xu, Chris A. Edwards, Dorothy R. Sorenson, Yuan Chen, Dyke P. McEwen, et al. 2004. « Mice Lacking Sodium Channel β 1 Subunits Display Defects in Neuronal Excitability, Sodium Channel Expression, and Nodal Architecture ». *Journal of Neuroscience* 24 (16): 4030-42. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4139-03.2004>.
- Chen, K. D., Y. S. Li, M. Kim, S. Li, S. Yuan, S. Chien, et J. Y. Shyy. 1999. « Mechanotransduction in Response to Shear Stress. Roles of Receptor Tyrosine Kinases, Integrins, and Shc ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (26): 18393-400. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18393>.
- Chen, Ming-Liang, Long Yi, Xin Jin, Xin-Yu Liang, Yong Zhou, Ting Zhang, Qi Xie, et al. 2013. « Resveratrol Attenuates Vascular Endothelial Inflammation by Inducing Autophagy through the AMPK Signaling Pathway ». *Autophagy* 9 (12): 2033-45. <https://doi.org/10.4161/auto.26336>.
- Chen, Xi-Lin, Signe E. Varner, Anjali S. Rao, Janice Y. Grey, Suzanne Thomas, Christopher K. Cook, Martin A. Wasserman, Russell M. Medford, Anil K. Jaiswal, et Charles Kunsch. 2003. « Laminar Flow Induction of Antioxidant Response Element-Mediated Genes in Endothelial Cells: A NOVEL ANTI-INFLAMMATORY MECHANISM * ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (2): 703-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203161200>.

- Chen, Zhongming, et Ellie Tzima. 2009. « PECAM-1 Is Necessary for Flow-Induced Vascular Remodeling ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (7): 1067-73. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.186692>.
- Chen-Konak, Limor, Yulia Guetta-Shubin, Hava Yahav, Ayelet Shay-Salit, Michal Zilberman, Ofer Binah, et Nitzan Resnick. 2003. « Transcriptional and Post-Translation Regulation of the Tie1 Receptor by Fluid Shear Stress Changes in Vascular Endothelial Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (14): 2121-23. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1151fje>.
- Chien, Shu. 2003. « Molecular and Mechanical Bases of Focal Lipid Accumulation in Arterial Wall ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 83 (2): 131-51. [https://doi.org/10.1016/s0079-6107\(03\)00053-1](https://doi.org/10.1016/s0079-6107(03)00053-1).
- Chioni, Athina-Myrto, William J. Brackenbury, Jeffrey D. Calhoun, Lori L. Isom, et Mustafa B. A. Djamgoz. 2009. « A Novel Adhesion Molecule in Human Breast Cancer Cells: Voltage-Gated Na⁺ Channel B1 Subunit ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (5): 1216-27. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.11.001>.
- Chistiakov, D. A., A. N. Orekhov, et Y. V. Bobryshev. 2017. « Effects of Shear Stress on Endothelial Cells: Go with the Flow ». *Acta Physiologica* 219 (2): 382-408. <https://doi.org/10.1111/apha.12725>.
- Choi, Hyun-Jung, Na-Eun Kim, Byeong Mo Kim, Miran Seo, et Ji Hoe Heo. 2018. « TNF- α -Induced YAP/TAZ Activity Mediates Leukocyte-Endothelial Adhesion by Regulating VCAM1 Expression in Endothelial Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11): E3428. <https://doi.org/10.3390/ijms19113428>.
- Chuang, Yu-Chia, et Chih-Cheng Chen. 2022. « Force From Filaments: The Role of the Cytoskeleton and Extracellular Matrix in the Gating of Mechanosensitive Channels ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 886048. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.886048>.
- Coan, D.E., A.R. Wechezak, R.F. Viggers, et L.R. Sauvage. 1993. « Effect of shear stress upon localization of the Golgi apparatus and microtubule organizing center in isolated cultured endothelial cells ». *Journal of Cell Science* 104 (4): 1145-53. <https://doi.org/10.1242/jcs.104.4.1145>.
- Conway, Daniel E., et Martin A. Schwartz. 2015. « Mechanotransduction of Shear Stress Occurs through Changes in VE-Cadherin and PECAM-1 Tension: Implications for Cell Migration ». *Cell Adhesion & Migration* 9 (5): 335-39. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.968498>.
- Coon, Brian G., Nicolas Baeyens, Jinah Han, Madhusudhan Budatha, Tyler D. Ross, Jennifer S. Fang, Sanguk Yun, Jeon-Leon Thomas, et Martin A. Schwartz. 2015. « Intramembrane Binding of VE-Cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 Assembles the Endothelial Mechanosensory Complex ». *The Journal of Cell Biology* 208 (7): 975-86. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408103>.
- Coste, Bertrand, Jayanti Mathur, Manuela Schmidt, Taryn J. Earley, Sanjeev Ranade, Matt J. Petrus, Adrienne E. Dubin, et Ardem Patapoutian. 2010. « Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels ». *Science (New York, N.Y.)* 330 (6000): 55-60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>.
- Cox, Charles D., Chilman Bae, Lynn Ziegler, Silas Hartley, Vesna Nikolova-Krstevski, Paul R. Rohde, Chai-Ann Ng, Frederick Sachs, Philip A. Gottlieb, et Boris Martinac. 2016. « Removal of the Mechanoprotective Influence of the Cytoskeleton Reveals PIEZO1 Is Gated by Bilayer Tension ». *Nature Communications* 7 (janvier): 10366. <https://doi.org/10.1038/ncomms10366>.
- Cox, Charles D., Navid Bavi, et Boris Martinac. 2019. « Biophysical Principles of Ion-Channel-Mediated Mechanosensory Transduction ». *Cell Reports* 29 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.075>.
- Cuervo, Ana Maria, et Esther Wong. 2014. « Chaperone-Mediated Autophagy: Roles in Disease and Aging ». *Cell Research* 24 (1): 92-104. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153>.
- Cusdin, Fiona S., Daniel Nietlispach, Joseph Maman, Timothy J. Dale, Andrew J. Powell, Jeffrey J. Clare, et Antony P. Jackson. 2010. « The Sodium Channel B3-Subunit Induces Multiphasic Gating in NaV1.3 and Affects Fast Inactivation via Distinct Intracellular Regions ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (43): 33404-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.114058>.
- Davis, M. E., H. Cai, G. R. Drummond, et D. G. Harrison. 2001. « Shear Stress Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression through C-Src by Divergent Signaling Pathways ». *Circulation Research* 89 (11): 1073-80. <https://doi.org/10.1161/hh2301.100806>.
- Davis, Michael E., Isabella M. Grumbach, Tohru Fukai, Alexis Cutchins, et David G. Harrison. 2004. « Shear Stress Regulates Endothelial Nitric-Oxide Synthase Promoter Activity through Nuclear Factor KB Binding ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (1): 163-68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307528200>.
- Davis, Michael J., Scott Earley, Yi-Shuan Li, et Shu Chien. 2023. « Vascular Mechanotransduction ». *Physiological Reviews*, janvier. <https://doi.org/10.1152/physrev.00053.2021>.
- Davis, Tigwa H., Chunling Chen, et Lori L. Isom. 2004. « Sodium Channel B1 Subunits Promote Neurite Outgrowth in Cerebellar Granule Neurons* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (49): 51424-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410830200>.

- Deane, James A., et Sharon D. Ricardo. 2007. « Polycystic Kidney Disease and the Renal Cilium ». *Nephrology (Carlton, Vic.)* 12 (6): 559-64. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00869.x>.
- Dejana, Elisabetta, Fabrizio Orsenigo, Cinzia Molendini, Peter Baluk, et Donald M. McDonald. 2009. « Organization and Signaling of Endothelial Cell-to-Cell Junctions in Various Regions of the Blood and Lymphatic Vascular Trees ». *Cell and Tissue Research* 335 (1): 17-25. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0694-5>.
- Dekker, Rob J., Reinier A. Boon, Mariska G. Rondaij, Astrid Kragt, Oscar L. Volger, Yvonne W. Elderkamp, Joost C. M. Meijers, Jan Voorberg, Hans Pannekoek, et Anton J. G. Horrevoets. 2006. « KLF2 Provokes a Gene Expression Pattern That Establishes Functional Quiescent Differentiation of the Endothelium ». *Blood* 107 (11): 4354-63. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3465>.
- Delmas, Patrick, Hideki Nomura, Xiaogang Li, Montaha Lakkis, Ying Luo, Yoav Segal, Jose M. Fernández-Fernández, et al. 2002. « Constitutive Activation of G-Proteins by Polycystin-1 Is Antagonized by Polycystin-2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13): 11276-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110483200>.
- Denac, H., M. Mevissen, et G. Scholtysik. 2000. « Structure, Function and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium Channels ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362 (6): 453-79. <https://doi.org/10.1007/s002100000319>.
- Dewey, C. F., S. R. Bussolari, M. A. Gimbrone, et P. F. Davies. 1981. « The Dynamic Response of Vascular Endothelial Cells to Fluid Shear Stress ». *Journal of Biomechanical Engineering* 103 (3): 177-85. <https://doi.org/10.1115/1.3138276>.
- Dimmeler, S., B. Assmus, C. Hermann, J. Haendeler, et A. M. Zeiher. 1998. « Fluid Shear Stress Stimulates Phosphorylation of Akt in Human Endothelial Cells: Involvement in Suppression of Apoptosis ». *Circulation Research* 83 (3): 334-41. <https://doi.org/10.1161/01.res.83.3.334>.
- Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, et A. M. Zeiher. 1999. « Activation of Nitric Oxide Synthase in Endothelial Cells by Akt-Dependent Phosphorylation ». *Nature* 399 (6736): 601-5. <https://doi.org/10.1038/21224>.
- Dimmeler, S., J. Haendeler, M. Nehls, et A. M. Zeiher. 1997. « Suppression of Apoptosis by Nitric Oxide via Inhibition of Interleukin-1 β -Converting Enzyme (ICE)-like and Cysteine Protease Protein (CPP)-32-like Proteases ». *The Journal of Experimental Medicine* 185 (4): 601-7. <https://doi.org/10.1084/jem.185.4.601>.
- Dimmeler, S., C. Hermann, J. Galle, et Andreas M. Zeiher. 1999. « Upregulation of Superoxide Dismutase and Nitric Oxide Synthase Mediates the Apoptosis-Suppressive Effects of Shear Stress on Endothelial Cells ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19 (3): 656-64. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.3.656>.
- Dimmeler, S., et A. M. Zeiher. 1999. « Nitric Oxide-an Endothelial Cell Survival Factor ». *Cell Death and Differentiation* 6 (10): 964-68. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400581>.
- Diss, J. K., S. N. Archer, J. Hirano, S. P. Fraser, et M. B. Djamgoz. 2001. « Expression Profiles of Voltage-Gated Na(+) Channel Alpha-Subunit Genes in Rat and Human Prostate Cancer Cell Lines ». *The Prostate* 48 (3): 165-78. <https://doi.org/10.1002/pros.1095>.
- Diss, J. K. J., S. P. Fraser, M. M. Walker, A. Patel, D. S. Latchman, et M. B. A. Djamgoz. 2008. « β -Subunits of Voltage-Gated Sodium Channels in Human Prostate Cancer: Quantitative in Vitro and in Vivo Analyses of mRNA Expression ». *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 11 (4): 325-33. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4501012>.
- Diss, J. K. J., D. Stewart, F. Pani, C. S. Foster, M. M. Walker, A. Patel, et M. B. A. Djamgoz. 2005. « A Potential Novel Marker for Human Prostate Cancer: Voltage-Gated Sodium Channel Expression in Vivo ». *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 8 (3): 266-73. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500796>.
- Doddaballapur, Anuradha, Katharina M. Michalik, Yosif Manavski, Tina Lucas, Riekelt H. Houtkooper, Xintian You, Wei Chen, et al. 2015. « Laminar Shear Stress Inhibits Endothelial Cell Metabolism via KLF2-Mediated Repression of PFKFB3 ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35 (1): 137-45. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304277>.
- D'Onofrio, Nunzia, Celestino Sardu, Maria Consiglia Trotta, Lucia Scisciola, Fabrizio Turriziani, Franca Ferraraccio, Iacopo Panarese, et al. 2021. « Sodium-Glucose Co-Transporter2 Expression and Inflammatory Activity in Diabetic Atherosclerotic Plaques: Effects of Sodium-Glucose Co-Transporter2 Inhibitor Treatment ». *Molecular Metabolism* 54 (décembre): 101337. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101337>.
- Doran, Amanda C, Allison B Lehtinen, Nahum Meller, Michael J Lipinski, R Parker Slayton, Stephanie N Oldham, Marcus D Skaflen, et al. 2010. « Id3 Is a Novel Atheroprotective Factor Containing a Functionally Significant Single-Nucleotide Polymorphism Associated with Intima-Media Thickness in Humans ». *Circulation Research* 106 (7): 1303-11. <https://doi.org/10.1161/circresaha.109.210294>.

- Dorland, Yvonne L., et Stephan Huveneers. 2017. « Cell-Cell Junctional Mechanotransduction in Endothelial Remodeling ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 74 (2): 279-92. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2325-8>.
- Dragt, Bieuwke S., Ellen L. van Agtmaal, Bas de Laat, et Jan Voorberg. 2012. « Effect of Laminar Shear Stress on the Distribution of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells ». *Thrombosis Research* 130 (5): 741-45. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.08.301>.
- Dravet, Charlotte. 2011. « Dravet Syndrome History ». *Developmental Medicine and Child Neurology* 53 Suppl 2 (avril): 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2011.03964.x>.
- Dreger, Henryk, Kera Westphal, Nicola Wilck, Gert Baumann, Verena Stangl, Karl Stangl, et Silke Meiners. 2010. « Protection of Vascular Cells from Oxidative Stress by Proteasome Inhibition Depends on Nrf2 ». *Cardiovascular Research* 85 (2): 395-403. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp279>.
- Du, Juan, Xin Ma, Bing Shen, Yu Huang, Lutz Birnbaumer, et Xiaoqiang Yao. 2014. « TRPV4, TRPC1, and TRPP2 Assemble to Form a Flow-Sensitive Heteromeric Channel ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (11): 4677-85. <https://doi.org/10.1096/fj.14-251652>.
- Dulsat, Gemma, Sonia Palomeras, Eric Cortada, Helena Riuró, Ramon Brugada, et Marcel Vergés. 2017. « Trafficking and localisation to the plasma membrane of Nav1.5 promoted by the $\beta 2$ subunit is defective due to a $\beta 2$ mutation associated with Brugada syndrome ». *Biology of the Cell* 109 (7): 273-91. <https://doi.org/10.1111/boc.201600085>.
- Earley, Scott, Thierry Pauyo, Rebecca Drapp, Matthew J. Tavares, Wolfgang Liedtke, et Joseph E. Brayden. 2009. « TRPV4-Dependent Dilation of Peripheral Resistance Arteries Influences Arterial Pressure ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297 (3): H1096-1102. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00241.2009>.
- Ebeigbe, Anthony B., et Olufunke O. Talabi. 2014. « Vascular Effects of Histamine ». *Nigerian Journal of Physiological Sciences: Official Publication of the Physiological Society of Nigeria* 29 (1): 7-10.
- Echarri, Asier, et Miguel A. Del Pozo. 2015. « Caveolae - Mechanosensitive Membrane Invaginations Linked to Actin Filaments ». *Journal of Cell Science* 128 (15): 2747-58. <https://doi.org/10.1242/jcs.153940>.
- Egorova, Anastasia D., Kim van der Heiden, Robert E. Poelmann, et Beerend P. Hierck. 2012. « Primary Cilia as Biomechanical Sensors in Regulating Endothelial Function ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 83 (2): S56-61. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.007>.
- Erdogmus, Serap, Ursula Storch, Laura Danner, Jasmin Becker, Michaela Winter, Nicole Ziegler, Angela Wirth, et al. 2019. « Helix 8 Is the Essential Structural Motif of Mechanosensitive GPCRs ». *Nature Communications* 10 (1): 5784. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13722-0>.
- Fahmi, A.I., M. Patel, E.B. Stevens, A.L. Fowden, J.E. John III, K. Lee, R. Pinnock, K. Morgan, A.P. Jackson, et J.I. Vandenberg. 2001. « The Sodium Channel β -Subunits SCN3b Modulates the Kinetics of SCN5a and Is Expressed Heterogeneously in Sheep Heart ». *Journal of Physiology* 537 (3): 693-700. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.012691>.
- Fancher, Ibra S., et Irena Levitan. 2020. « Endothelial Inwardly-Rectifying K⁺ Channels as a Key Component of Shear Stress-Induced Mechanotransduction ». *Current Topics in Membranes* 85: 59-88. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2020.02.002>.
- Fang, Yun, et Peter F. Davies. 2012. « Site-Specific MicroRNA-92a Regulation of Kruppel-like Factors 4 and 2 in Atherosusceptible Endothelium ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (4): 979-87. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.244053>.
- Fang, Yun, Emile R. Mohler, Esther Hsieh, Hashim Osman, Seyed M. Hashemi, Peter F. Davies, George H. Rothblat, Robert L. Wilensky, et Irena Levitan. 2006. « Hypercholesterolemia Suppresses Inwardly Rectifying K⁺ Channels in Aortic Endothelium in Vitro and in Vivo ». *Circulation Research* 98 (8): 1064-71. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000218776.87842.43>.
- Fang, Yun, Gernot Schram, Victor G. Romanenko, Congzhu Shi, Lisa Conti, Carol A. Vandenberg, Peter F. Davies, Stanley Nattel, et Irena Levitan. 2005. « Functional expression of Kir2.x in human aortic endothelial cells: the dominant role of Kir2.2 ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 289 (5): C1134-44. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00077.2005>.
- Farzan, M., C. E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung, et H. Choe. 2000. « BACE2, a Beta -Secretase Homolog, Cleaves at the Beta Site and within the Amyloid-Beta Region of the Amyloid-Beta Precursor Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17): 9712-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.160115697>.
- Fendri-Kriaa, N., F. Kammoun, I. Hadj Salem, C. Kifagi, E. Mkaouar-Rebai, I. Hsairi, A. Rebai, C. Triki, et F. Fakhfakh. 2011. « New Mutation c.374C>T and a Putative Disease-Associated Haplotype within SCN1B Gene in Tunisian Families with Febrile Seizures ». *European Journal of Neurology* 18 (5): 695-702. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03216.x>.

- Feng, Shuang, Neil Bowden, Maria Fragiadaki, Celine Souilhol, Sarah Hsiao, Marwa Mahmoud, Scott Allen, et al. 2017. « Mechanical Activation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Drives Endothelial Dysfunction at Atheroprone Sites ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37 (11): 2087-2101. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309249>.
- Figueroa, Carlos D., Alejandra Marchant, Ulises Novoa, Ulrich Förstermann, Kurt Jarnagin, Bernward Schölkens, et Werner Müller-Esterl. 2001. « Differential Distribution of Bradykinin B2 Receptors in the Rat and Human Cardiovascular System ». *Hypertension* 37 (1): 110-20. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.37.1.110>.
- Figueroa, Xavier F., Chien-Chang Chen, Kevin P. Campbell, David N. Damon, Kathleen H. Day, Susan Ramos, et Brian R. Duling. 2007. « Are Voltage-Dependent Ion Channels Involved in the Endothelial Cell Control of Vasomotor Tone? » *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 293 (3): H1371-1383. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01368.2006>.
- Fisher, Robert S., Carlos Acevedo, Alexis Arzimanoglou, Alicia Bogacz, J. Helen Cross, Christian E. Elger, Jerome Engel, et al. 2014. « ILAE Official Report: A Practical Clinical Definition of Epilepsy ». *Epilepsia* 55 (4): 475-82. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>.
- Flegler, Vanessa Judith, Akiko Rasmussen, Karina Borbil, Lea Boten, Hsuan-Ai Chen, Hanna Deinlein, Julia Halang, et al. 2021. « Mechanosensitive Channel Gating by Delipidation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (33): e2107095118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2107095118>.
- Fleming, I., et R. Busse. 1999. « Signal Transduction of ENOS Activation ». *Cardiovascular Research* 43 (3): 532-41. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00094-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00094-2).
- Florian, Jeffry A, Jason R Kosky, Kristy Ainslie, Zhengyu Pang, Randal O Dull, et John M Tarbell. 2003. « Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Mechanosensor on Endothelial Cells ».
- Foks, Amanda C., Ingrid A. Ran, Loes Wasserman, Vanessa Frodermann, Mariëtte N. D. Ter Borg, Saskia C. A. de Jager, Peter J. van Santbrink, et al. 2013. « T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 3 Acts as a Negative Regulator of Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (11): 2558-65. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301879>.
- Fontijn, Ruud D., Oscar L. Volger, Tineke C. van der Pouw-Kraan, Anuradha Doddaballapur, Thomas Leyen, Josefien M. Baggen, Reinier A. Boon, et Anton J. G. Horrevoets. 2015. « Expression of Nitric Oxide-Transporting Aquaporin-1 Is Controlled by KLF2 and Marks Non-Activated Endothelium In Vivo ». *PLoS One* 10 (12): e0145777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145777>.
- Fort, Aurélie, Magali Cordaillat, Catherine Thollon, Guillermo Salazar, Ilana Mechaly, Nicole Villeneuve, Jean-Paul Vilaine, Sylvain Richard, et Anne Virsolvy. 2009. « New Insights in the Contribution of Voltage-Gated Nav Channels to Rat Aorta Contraction ». *PLoS ONE* 4 (10): e7360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007360>.
- Fraser, Scott P., James K. J. Diss, Athina-Myrto Chioni, Maria E. Mycielska, Huiyan Pan, Rezan F. Yamaci, Filippo Pani, et al. 2005. « Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (15): 5381-89. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327>.
- Freeman, Sean A., Anne Desmazières, Desdemona Fricker, Catherine Lubetzki, et Nathalie Sol-Foulon. 2016. « Mechanisms of Sodium Channel Clustering and Its Influence on Axonal Impulse Conduction ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (4): 723-35. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2081-1>.
- Freyberg, M. A., D. Kaiser, R. Graf, J. Bittenbender, et P. Friedl. 2001. « Proatherogenic Flow Conditions Initiate Endothelial Apoptosis via Thrombospondin-1 and the Integrin-Associated Protein ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286 (1): 141-49. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5314>.
- Fulton, D., J. P. Gratton, et W. C. Sessa. 2001. « Post-Translational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Why Isn't Calcium/Calmodulin Enough? » *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299 (3): 818-24.
- Gadomski, Stephen, Satyendra K. Singh, Shweta Singh, Tanmoy Sarkar, Kimberly D. Klarmann, Maximillian Berenschot, Steven Seaman, et al. 2020. « Id1 and Id3 Maintain Steady-State Hematopoiesis by Promoting Sinusoidal Endothelial Cell Survival and Regeneration ». *Cell Reports* 31 (4): 107572. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107572>.
- Galbraith, C. G., R. Skalak, et S. Chien. 1998. « Shear Stress Induces Spatial Reorganization of the Endothelial Cell Cytoskeleton ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 40 (4): 317-30. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1998\)40:4<317::AID-CM1>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1998)40:4<317::AID-CM1>3.0.CO;2-8).
- Gallagher, Laura E., Leon E. Williamson, et Edmond Y. W. Chan. 2016. « Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms ». *Cells* 5 (2): E24. <https://doi.org/10.3390/cells5020024>.
- Gao, Xiaochong, Ling Wu, et Roger G. O'Neil. 2003. « Temperature-Modulated Diversity of TRPV4 Channel Gating: ACTIVATION BY PHYSICAL STRESSES AND PHORBOL ESTER DERIVATIVES THROUGH PROTEIN KINASE

- C-DEPENDENT AND -INDEPENDENT PATHWAYS* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (29): 27129-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302517200>.
- García-Cardena, Guillermo, Roger Fan, Vijay Shah, Raffaella Sorrentino, Giuseppe Cirino, Andreas Papapetropoulos, et William C. Sessa. 1998. « Dynamic Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Hsp90 ». *Nature* 392 (6678): 821-24. <https://doi.org/10.1038/33934>.
- García-Cardena, Guillermo, Roger Fan, David F. Stern, Jianwei Liu, et William C. Sessa. 1996. « Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Regulated by Tyrosine Phosphorylation and Interacts with Caveolin-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (44): 27237-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27237>.
- Garcia-Gonzalez, Miguel A., Patricia Outeda, Qin Zhou, Fang Zhou, Luis F. Menezes, Feng Qian, David L. Huso, Gregory G. Germino, Klaus B. Piontek, et Terry Watnick. 2010. « Pkd1 and Pkd2 Are Required for Normal Placental Development ». Édité par Amit Singh. *PLoS ONE* 5 (9): e12821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012821>.
- Gassen, Koen L. I. van, Marina de Wit, Marian van Kempen, W. Saskia van der Hel, Peter C. van Rijen, Antony P. Jackson, Dick Lindhout, et Pierre N. E. de Graan. 2009. « Hippocampal Nabetas3 Expression in Patients with Temporal Lobe Epilepsy ». *Epilepsia* 50 (4): 957-62. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.02015.x>.
- Gatica, Damián, Mario Chiong, Sergio Lavandero, et Daniel J. Klionsky. 2015. « Molecular Mechanisms of Autophagy in the Cardiovascular System ». *Circulation Research* 116 (3): 456-67. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303788>.
- Geffeney, Shana, Edmund D. Brodie, Peter C. Ruben, et Edmund D. Brodie. 2002. « Mechanisms of Adaptation in a Predator-Prey Arms Race: TTX-Resistant Sodium Channels ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5585): 1336-39. <https://doi.org/10.1126/science.1074310>.
- Gilchrist, John, Samir Das, Filip Van Petegem, et Frank Bosmans. 2013. « Crystallographic insights into sodium-channel modulation by the $\beta 4$ subunit ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (51): E5016-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314557110>.
- Gimbrone, M. A., J. N. Topper, T. Nagel, K. R. Anderson, et G. Garcia-Cardena. 2000. « Endothelial Dysfunction, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 902 (mai): 230-39; discussion 239-240. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06318.x>.
- Gimbrone, Michael A., et Guillermo García-Cardena. 2016. « Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis ». *Circulation Research* 118 (4): 620-36. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>.
- Giudicessi, John R., et Michael J. Ackerman. 2013. « Genotype- and Phenotype-Guided Management of Congenital Long QT Syndrome ». *Current Problems in Cardiology* 38 (10): 417-55. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2013.08.001>.
- Givens, Chris, et Ellie Tzima. 2016. « Endothelial Mechanosignaling: Does One Sensor Fit All? ». *Antioxidants & Redox Signaling* 25 (7): 373-88. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6493>.
- Goettsch, Winfried, Hellmut G. Augustin, et Henning Morawietz. 2004. « Down-Regulation of Endothelial EphrinB2 Expression by Laminar Shear Stress ». *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research* 11 (5-6): 259-65. <https://doi.org/10.1080/10623320490904151>.
- Goetz, Jacky G., Emily Steed, Rita R. Ferreira, Stéphane Roth, Caroline Ramspacher, Francesco Boselli, Gilles Charvin, et al. 2014. « Endothelial Cilia Mediate Low Flow Sensing during Zebrafish Vascular Development ». *Cell Reports* 6 (5): 799-808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.032>.
- Goldfinger, Lawrence E., Eleni Tzima, Rebecca Stockton, William B. Kiosses, Kayoko Kinbara, Eugene Tkachenko, Edgar Gutierrez, et al. 2008. « Localized Alpha4 Integrin Phosphorylation Directs Shear Stress-Induced Endothelial Cell Alignment ». *Circulation Research* 103 (2): 177-85. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176354>.
- Goldin, A L, T Snutch, H Lübbert, A Dowsett, J Marshall, V Auld, W Downey, L C Fritz, H A Lester, et R Dunn. 1986. « Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in Xenopus oocytes. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (19): 7503-7.
- Gong, Yanping, Jing Yang, Wenshuang Wu, Feng Liu, Anping Su, Zhihui Li, Jingqiang Zhu, et Tao Wei. 2018. « Preserved SCN4B Expression Is an Independent Indicator of Favorable Recurrence-Free Survival in Classical Papillary Thyroid Cancer ». *PLOS ONE* 13 (5): e0197007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197007>.
- Gordienko, D. V., et H. Tsukahara. 1994. « Tetrodotoxin-Blockable Depolarization-Activated Na⁺ Currents in a Cultured Endothelial Cell Line Derived from Rat Interlobar Arter and Human Umbilical Vein ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 428 (1): 91-93. <https://doi.org/10.1007/BF00374756>.

- Gordon, Emma, Lilian Schimmel, et Maike Frye. 2020. « The Importance of Mechanical Forces for in vitro Endothelial Cell Biology ». *Frontiers in Physiology* 11 (juin): 684. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00684>.
- Gosling, M., S. L. Harley, R. J. Turner, N. Carey, et J. T. Powell. 1998. « Human Saphenous Vein Endothelial Cells Express a Tetrodotoxin-Resistant, Voltage-Gated Sodium Current ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (33): 21084-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.21084>.
- Gracia-Sancho, Jorge, Guadalupe Villarreal, Yuzhi Zhang, et Guillermo García-Cardena. 2010. « Activation of SIRT1 by Resveratrol Induces KLF2 Expression Conferring an Endothelial Vasoprotective Phenotype ». *Cardiovascular Research* 85 (3): 514-19. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp337>.
- Grgic, Ivica, Brajesh P Kaistha, Joachim Hoyer, et Ralf Köhler. 2009. « Endothelial Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in Normal and Impaired EDHF-Dilator Responses – Relevance to Cardiovascular Pathologies and Drug Discovery ». *British Journal of Pharmacology* 157 (4): 509-26. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00132.x>.
- Grieco, Tina M., Jyoti D. Malhotra, Chunling Chen, Lori L. Isom, et Indira M. Raman. 2005. « Open-Channel Block by the Cytoplasmic Tail of Sodium Channel B4 as a Mechanism for Resurgent Sodium Current ». *Neuron* 45 (2): 233-44. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.035>.
- Grundmann, Sebastian, Stephan H Schirmer, Liesbeth H P Hekking, Jan Andries Post, Mihaela G Ionita, Daphne de Groot, Niels van Royen, et al. 2009. « Endothelial glycocalyx dimensions are reduced in growing collateral arteries and modulate leucocyte adhesion in arteriogenesis ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (9b): 3463-74. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00735.x>.
- Gullingsrud, Justin, et Klaus Schulten. 2004. « Lipid Bilayer Pressure Profiles and Mechanosensitive Channel Gating ». *Biophysical Journal* 86 (6): 3496-3509. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.034322>.
- Guo, Fengxia, Xiaohong Li, Juan Peng, Yaling Tang, Qin Yang, Lushan Liu, Zuo Wang, et al. 2014. « Autophagy Regulates Vascular Endothelial Cell ENOS and ET-1 Expression Induced by Laminar Shear Stress in an Ex Vivo Perfused System ». *Annals of Biomedical Engineering* 42 (9): 1978-88. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1033-5>.
- Guzman, Raul J, Keith Abe, et Christopher K Zarins. 1997. « Flow-Induced Arterial Enlargement Is Inhibited by Suppression of Nitric Oxide Synthase Activity in Vivo ». *Surgery* 122 (2): 273-80. [https://doi.org/10.1016/S0039-6060\(97\)90018-0](https://doi.org/10.1016/S0039-6060(97)90018-0).
- Hahn, Cornelia, Chong Wang, A. Wayne Orr, Brian G. Coon, et Martin Alexander Schwartz. 2011. « JNK2 Promotes Endothelial Cell Alignment under Flow ». *PloS One* 6 (8): e24338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024338>.
- Hajra, L., A. I. Evans, M. Chen, S. J. Hyduk, T. Collins, et M. I. Cybulsky. 2000. « The NF-Kappa B Signal Transduction Pathway in Aortic Endothelial Cells Is Primed for Activation in Regions Predisposed to Atherosclerotic Lesion Formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (16): 9052-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.9052>.
- Hakim, P., N. Brice, R. Thresher, J. Lawrence, Y. Zhang, A. P. Jackson, A. A. Grace, et C. L.-H. Huang. 2010. « Scn3b Knockout Mice Exhibit Abnormal Sino-Atrial and Cardiac Conduction Properties ». *Acta Physiologica (Oxford, England)* 198 (1): 47-59. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.02048.x>.
- Han, Zhonglin, Yu Jiang, Yuqing Yang, Xuehan Li, Zhongzhou Yang, Kejiang Cao, et Dao W. Wang. 2015. « Deletion of PDK1 Causes Cardiac Sodium Current Reduction in Mice ». Édité par Zhe Zhang. *PLOS ONE* 10 (3): e0122436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122436>.
- Harrison, David, Kathy K. Griendling, Ulf Landmesser, Burkhard Hornig, et Helmut Drexler. 2003. « Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis ». *The American Journal of Cardiology* 91 (3A): 7A-11A. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(02\)03144-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(02)03144-2).
- Hartmannsgruber, Veronika, Willm-Thomas Heyken, Michael Kacik, Anuradha Kaistha, Ivica Grgic, Christian Harteneck, Wolfgang Liedtke, Joachim Hoyer, et Ralf Köhler. 2007. « Arterial Response to Shear Stress Critically Depends on Endothelial TRPV4 Expression ». *PloS One* 2 (9): e827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000827>.
- Hartshorne, R. P., et W. A. Catterall. 1984. « The Sodium Channel from Rat Brain. Purification and Subunit Composition ». *The Journal of Biological Chemistry* 259 (3): 1667-75.
- Haworth, Alexander S., et William J. Brackenbury. 2019. « Emerging Roles for Multifunctional Ion Channel Auxiliary Subunits in Cancer ». *Cell Calcium* 80 (juin): 125-40. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.04.005>.
- Haworth, Alexander S., Samantha L. Hodges, Alina L. Capatina, Lori L. Isom, Christoph G. Baumann, et William J. Brackenbury. 2022. « Subcellular Dynamics and Functional Activity of the Cleaved Intracellular Domain of the Na⁺ Channel B1 Subunit ». *The Journal of Biological Chemistry* 298 (8): 102174. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102174>.

- Hayakawa, Kimihide, Hitoshi Tatsumi, et Masahiro Sokabe. 2008. « Actin Stress Fibers Transmit and Focus Force to Activate Mechanosensitive Channels ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 4): 496-503. <https://doi.org/10.1242/jcs.022053>.
- Hayes, John D., et Albena T. Dinkova-Kostova. 2014. « The Nrf2 Regulatory Network Provides an Interface between Redox and Intermediary Metabolism ». *Trends in Biochemical Sciences* 39 (4): 199-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>.
- Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stühmer, K. Imoto, et S. Numa. 1992. « Calcium Channel Characteristics Conferred on the Sodium Channel by Single Mutations ». *Nature* 356 (6368): 441-43. <https://doi.org/10.1038/356441a0>.
- Helander, Herbert F, et Lars Fändriks. 2014. « Surface area of the digestive tract – revisited ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49 (6): 681-89. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>.
- Hermann, C., A. M. Zeiher, et S. Dimmeler. 1997. « Shear Stress Inhibits H₂O₂-Induced Apoptosis of Human Endothelial Cells by Modulation of the Glutathione Redox Cycle and Nitric Oxide Synthase ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (12): 3588-92. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.12.3588>.
- Hermkens, Dorien, Olga Stam, Nienke de Wit, Ruud Fontijn, Aldo Jongejan, Perry Moerland, Claire Mackaaij, Ingeborg Waas, Mat Daemen, et Helga Vries. 2019. « Profiling the unique protective properties of intracranial arterial endothelial cells ». *Acta Neuropathologica Communications* 7 (octobre): 151. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0805-4>.
- Herrera, Marcela, et Jeffrey L. Garvin. 2007. « Novel Role of AQP-1 in NO-Dependent Vasorelaxation ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 292 (5): F1443-1451. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00353.2006>.
- Herrera, Marcela, Nancy J. Hong, et Jeffrey L. Garvin. 2006. « Aquaporin-1 Transports NO across Cell Membranes ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 48 (1): 157-64. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000223652.29338.77>.
- Hide, Michihiro, Hiroyuki Fukui, Takehiko Watanabe, Hiroshi Wada, et Shoso Yamamoto. 1988. « Histamine H₁-Receptor in Endothelial and Smooth Muscle Cells of Guinea-Pig Aorta ». *European Journal of Pharmacology* 148 (2): 161-69. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90560-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90560-2).
- Hierck, Beerend P., Kim Van der Heiden, Fanneke E. Alkemade, Simone Van de Pas, Johannes V. Van Thienen, Bianca C. W. Groenendijk, Wilhelmina H. Bax, et al. 2008. « Primary Cilia Sensitize Endothelial Cells for Fluid Shear Stress ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237 (3): 725-35. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21472>.
- Ho, W.-S. Vanessa, Alison J. Davis, Preet S. Chadha, et Iain A. Greenwood. 2013. « Effective Contractile Response to Voltage-Gated Na⁺ Channels Revealed by a Channel Activator ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 304 (8): C739-747. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00164.2012>.
- Hodgkin, A. L., et A. F. Huxley. 1952. « A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve ». *The Journal of Physiology* 117 (4): 500-544.
- Hoger, Jeff H., Victor I. Ilyin, Scott Forsyth, et Anne Hoger. 2002. « Shear Stress Regulates the Endothelial Kir2.1 Ion Channel ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11): 7780-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.102184999>.
- Holst, Anders G., Siamak Saber, Massoud Houshmand, Elena V. Zaklyazminskaya, Yinman Wang, Henrik Kjærulff Jensen, Lena Refsgaard, et al. 2012. « Sodium Current and Potassium Transient Outward Current Genes in Brugada Syndrome: Screening and Bioinformatics ». *The Canadian Journal of Cardiology* 28 (2): 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2011.11.011>.
- House, Carrie D., Charles J. Vaske, Arnold M. Schwartz, Vincent Obias, Bryan Frank, Truong Luu, Narine Sarvazyan, et al. 2010. « Voltage-Gated Na⁺ Channel SCN5A Is a Key Regulator of a Gene Transcriptional Network That Controls Colon Cancer Invasion ». *Cancer Research* 70 (17): 6957-67. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1169>.
- Hu, Dan, Hector Barajas-Martinez, Elena Burashnikov, Michael Springer, Yuesheng Wu, Andras Varro, Ryan Pfeiffer, et al. 2009. « A Mutation in the Beta 3 Subunit of the Cardiac Sodium Channel Associated with Brugada ECG Phenotype ». *Circulation. Cardiovascular Genetics* 2 (3): 270-78. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.829192>.
- Hu, Dan, Hector Barajas-Martínez, Argelia Medeiros-Domingo, Lia Crotti, Christian Veltmann, Rainer Schimpf, Janire Urrutia, et al. 2012. « A Novel Rare Variant in SCN1Bb Linked to Brugada Syndrome and SIDS by Combined Modulation of Na(v)1.5 and K(v)4.3 Channel Currents ». *Heart Rhythm* 9 (5): 760-69. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.12.006>.
- Hu, Y. L., et S. Chien. 1997. « Effects of Shear Stress on Protein Kinase C Distribution in Endothelial Cells ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 45 (2): 237-49. <https://doi.org/10.1177/002215549704500209>.

- Hu, Yong. 2022. « Flow-Mediated Vasodilation through Mechanosensitive G Protein-Coupled Receptors in Endothelial Cells ». *Trends in Cardiovascular Medicine*.
- Huangfu, Danwei, Aimin Liu, Andrew S. Rakeman, Noel S. Murcia, Lee Niswander, et Kathryn V. Anderson. 2003. « Hedgehog Signalling in the Mouse Requires Intraflagellar Transport Proteins ». *Nature* 426 (6962): 83-87. <https://doi.org/10.1038/nature02061>.
- Huddleson, Justin P., Seetha Srinivasan, Nisar Ahmad, et Jerry B. Lingrel. 2004. « Fluid Shear Stress Induces Endothelial KLF2 Gene Expression through a Defined Promoter Region » 385 (8): 723-29. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.088>.
- Humphries, M. J. 2000. « Integrin Structure ». *Biochemical Society Transactions* 28 (4): 311-39.
- Hussain, I., D.J. Powell, D.R. Howlett, G.A. Chapman, L. Gilmour, P.R. Murdock, D.G. Tew, et al. 2000. « ASP1 (BACE2) Cleaves the Amyloid Precursor Protein at the β -Secretase Site ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 16 (5): 609-19. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0884>.
- Hwang, Juliana, Michael H. Ing, Adler Salazar, Bernard Lassègue, Kathy Griendling, Mohamad Navab, Alex Sevanian, et Tzung K. Hsiai. 2003. « Pulsatile versus Oscillatory Shear Stress Regulates NADPH Oxidase Subunit Expression: Implication for Native LDL Oxidation ». *Circulation Research* 93 (12): 1225-32. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000104087.29395.66>.
- Iomini, Carlo, Karla Tejada, Wenjun Mo, Heikki Vaananen, et Gianni Piperno. 2004. « Primary Cilia of Human Endothelial Cells Disassemble under Laminar Shear Stress ».
- Ishikawa, Taisuke, Naohiko Takahashi, Seiko Ohno, Harumizu Sakurada, Kazufumi Nakamura, Young Keun On, Jeong Euy Park, et al. 2013. « Novel SCN3B Mutation Associated with Brugada Syndrome Affects Intracellular Trafficking and Function of Nav1.5 ». *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 77 (4): 959-67. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-12-0995>.
- Isom, L. L. 2001. « Sodium Channel Beta Subunits: Anything but Auxiliary ». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 7 (1): 42-54. <https://doi.org/10.1177/107385840100700108>.
- Isom, L. L., et W. A. Catterall. 1996. « Na⁺ Channel Subunits and Ig Domains ». *Nature* 383 (6598). <https://doi.org/10.1038/383307b0>.
- Isom, L. L., K. S. De Jongh, et W. A. Catterall. 1994. « Auxiliary Subunits of Voltage-Gated Ion Channels ». *Neuron* 12 (6): 1183-94. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90436-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90436-7).
- Isom, L. L., K. S. De Jongh, D. E. Patton, B. F. X. Reber, J. Offord, H. Charbonneau, K. Walsh, A. L. Goldin, et W. A. Catterall. 1992. « Primary Structure and Functional Expression of the β 1 Subunit of the Rat Brain Sodium Channel ». *Science* 256 (5058): 839-42. <https://doi.org/10.1126/science.256.5058.839>.
- Isom, L. L., D. S. Ragsdale, K. S. De Jongh, R. E. Westenbroek, B. F. X. Reber, T. Scheuer, et W. A. Catterall. 1995. « Structure and Function of the B2 Subunit of Brain Sodium Channels, a Transmembrane Glycoprotein with a CAM Motif ». *Cell* 83 (3): 433-42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90121-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90121-3).
- Isom, Lori L. 2002. « The role of sodium channels in cell adhesion ». *Frontiers in Bioscience-Landmark* 7 (4): 12-23. <https://doi.org/10.2741/isom>.
- Jalali, Shila, et Shu Chien. 2001. « Integrin-Mediated Mechanotransduction Requires Its Dynamic Interaction with Specific Extracellular Matrix (ECM) Ligands ». *CELL BIOLOGY*.
- Janoštiak, Radoslav, Andreea Csilla Pataki, Jan Brábek, et Daniel Rösel. 2014. « Mechanosensors in Integrin Signaling: The Emerging Role of P130Cas ». *European Journal of Cell Biology* 93 (10-12): 445-54. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.002>.
- Jansson, Keith H., Deborah G. Castillo, Joseph W. Morris, Mary E. Boggs, Kirk J. Czymmek, Elizabeth L. Adams, Lawrence P. Schramm, et Robert A. Sikes. 2014. « Identification of Beta-2 as a Key Cell Adhesion Molecule in PCa Cell Neurotropic Behavior: A Novel Ex Vivo and Biophysical Approach ». *PLOS ONE* 9 (6): e98408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098408>.
- Jansson, Keith H., Jill E. Lynch, Nadia Lepori-Bui, Kirk J. Czymmek, Randall L. Duncan, et Robert A. Sikes. 2012. « Overexpression of the VSSC-Associated CAM, Beta-2, Enhances LNCaP Cell Metastasis Associated Behavior ». *The Prostate* 72 (10): 1080-92. <https://doi.org/10.1002/pros.21512>.
- Jebari-Benslaïman, Shifa, Unai Galicia-García, Asier Larrea-Sebal, Javier Rekondo Olaetxea, Iraide Alloza, Koen Vandenbroeck, Asier Benito-Vicente, et César Martín. 2022. « Pathophysiology of Atherosclerosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (6): 3346. <https://doi.org/10.3390/ijms23063346>.
- Jiang, Longguang, Lin Lin, Rui Li, Cai Yuan, Mingming Xu, Joy H. Huang, et Mingdong Huang. 2016. « Dimer Conformation of Soluble PECAM-1, an Endothelial Marker ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 77 (Pt A): 102-8. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.06.001>.
- Jiang, Yi-Zhou, Juan M. Jiménez, Kristy Ou, Margaret E. McCormick, Ling-Di Zhang, et Peter F. Davies. 2014. « Hemodynamic Disturbed Flow Induces Differential DNA Methylation of Endothelial Kruppel-Like Factor 4 Promoter in Vitro and in Vivo ». *Circulation Research* 115 (1): 32-43. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303883>.

- Jin, Xin, Masako Mitsumata, Tetsu Yamane, et Yoji Yoshida. 2002. « Induction of Human Inhibitor of Apoptosis Protein-2 by Shear Stress in Endothelial Cells ». *FEBS Letters* 529 (2-3): 286-92. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03361-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03361-6).
- Jin, Zheng-Gen, Hiroto Ueba, Tatsuo Tanimoto, Andreea O. Lungu, Mary D. Frame, et Bradford C. Berk. 2003. « Ligand-Independent Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 by Fluid Shear Stress Regulates Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase ». *Circulation Research* 93 (4): 354-63. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000089257.94002.96>.
- Jo, H., R. O. Dull, T. M. Hollis, et J. M. Tarbell. 1991. « Endothelial Albumin Permeability Is Shear Dependent, Time Dependent, and Reversible ». *The American Journal of Physiology* 260 (6 Pt 2): H1992-1996. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.260.6.H1992>.
- Johnson, Daniel, et Eric S. Bennett. 2006. « Isoform-Specific Effects of the Beta2 Subunit on Voltage-Gated Sodium Channel Gating ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (36): 25875-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605060200>.
- Johnson, Daniel, Marty L. Montpetit, Patrick J. Stocker, et Eric S. Bennett. 2004. « The Sialic Acid Component of the B1 Subunit Modulates Voltage-Gated Sodium Channel Function ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (43): 44303-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408900200>.
- Jung, Bongnam, Hideru Obinata, Sylvain Galvani, Karen Mendelson, Bi-sen Ding, Athanasia Skoura, Bernd Kinzel, et al. 2012. « Flow-Regulated Endothelial S1P Receptor-1 Signaling Sustains Vascular Development ». *Developmental Cell* 23 (3): 600-610. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.07.015>.
- Kaczmarek, Leonard K. 2006. « Non-Conducting Functions of Voltage-Gated Ion Channels ». *Nature Reviews Neuroscience* 7 (10): 761-71. <https://doi.org/10.1038/nrn1988>.
- Kallakuri, Sowjanya, Jianxin A Yu, Jade Li, Yuanyuan Li, Brant M Weinstein, Stefania Nicoli, et Zhaoxia Sun. 2015. « Endothelial Cilia Are Essential for Developmental Vascular Integrity in Zebrafish ». *J Am Soc Nephrol*.
- Karakas, Mehmet Fatih, Eyup Buyukkaya, Mustafa Kurt, Sedat Motor, Adnan Burak Akcay, Esra Karakas, Şule Buyukkaya, et Nihat Sen. 2013. « Serum Pentraxin-3 Levels Are Associated with the Severity of Metabolic Syndrome ». *Medical Principles and Practice* 22 (3): 274-79. <https://doi.org/10.1159/000343904>.
- Kaufmann, Susann G., Ruth E. Westenbroek, Alexander H. Maass, Volkmar Lange, Andre Renner, Erhard Wischmeyer, Andreas Bonz, et al. 2013. « Distribution and Function of Sodium Channel Subtypes in Human Atrial Myocardium ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 61 (août): 133-41. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.05.006>.
- Kawasaki, Yasushi, Eriko Yokobayashi, Kentaro Sakamoto, Eri Tenma, Haruka Takaki, Yuki Chiba, Tomomi Otashiro, et al. 2015. « Angiostatin Prevents IL-1 β -Induced down-Regulation of ENOS Expression by Inhibiting the NF-KB Cascade ». *Journal of Pharmacological Sciences* 129 (3): 200-204. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.10.001>.
- Kazarinova-Noyes, Katie, Jyoti Dhar Malhotra, Dyke P. McEwen, Laura N. Mattei, Erik O. Berglund, Barbara Ranscht, S. Rock Levinson, et al. 2001. « Contactin Associates with Na⁺ Channels and Increases Their Functional Expression ». *The Journal of Neuroscience* 21 (19): 7517-25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07517.2001>.
- Kazen-Gillespie, Kristin A., David S. Ragsdale, Michael R. D'Andrea, Laura N. Mattei, Kathryn E. Rogers, et Lori L. Isom. 2000. « Cloning, Localization, and Functional Expression of Sodium Channel B1A Subunits* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (2): 1079-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1079>.
- Kim, Doo Yeon, Bryce W. Carey, Haibin Wang, Laura A. M. Ingano, Alexander M. Binshtok, Mary H. Wertz, Warren H. Pettingell, et al. 2007. « BACE1 Regulates Voltage-Gated Sodium Channels and Neuronal Activity ». *Nature Cell Biology* 9 (7): 755-64. <https://doi.org/10.1038/ncb1602>.
- Kim, Doo Yeon, Laura A. Mackenzie Ingano, Bryce W. Carey, Warren H. Pettingell, et Dora M. Kovacs. 2005. « Presenilin/Gamma-Secretase-Mediated Cleavage of the Voltage-Gated Sodium Channel Beta2-Subunit Regulates Cell Adhesion and Migration ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (24): 23251-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412938200>.
- Kim, Doo Yeon, Mary H. Wertz, Vivek Gautam, Carla D'Avanzo, Raja Bhattacharyya, et Dora M. Kovacs. 2014. « The E280A Presenilin Mutation Reduces Voltage-Gated Sodium Channel Levels in Neuronal Cells ». *Neuro-Degenerative Diseases* 13 (2-3): 64-68. <https://doi.org/10.1159/000354669>.
- Kis-Toth, Katalin, Peter Hajdu, Ildiko Bacskai, Orsolya Szilagyi, Ferenc Papp, Attila Szanto, Edit Posta, Peter Gogolak, Gyorgy Panyi, et Eva Rajnavolgyi. 2011. « Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 Maintains the Membrane Potential and Regulates the Activation and Chemokine-Induced Migration of a Monocyte-Derived Dendritic Cell Subset ». *The Journal of Immunology* 187 (3): 1273-80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003345>.
- Klionsky, Daniel J., Amal Kamal Abdel-Aziz, Sara Abdelfatah, Mahmoud Abdellatif, Asghar Abdoli, Steffen Abel, Hagai Abeliovich, et al. 2021. « Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring

- Autophagy (4th Edition) ¹ ». *Autophagy* 17 (1): 1-382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>.
- Kobayashi, Eri H., Takafumi Suzuki, Ryo Funayama, Takeshi Nagashima, Makiko Hayashi, Hiroki Sekine, Nobuyuki Tanaka, et al. 2016. « Nrf2 Suppresses Macrophage Inflammatory Response by Blocking Proinflammatory Cytokine Transcription ». *Nature Communications* 7 (mai): 11624. <https://doi.org/10.1038/ncomms11624>.
- Köhler, Ralf, Willm-Thomas Heyken, Philipp Heinau, Rudolf Schubert, Han Si, Michael Kacik, Christoph Busch, Ivica Grgic, Tanja Maier, et Joachim Hoyer. 2006. « Evidence for a Functional Role of Endothelial Transient Receptor Potential V4 in Shear Stress-Induced Vasodilatation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (7): 1495-1502. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000225698.36212.6a>.
- Kono, Mari, et Richard L. Proia. 2015. « Imaging S1P1 Activation in Vivo ». *Experimental Cell Research, Invited Reviews: Lysophospholipids in Biology*, 333 (2): 178-82. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.11.023>.
- Korff, Thomas, Jennifer Braun, Dennis Pfaff, Hellmut G. Augustin, et Markus Hecker. 2008. « Role of EphrinB2 Expression in Endothelial Cells during Arteriogenesis: Impact on Smooth Muscle Cell Migration and Monocyte Recruitment ». *Blood* 112 (1): 73-81. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-128835>.
- Körner, Jannis, Jannis Meents, Jan-Philipp Machtens, et Angelika Lampert. 2018. « B1 Subunit Stabilises Sodium Channel Nav1.7 against Mechanical Stress ». *The Journal of Physiology* 596 (12): 2433-45. <https://doi.org/10.1113/JP275905>.
- Krause, Matthew D., Ru-Ting Huang, David Wu, Tzu-Pin Shentu, Devin L. Harrison, Michael B. Whalen, Lindsey K. Stolze, et al. 2018. « Genetic variant at coronary artery disease and ischemic stroke locus 1p32.2 regulates endothelial responses to hemodynamics ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (48): E11349-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810568115>.
- Krautter, Franziska, Mohammed T. Hussain, Zhaogong Zhi, Danielle R. Lezama, Julia E. Manning, Emily Brown, Noemi Marigliano, et al. 2022. « Galectin-9: A Novel Promoter of Atherosclerosis Progression ». *Atherosclerosis* 363 (décembre): 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.11.014>.
- Kruger, Larisa C., et Lori L. Isom. 2016. « Voltage-Gated Na⁺ Channels: Not Just for Conduction ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (6): a029264. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029264>.
- Kuo, L., M. J. Davis, et W. M. Chilian. 1990. « Endothelium-Dependent, Flow-Induced Dilation of Isolated Coronary Arterioles ». *The American Journal of Physiology* 259 (4 Pt 2): H1063-1070. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.4.H1063>.
- Kwak, Young-Don, Ruishan Wang, Jing Jing Li, Yun-Wu Zhang, Huaxi Xu, et Francesca-Fang Liao. 2011. « Differential Regulation of BACE1 Expression by Oxidative and Nitrosative Signals ». *Molecular Neurodegeneration* 6 (mars): 17. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-17>.
- Laedermann, Cedric, Ninda Syam, Isabelle Decosterd, et Hugues Abriel. 2013. « β 1- and β 3- voltage-gated sodium channel subunits modulate cell surface expression and glycosylation of Nav1.7 in HEK293 cells ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2013.00137>.
- LaRocca, Thomas J., Grant D. Henson, Andrew Thorburn, Amy L. Sindler, Gary L. Pierce, et Douglas R. Seals. 2012. « Translational Evidence That Impaired Autophagy Contributes to Arterial Ageing ». *The Journal of Physiology* 590 (14): 3305-16. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.229690>.
- Laughlin, M. Harold, Michael J. Davis, Niels H. Secher, Johannes J. van Lieshout, Arturo A. Arce-Esquivel, Grant H. Simmons, Shawn B. Bender, et al. 2012. « Peripheral Circulation ». *Comprehensive Physiology* 2 (1): 321-447. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100048>.
- Le, Nhat-Tu, Uday G. Sandhu, Raymundo A. Quintana-Quezada, Nguyet Minh Hoang, Keigi Fujiwara, et Jun-ichi Abe. 2017. « Flow Signaling and Atherosclerosis ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (10): 1835-58. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2442-4>.
- Leeb-Lundberg, L. M. Fredrik, Francois Marceau, Werner Müller-Esterl, Douglas J. Pettibone, et Bruce L. Zuraw. 2005. « International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: From Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences ». *Pharmacological Reviews* 57 (1): 27-77. <https://doi.org/10.1124/pr.57.1.2>.
- Lenkowski, Paul W, Bhaval S Shah, Andrew E Dinn, Kevin Lee, et Manoj K Patel. 2003. « Lidocaine Block of Neonatal Nav1.3 Is Differentially Modulated by Co-Expression of B1 and B3 Subunits ». *European Journal of Pharmacology* 467 (1): 23-30. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01595-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01595-4).
- Lera Ruiz, Manuel de, et Richard L. Kraus. 2015. « Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications ». *Journal of Medicinal Chemistry* 58 (18): 7093-7118. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>.
- Lertkietmongkol, Panida, Danying Liao, Heng Mei, Yu Hu, et Peter J. Newman. 2016. « Endothelial Functions of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) ». *Current Opinion in Hematology* 23 (3): 253-259. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000239>.

- Levesque, M. J., R. M. Nerem, et E. A. Sprague. 1990. « Vascular Endothelial Cell Proliferation in Culture and the Influence of Flow ». *Biomaterials* 11 (9): 702-7. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(90\)90031-k](https://doi.org/10.1016/0142-9612(90)90031-k).
- Li, Bochuan, Jinlong He, Huizhen Lv, Yajin Liu, Xue Lv, Chenghu Zhang, Yi Zhu, et Ding Ai. 2019. « C-Abl Regulates YAP357 Phosphorylation to Activate Endothelial Atherogenic Responses to Disturbed Flow ». *The Journal of Clinical Investigation* 129 (3): 1167-79. <https://doi.org/10.1172/JCI122440>.
- Li Fraine, Steven, Amanda Patel, Fabrice Duprat, et Reza Sharif-Naeini. 2017. « Dynamic Regulation of TREK1 Gating by Polycystin 2 via a Filamin A-Mediated Cytoskeletal Mechanism ». *Scientific Reports* 7 (1): 17403. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16540-w>.
- Li, Huige, Ning Xia, Solveig Hasselwander, et Andreas Daiber. 2019. « Resveratrol and Vascular Function ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (9): 2155. <https://doi.org/10.3390/ijms20092155>.
- Li, Jing, Bing Hou, Sarka Tumova, Katsuhiko Muraki, Alexander Bruns, Melanie J. Ludlow, Alicia Sedo, et al. 2014. « Piezo1 Integration of Vascular Architecture with Physiological Force ». *Nature* 515 (7526): 279-82. <https://doi.org/10.1038/nature13701>.
- Li, Ruo-Gu, Qian Wang, Ying-Jia Xu, Min Zhang, Xin-Kai Qu, Xu Liu, Wei-Yi Fang, et Yi-Qing Yang. 2013. « Mutations of the SCN4B-Encoded Sodium Channel B4 Subunit in Familial Atrial Fibrillation ». *International Journal of Molecular Medicine* 32 (1): 144-50. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1355>.
- Li, S., B. P. Chen, N. Azuma, Y. L. Hu, S. Z. Wu, B. E. Sumpio, J. Y. Shyy, et S. Chien. 1999. « Distinct Roles for the Small GTPases Cdc42 and Rho in Endothelial Responses to Shear Stress ». *The Journal of Clinical Investigation* 103 (8): 1141-50. <https://doi.org/10.1172/JCI5367>.
- Li, Song, Peter Butler, Yingxiao Wang, Yingli Hu, Dong Cho Han, Shunichi Usami, Jun-Lin Guan, et Shu Chien. 2002. « The Role of the Dynamics of Focal Adhesion Kinase in the Mechanotaxis of Endothelial Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (6): 3546-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.052018099>.
- Li, Wen-wen, Jian Li, et Jin-ku Bao. 2012. « Microautophagy: Lesser-Known Self-Eating ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (7): 1125-36. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>.
- Li, Xueyi, Daniel S. Weintraub, et David J.R. Fulton. 2017. « Beyond impressions: How altered shear stress connects hypoxic signaling to endothelial inflammation ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37 (11): 1987-89. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310149>.
- Lin, K., P. P. Hsu, B. P. Chen, S. Yuan, S. Usami, J. Y. Shyy, Y. S. Li, et S. Chien. 2000. « Molecular Mechanism of Endothelial Growth Arrest by Laminar Shear Stress ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17): 9385-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.170282597>.
- Liu, J., X. Bi, T. Chen, Q. Zhang, S.-X. Wang, J.-J. Chiu, G.-S. Liu, Y. Zhang, P. Bu, et F. Jiang. 2015. « Shear Stress Regulates Endothelial Cell Autophagy via Redox Regulation and Sirt1 Expression ». *Cell Death & Disease* 6 (7): e1827. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.193>.
- Liu, Yanping, Aaron H. Bubolz, Yang Shi, Peter J. Newman, Debra K. Newman, et David D. Gutterman. 2006. « Peroxynitrite Reduces the Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Component of Coronary Flow-Mediated Dilation in PECAM-1-Knockout Mice ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290 (1): R57-65. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00424.2005>.
- Lo, Albert C., Joel A. Black, et Stephen G. Waxman. 2002. « Neuroprotection of Axons with Phenytoin in Experimental Allergic Encephalomyelitis ». *Neuroreport* 13 (15): 1909-12. <https://doi.org/10.1097/00001756-200210280-00015>.
- Lo, Albert C., Carl Y. Saab, Joel A. Black, et Stephen G. Waxman. 2003. « Phenytoin Protects Spinal Cord Axons and Preserves Axonal Conduction and Neurological Function in a Model of Neuroinflammation in Vivo ». *Journal of Neurophysiology* 90 (5): 3566-71. <https://doi.org/10.1152/jn.00434.2003>.
- Lopez-Charcas, Osbaldo, Ana Maria Espinosa, Ana Alfaro, Zazil Herrera-Carrillo, Belen Ernestina Ramirez-Cordero, Pedro Cortes-Reynosa, Eduardo Perez Salazar, Jaime Berumen, et Juan Carlos Gomora. 2018. « The Invasiveness of Human Cervical Cancer Associated to the Function of NaV1.6 Channels Is Mediated by MMP-2 Activity ». *Scientific Reports* 8 (1): 12995. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31364-y>.
- Lopez-Charcas, Osbaldo, Piyasuda Pukkanasut, Sadanandan E. Velu, William J. Brackenbury, Tim G. Hales, Pierre Besson, Juan Carlos Gomora, et Sébastien Roger. 2021. « Pharmacological and Nutritional Targeting of Voltage-Gated Sodium Channels in the Treatment of Cancers ». *IScience* 24 (4): 102270. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102270>.
- Lopez-Santiago, Luis F., Laurence S. Meadows, Sara J. Ernst, Chunling Chen, Jyoti Dhar Malhotra, Dyke P. McEwen, Audrey Speelman, et al. 2007. « Sodium Channel Scn1b Null Mice Exhibit Prolonged QT and RR Intervals ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 43 (5): 636-47. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.07.062>.
- Maier, Sebastian K.G., Ruth E. Westenbroek, Kimberly A. McCormick, Rory Curtis, Todd Scheuer, et William A. Catterall. 2004. « Distinct Subcellular Localization of Different Sodium Channel α and β Subunits in Single

- Ventricular Myocytes From Mouse Heart ». *Circulation* 109 (11): 1421-27. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121421.61896.24>.
- Malek, A. M., S. L. Alper, et S. Izumo. 1999. « Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis ». *JAMA* 282 (21): 2035-42. <https://doi.org/10.1001/jama.282.21.2035>.
- Malek, A. M., et S. Izumo. 1996. « Mechanism of Endothelial Cell Shape Change and Cytoskeletal Remodeling in Response to Fluid Shear Stress ». *Journal of Cell Science* 109 (Pt 4) (avril): 713-26. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.4.713>.
- Malhotra, Jyoti D., Matthew C. Koopmann, Kristin A. Kazen-Gillespie, Nicholas Fettman, Michael Hortsch, et Lori L. Isom. 2002. « Structural Requirements for Interaction of Sodium Channel Beta 1 Subunits with Ankyrin ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 26681-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202354200>.
- Malhotra, Jyoti D., Veena Thyagarajan, Chunling Chen, et Lori L. Isom. 2004. « Tyrosine-Phosphorylated and Nonphosphorylated Sodium Channel B1 Subunits Are Differentially Localized in Cardiac Myocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (39): 40748-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407243200>.
- Malhotra, Jyoti Dhar, Kristin Kazen-Gillespie, Michael Hortsch, et Lori L. Isom. 2000. « Sodium Channel β Subunits Mediate Homophilic Cell Adhesion and Recruit Ankyrin to Points of Cell-Cell Contact* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (15): 11383-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11383>.
- Maniotis, A. J., C. S. Chen, et D. E. Ingber. 1997. « Demonstration of Mechanical Connections between Integrins, Cytoskeletal Filaments, and Nucleoplasm That Stabilize Nuclear Structure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (3): 849-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.849>.
- Mao, Wei, Tao You, Bo Ye, Xiang Li, Henry H. Dong, Joseph A. Hill, Faqian Li, et Haodong Xu. 2012. « Reactive Oxygen Species Suppress Cardiac Nav1.5 Expression through Foxo1 ». Édité par Rossella Rota. *PLoS ONE* 7 (2): e32738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032738>.
- Marionneau, Céline, Yarimar Carrasquillo, Aaron J. Norris, R. Reid Townsend, Lori L. Isom, Andrew J. Link, et Jeanne M. Nerbonne. 2012. « The Sodium Channel Accessory Subunit Nav β 1 Regulates Neuronal Excitability through Modulation of Repolarizing Voltage-Gated K⁺ Channels ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (17): 5716-27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6450-11.2012>.
- Marmon, Shana, Joseph Hinchey, Philmo Oh, Michael Cammer, Cecilia J. de Almeida, Leslie Gunther, Cedric S. Raine, et Michael P. Lisanti. 2009. « Caveolin-1 Expression Determines the Route of Neutrophil Extravasation through Skin Microvasculature ». *The American Journal of Pathology* 174 (2): 684-92. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080091>.
- Maroni, Michele, Jannis Körner, Jürgen Schüttler, Beate Winner, Angelika Lampert, et Esther Eberhardt. 2019. « B1 and B3 Subunits Amplify Mechanosensitivity of the Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 ». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 471 (11-12): 1481-92. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02324-w>.
- Masumura, Tomomi, Kimiko Yamamoto, Nobutaka Shimizu, Syotaro Obi, et Joji Ando. 2009. « Shear Stress Increases Expression of the Arterial Endothelial Marker EphrinB2 in Murine ES Cells via the VEGF-Notch Signaling Pathways ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (12): 2125-31. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.193185>.
- Mattei, César, et Christian Legros. 2014. « The Voltage-Gated Sodium Channel: A Major Target of Marine Neurotoxins ». *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 91 (décembre): 84-95. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.09.016>.
- Maurya, Mano R., Shakti Gupta, Julie Yi-Shuan Li, Nassim E. Ajami, Zhen B. Chen, John Y.-J. Shyy, Shu Chien, et Shankar Subramaniam. 2021. « Longitudinal Shear Stress Response in Human Endothelial Cells to Atheroprone and Atheroprotective Conditions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (4): e2023236118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023236118>.
- McCormick, Kimberly A., Lori L. Isom, David Ragsdale, David Smith, Todd Scheuer, et William A. Catterall. 1998. « Molecular Determinants of Na⁺ Channel Function in the Extracellular Domain of the B1 Subunit* ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (7): 3954-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3954>.
- McCormick, Margaret E., Caitlin Collins, Catherine A. Makarewich, Zhongming Chen, Mauricio Rojas, Monte S. Willis, Steven R. Houser, et Ellie Tzima. 2015. « Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Mediates Endothelial-Cardiomyocyte Communication and Regulates Cardiac Function ». *Journal of the American Heart Association* 4 (1): e001210. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001210>.
- McEwen, Dyke P., Chunling Chen, Laurence S. Meadows, Luis Lopez-Santiago, et Lori L. Isom. 2009. « The Voltage-Gated Na⁺ Channel Beta3 Subunit Does Not Mediate Trans Homophilic Cell Adhesion or Associate with the Cell Adhesion Molecule Contactin ». *Neuroscience Letters* 462 (3): 272-75. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.07.020>.

- McEwen, Dyke P., et Lori L. Isom. 2004. « Heterophilic Interactions of Sodium Channel B1 Subunits with Axonal and Glial Cell Adhesion Molecules* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (50): 52744-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405990200>.
- McSweeney, Shane R., Eiji Warabi, et Richard C.M. Siow. 2016. « Nrf2 as an Endothelial Mechanosensitive Transcription Factor: Going With the Flow ». *Hypertension* 67 (1): 20-29. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06146>.
- Meadows, Laurence, Jyoti Dhar Malhotra, Alisa Stetzer, Lori L. Isom, et David S. Ragsdale. 2001. « The Intracellular Segment of the Sodium Channel B1 Subunit Is Required for Its Efficient Association with the Channel α Subunit ». *Journal of Neurochemistry* 76 (6): 1871-78. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00192.x>.
- Medeiros-Domingo, Argelia, Toshihiko Kaku, David J. Tester, Pedro Iturralde-Torres, Ajit Itty, Bin Ye, Carmen Valdivia, et al. 2007. « SCN4B-Encoded Sodium Channel Beta4 Subunit in Congenital Long-QT Syndrome ». *Circulation* 116 (2): 134-42. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.659086>.
- Mendez, Paul-Lennard, Leon Obendorf, Jerome Jatzlau, Wiktor Burdzinski, Maria Reichenbach, Vanasa Nageswaran, Arash Haghighi, Verena Stangl, Christian Hiepen, et Petra Knaus. 2022. « Atheroprone fluid shear stress-regulated ALK1-Endoglin-SMAD signaling originates from early endosomes ». *BMC Biology* 20 (1): 210. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01396-y>.
- Mendoza, Suelhem A., Juan Fang, David D. Gutterman, David A. Wilcox, Aaron H. Bubolz, Rongshan Li, Makoto Suzuki, et David X. Zhang. 2010. « TRPV4-Mediated Endothelial Ca^{2+} Influx and Vasodilation in Response to Shear Stress ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 298 (2): H466-476. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00854.2009>.
- Meng, Qingyu, Luya Pu, Mingran Qi, Shuai Li, Banghao Sun, Yaru Wang, Bin Liu, et Fan Li. 2022. « Laminar Shear Stress Inhibits Inflammation by Activating Autophagy in Human Aortic Endothelial Cells through HMGB1 Nuclear Translocation ». *Communications Biology* 5 (1): 425. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03392-y>.
- Merrick, Ellen C., Christopher L. Kalmar, Sandy L. Snyder, Fiona S. Cusdin, Ester J. Yu, Julianne J. Sando, Brant E. Isakson, Antony P. Jackson, et Manoj K. Patel. 2010. « The Importance of Serine 161 in the Sodium Channel B3 Subunit for Modulation of $\text{NaV}1.2$ Gating ». *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 460 (4): 743-53. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0739-y>.
- Messner, D. J., et W. A. Catterall. 1985. « The Sodium Channel from Rat Brain. Separation and Characterization of Subunits ». *The Journal of Biological Chemistry* 260 (19): 10597-604.
- Miyazaki, Haruko, Fumitaka Oyama, Hon-Kit Wong, Kumi Kaneko, Takashi Sakurai, Akira Tamaoka, et Nobuyuki Nukina. 2007. « BACE1 Modulates Filopodia-like Protrusions Induced by Sodium Channel Beta4 Subunit ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361 (1): 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.170>.
- Mohan, S., N. Mohan, et E. A. Sprague. 1997. « Differential Activation of NF-Kappa B in Human Aortic Endothelial Cells Conditioned to Specific Flow Environments ». *The American Journal of Physiology* 273 (2 Pt 1): C572-578. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.2.C572>.
- Morel, Sandrine, Sabine Schilling, Mannekomba R. Diagbouga, Matteo Delucchi, Marie-Luce Bochaton-Piallat, Sylvain Lemeille, Sven Hirsch, et Brenda R. Kwak. 2021. « Effects of Low and High Aneurysmal Wall Shear Stress on Endothelial Cell Behavior: Differences and Similarities ». *Frontiers in Physiology* 12: 727338. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.727338>.
- Morello, Fulvio, Alessia Perino, et Emilio Hirsch. 2009. « Phosphoinositide 3-Kinase Signalling in the Vascular System ». *Cardiovascular Research* 82 (2): 261-71. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn325>.
- Morgan, Joshua T., Emily R. Pfeiffer, Twanda L. Thirkill, Priyadarsini Kumar, Gordon Peng, Heidi N. Fridolfsson, Gordon C. Douglas, Daniel A. Starr, et Abdul I. Barakat. 2011. « Nesprin-3 regulates endothelial cell morphology, perinuclear cytoskeletal architecture, and flow-induced polarization ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (22): 4324-34. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-04-0287>.
- Morgan, K., E. B. Stevens, B. Shah, P. J. Cox, A. K. Dixon, K. Lee, R. D. Pinnock, et al. 2000. « Beta 3: An Additional Auxiliary Subunit of the Voltage-Sensitive Sodium Channel That Modulates Channel Gating with Distinct Kinetics ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (5): 2308-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.030362197>.
- Morris, Catherine E., et Peter F. Juranka. 2007. « Nav Channel Mechanosensitivity: Activation and Inactivation Accelerate Reversibly with Stretch ». *Biophysical Journal* 93 (3): 822-33. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.101246>.
- Mount, Peter F., Bruce E. Kemp, et David A. Power. 2007. « Regulation of Endothelial and Myocardial NO Synthesis by Multi-Site eNOS Phosphorylation ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42 (2): 271-79. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.05.023>.

- Mulvany, M. J., G. L. Baumbach, C. Aalkjaer, A. M. Heagerty, N. Korsgaard, E. L. Schiffrin, et D. D. Heistad. 1996. « Vascular Remodeling ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 28 (3): 505-6.
- Mun, Gyeong In, Sue Im Jang, et Yong Chool Boo. 2013. « Laminar Shear Stress Induces the Expression of Aquaporin 1 in Endothelial Cells Involved in Wound Healing ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430 (2): 554-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.114>.
- Muramatsu, Fumitaka, Hiroyasu Kidoya, Hisamichi Naito, Yumiko Hayashi, Tomohiro Iba, et Nobuyuki Takakura. 2017. « Plakoglobin Maintains the Integrity of Vascular Endothelial Cell Junctions and Regulates VEGF-Induced Phosphorylation of VE-Cadherin ». *Journal of Biochemistry* 162 (1): 55-62. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx001>.
- Nakajima, Hiroyuki, et Naoki Mochizuki. 2017. « Flow Pattern-Dependent Endothelial Cell Responses through Transcriptional Regulation ». *Cell Cycle* 16 (20): 1893-1901. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1364324>.
- Namadurai, Sivakumar, Nikitha R. Yereddi, Fiona S. Cusdin, Christopher L. H. Huang, Dimitri Y. Chirgadze, et Antony P. Jackson. 2015. « A New Look at Sodium Channel β Subunits ». *Open Biology* 5 (1): 140192. <https://doi.org/10.1098/rsob.140192>.
- Natarajan, R., S. Gupta, B. J. Fisher, S. Ghosh, et A. A. Fowler. 2001. « Nitric Oxide Suppresses IL-8 Transcription by Inhibiting c-Jun N-Terminal Kinase-Induced AP-1 Activation ». *Experimental Cell Research* 266 (2): 203-12. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5218>.
- Nauli, Surya M, Yoshifumi Kawanabe, John J Kaminski, William J Pearce, Donald E Ingber, et Jing Zhou. 2008. « Endothelial Cilia Are Fluid Shear Sensors That Regulate Calcium Signaling and Nitric Oxide Production Through Polycystin-1 ». *Journal of Cellular Physiology* 195 (3): 428-34. <https://doi.org/10.1002/jcp.10259>.
- Nelson, Michaela, Rebecca Millican-Slater, Lorna C Forrest, et William J Brackenbury. 2014. « The sodium channel β 1 subunit mediates outgrowth of neurite-like processes on breast cancer cells and promotes tumour growth and metastasis ». *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer* 135 (10): 2338-51. <https://doi.org/10.1002/ijc.28890>.
- Newman, P. J., M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White, S. Lyman, C. Paddock, et W. A. Muller. 1990. « PECAM-1 (CD31) Cloning and Relation to Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Gene Superfamily ». *Science (New York, N.Y.)* 247 (4947): 1219-22. <https://doi.org/10.1126/science.1690453>.
- Ni, Chih-Wen, Danny L. Wang, Sheng-Chieh Lien, Jing-Jy Cheng, Yuen-Jen Chao, et Hsyue-Jen Hsieh. 2003. « Activation of PKC-Epsilon and ERK1/2 Participates in Shear-Induced Endothelial MCP-1 Expression That Is Repressed by Nitric Oxide ». *Journal of Cellular Physiology* 195 (3): 428-34. <https://doi.org/10.1002/jcp.10259>.
- Niu, Niu, Suowen Xu, Yanni Xu, Peter J. Little, et Zheng-Gen Jin. 2019. « Targeting Mechanosensitive Transcription Factors in Atherosclerosis ». *Trends in Pharmacological Sciences* 40 (4): 253-66. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.02.004>.
- Noda, M., H. Suzuki, S. Numa, et W. Stühmer. 1989. « A Single Point Mutation Confers Tetrodotoxin and Saxitoxin Insensitivity on the Sodium Channel II ». *FEBS Letters* 259 (1): 213-16. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81531-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81531-5).
- Noda, Masaharu, Takayuki Ikeda, Harukazu Suzuki, Hiroshi Takeshima, Tomoyuki Takahashi, Motoy Kuno, et Shosaku Numa. 1986. « Expression of Functional Sodium Channels from Cloned cDNA ». *Nature* 322 (6082): 826-28. <https://doi.org/10.1038/322826a0>.
- Noguchi, Noriko, et Hanjoong Jo. 2011. « Redox Going with Vascular Shear Stress ». *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (5): 1367-68. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4011>.
- Nollert, M. U., S. G. Eskin, et L. V. McIntire. 1990. « Shear Stress Increases Inositol Trisphosphate Levels in Human Endothelial Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 170 (1): 281-87. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)91271-s](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)91271-s).
- Nussenzweig, Samuel C., Subodh Verma, et Toren Finkel. 2015. « The Role of Autophagy in Vascular Biology ». *Circulation Research* 116 (3): 480-88. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303805>.
- Ogiwara, Ikuo, Tojo Nakayama, Tetsushi Yamagata, Hideyuki Ohtani, Emi Mazaki, Shigeru Tsuchiya, Yushi Inoue, et Kazuhiro Yamakawa. 2012. « A Homozygous Mutation of Voltage-Gated Sodium Channel β (I) Gene SCN1B in a Patient with Dravet Syndrome ». *Epilepsia* 53 (12): e200-203. <https://doi.org/10.1111/epi.12040>.
- Olesen, Morten S., Thomas Jespersen, Jonas B. Nielsen, Bo Liang, Daniel V. Møller, Paula Hedley, Michael Christiansen, et al. 2011. « Mutations in Sodium Channel β -Subunit SCN3B Are Associated with Early-Onset Lone Atrial Fibrillation ». *Cardiovascular Research* 89 (4): 786-93. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq348>.
- O'Malley, Heather A., et Lori L. Isom. 2015. « Sodium Channel β Subunits: Emerging Targets in Channelopathies ». *Annual Review of Physiology* 77: 481-504. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071846>.

- O'Malley, Heather A., Andrew B. Shreiner, Gwo-Hsiao Chen, Gary B. Huffnagle, et Lori L. Isom. 2009. « Loss of Na⁺ Channel Beta2 Subunits Is Neuroprotective in a Mouse Model of Multiple Sclerosis ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 40 (2): 143-55. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.10.001>.
- Orsenigo, Fabrizio, Costanza Giampietro, Aldo Ferrari, Monica Corada, Ariane Galaup, Sara Sigismund, Giuseppe Ristagno, et al. 2012. « Phosphorylation of VE-Cadherin Is Modulated by Haemodynamic Forces and Contributes to the Regulation of Vascular Permeability in Vivo ». *Nature Communications* 3 (1): 1208. <https://doi.org/10.1038/ncomms2199>.
- Osawa, Masaki, Michitaka Masuda, Ken-ichi Kusano, et Keigi Fujiwara. 2002. « Evidence for a Role of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 in Endothelial Cell Mechanosignal Transduction: Is It a Mechanoresponsive Molecule? » *The Journal of Cell Biology* 158 (4): 773-85. <https://doi.org/10.1083/jcb.200205049>.
- Otte, Laura A, Kelly S Bell, Laurent Loufrani, Jiunn-Chern Yeh, Benoît Melchior, Diep N Dao, Hazel Y Stevens, Charles R White, et John A Frangos. 2009. « Rapid changes in shear stress induce dissociation of a Gq/11-platelet endothelial cell adhesion molecule-1 complex ». *The Journal of Physiology* 587 (Pt 10): 2365-73. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172643>.
- Ou, Yijun, Peter Strege, Steven M. Miller, Jonathan Makielski, Michael Ackerman, Simon J. Gibbons, et Gianrico Farrugia. 2003. « Syntrophin Gamma 2 Regulates SCN5A Gating by a PDZ Domain-Mediated Interaction ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (3): 1915-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209938200>.
- Oyama, Fumitaka, Haruko Miyazaki, Naoaki Sakamoto, Celine Becquet, Yoko Machida, Kumi Kaneko, Chiharu Uchikawa, et al. 2006. « Sodium Channel Beta4 Subunit: Down-Regulation and Possible Involvement in Neuritic Degeneration in Huntington's Disease Transgenic Mice ». *Journal of Neurochemistry* 98 (2): 518-29. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03893.x>.
- Pahakis, Manolis Y., Jason R. Kosky, Randal O. Dull, et John M. Tarbell. 2007. « The Role of Endothelial Glycocalyx Components in Mechanotransduction of Fluid Shear Stress ». *Biochemical and biophysical research communications* 355 (1): 228-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.137>.
- Pak, Theodore, Patrick Cadet, Kirk J. Mantione, et George B. Stefano. 2005. « Morphine via Nitric Oxide Modulates Beta-Amyloid Metabolism: A Novel Protective Mechanism for Alzheimer's Disease ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 11 (10): BR357-366.
- Pan, Zongming, Tingching Kao, Zsolt Horvath, Julia Lemos, Jai-Yoon Sul, Stephen D. Cranstoun, Vann Bennett, Steven S. Scherer, et Edward C. Cooper. 2006. « A Common Ankyrin-G-Based Mechanism Retains KCNQ and NaV Channels at Electrically Active Domains of the Axon ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (10): 2599-2613. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4314-05.2006>.
- Panciera, Tito, Luca Azzolin, Michelangelo Cordenonsi, et Stefano Piccolo. 2017. « Mechanobiology of YAP and TAZ in Physiology and Disease ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (12): 758-70. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.87>.
- Parpaite, Thibaud, et Bertrand Coste. 2017. « Piezo Channels ». *Current Biology* 27 (7): R250-52. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.048>.
- Partridge, Jason, Harald Carlsen, Karine Enesa, Hera Chaudhury, Mustafa Zakkar, Le Luong, Anne Kinderlerer, et al. 2007. « Laminar Shear Stress Acts as a Switch to Regulate Divergent Functions of NF-KappaB in Endothelial Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (13): 3553-61. <https://doi.org/10.1096/fj.06-8059com>.
- Patino, Gustavo A., William J. Brackenbury, Yangyang Bao, Luis F. Lopez-Santiago, Heather A. O'Malley, Chunling Chen, Jeffrey D. Calhoun, et al. 2011. « Voltage-Gated Na⁺ Channel B1B: A Secreted Cell Adhesion Molecule Involved in Human Epilepsy ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (41): 14577-91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0361-11.2011>.
- Patino, Gustavo A., Lieve R. F. Claes, Luis F. Lopez-Santiago, Emily A. Slat, Raja S. R. Dondeti, Chunling Chen, Heather A. O'Malley, et al. 2009. « A Functional Null Mutation of SCN1B in a Patient with Dravet Syndrome ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (34): 10764-78. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2475-09.2009>.
- Patino, Gustavo A., et Lori L. Isom. 2010. « Electrophysiology and Beyond: Multiple roles of Na⁺ channel β subunits in development and disease ». *Neuroscience letters* 486 (2): 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.050>.
- Pawson, Lorraine, et Stanley J. Bolanowski. 2002. « Voltage-Gated Sodium Channels Are Present on Both the Neural and Capsular Structures of Pacinian Corpuscles ». *Somatosensory & Motor Research* 19 (3): 231-37. <https://doi.org/10.1080/0899022021000009152>.

- Paz, Nathaniel G. dela, Benoît Melchior, et John A. Frangos. 2017. « Shear stress induces Gq/11 activation independently of G protein-coupled receptor activation in endothelial cells ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 312 (4): C428-37. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00148.2016>.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, et M. H. Cobb. 2001. « Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions ». *Endocrine Reviews* 22 (2): 153-83. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>.
- Pei, Zifan, Yanling Pan, et Theodore R. Cummins. 2018. « Posttranslational Modification of Sodium Channels ». In *Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function and Channelopathies*, édité par Mohamed Chahine, 101-24. Handbook of Experimental Pharmacology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/164_2017_69.
- Perozo, Eduardo, D. Marien Cortes, Pornthep Sompornpisut, Anna Kloda, et Boris Martinac. 2002. « Open Channel Structure of MscL and the Gating Mechanism of Mechanosensitive Channels ». *Nature* 418 (6901): 942-48. <https://doi.org/10.1038/nature00992>.
- Perozo, Eduardo, Anna Kloda, D. Marien Cortes, et Boris Martinac. 2002. « Physical Principles Underlying the Transduction of Bilayer Deformation Forces during Mechanosensitive Channel Gating ». *Nature Structural Biology* 9 (9): 696-703. <https://doi.org/10.1038/nsb827>.
- Pertin, M. 2005. « Upregulation of the Voltage-Gated Sodium Channel 2 Subunit in Neuropathic Pain Models: Characterization of Expression in Injured and Non-Injured Primary Sensory Neurons ». *Journal of Neuroscience* 25 (47): 10970-80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3066-05.2005>.
- Platoshyn, Oleksandr, Carmelle V. Remillard, Ivana Fantozzi, Tiffany Sison, et Jason X.-J. Yuan. 2005. « Identification of Functional Voltage-Gated Na(+) Channels in Cultured Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 451 (2): 380-87. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1478-3>.
- Poole, Kate, Mirko Moroni, et Gary R. Lewin. 2015. « Sensory mechanotransduction at membrane-matrix interfaces ». *Pflugers Archiv* 467 (1): 121-32. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1563-6>.
- Porat, Rinnat M., Myriam Grunewald, Anat Globerman, Ahuva Itin, Gregory Barshtein, Leena Alhonen, Kari Alitalo, et Eli Keshet. 2004. « Specific Induction of Tie1 Promoter by Disturbed Flow in Atherosclerosis-Prone Vascular Niches and Flow-Obstructing Pathologies ». *Circulation Research* 94 (3): 394-401. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000111803.92923.D6>.
- Potter, Daniel R., Jurgen van Teeffelen, Hans Vink, et Bernard M. van den Berg. 2015. « Perturbed mechanotransduction by endothelial surface glycocalyx modification greatly impairs the arteriogenic process ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 309 (4): H711-17. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00257.2015>.
- Pries, A. R., et W. M. Kuebler. 2006. « Normal Endothelium ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n° 176 Pt 1: 1-40. https://doi.org/10.1007/3-540-32967-6_1.
- Puri, M. C., J. Rossant, K. Alitalo, A. Bernstein, et J. Partanen. 1995. « The Receptor Tyrosine Kinase TIE Is Required for Integrity and Survival of Vascular Endothelial Cells. » *The EMBO Journal* 14 (23): 5884-91. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00276.x>.
- Qiao, Xin, Guangchun Sun, Jeffrey J. Clare, Taco R. Werkman, et Wytse J. Wadman. 2014. « Properties of Human Brain Sodium Channel α -Subunits Expressed in HEK293 Cells and Their Modulation by Carbamazepine, Phenytoin and Lamotrigine ». *British Journal of Pharmacology* 171 (4): 1054-67. <https://doi.org/10.1111/bph.12534>.
- Qin, Ning, Michael R. D'Andrea, Mary-Lou Lubin, Navid Shafaei, Ellen E. Codd, et Ana M. Correa. 2003. « Molecular Cloning and Functional Expression of the Human Sodium Channel B1B Subunit, a Novel Splicing Variant of the B1 Subunit ». *European Journal of Biochemistry* 270 (23): 4762-70. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03878.x>.
- Radel, C., et V. Rizzo. 2005. « Integrin Mechanotransduction Stimulates Caveolin-1 Phosphorylation and Recruitment of Csk to Mediate Actin Reorganization ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 288 (2): H936-945. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00519.2004>.
- Ranade, Sanjeev S., Zhaozhu Qiu, Seung-Hyun Woo, Sung Sik Hur, Swetha E. Murthy, Stuart M. Cahalan, Jie Xu, et al. 2014. « Piezo1, a Mechanically Activated Ion Channel, Is Required for Vascular Development in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (28): 10347-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409233111>.
- Ratcliffe, C.F., R.E. Westenbroek, R. Curtis, et W.A. Catterall. 2001. « Sodium Channel B1 and B3 Subunits Associate with Neurofascin through Their Extracellular Immunoglobulin-like Domain ». *Journal of Cell Biology* 154 (2): 427-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.200102086>.
- Ratcliffe, Charlotte F., Yusheng Qu, Kimberly A. McCormick, Victoria C. Tibbs, Jack E. Dixon, Todd Scheuer, et William A. Catterall. 2000. « A Sodium Channel Signaling Complex: Modulation by Associated Receptor Protein Tyrosine Phosphatase β ». *Nature Neuroscience* 3 (5): 437-44. <https://doi.org/10.1038/74805>.

- Remuzzi, A., C. F. Dewey, P. F. Davies, et M. A. Gimbrone. 1984. « Orientation of Endothelial Cells in Shear Fields in Vitro ». *Biorheology* 21 (4): 617-30. <https://doi.org/10.3233/bir-1984-21419>.
- Réthoré, Léa, Joohee Park, Jérôme Montnach, Sébastien Nicolas, Joseph Khoury, Elodie Le Seac'h, Kamel Mabrouk, et al. 2022. « Pharmacological Dissection of the Crosstalk between NaV and CaV Channels in GH3b6 Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (2): 827. <https://doi.org/10.3390/ijms23020827>.
- Riuró, Helena, Pedro Beltran-Alvarez, Anna Tarradas, Elisabet Selga, Oscar Campuzano, Marcel Vergés, Sara Pagans, et al. 2013. « A Missense Mutation in the Sodium Channel B2 Subunit Reveals SCN2B as a New Candidate Gene for Brugada Syndrome ». *Human Mutation* 34 (7): 961-66. <https://doi.org/10.1002/humu.22328>.
- Roberts, R. H., et R. L. Barchi. 1987. « The Voltage-Sensitive Sodium Channel from Rabbit Skeletal Muscle. Chemical Characterization of Subunits ». *The Journal of Biological Chemistry* 262 (5): 2298-2303.
- Roger, Sébastien, Ludovic Gillet, Jean-Yves Le Guennec, et Pierre Besson. 2015. « Voltage-Gated Sodium Channels and Cancer: Is Excitability Their Primary Role? » *Frontiers in Pharmacology* 6: 152. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00152>.
- Rubanyi, G. M. 1993. « The Role of Endothelium in Cardiovascular Homeostasis and Diseases ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22 Suppl 4: S1-14. <https://doi.org/10.1097/00005344-199322004-00002>.
- Rush, Anthony M., Theodore R. Cummins, et Stephen G. Waxman. 2007. « Multiple Sodium Channels and Their Roles in Electrogenesis within Dorsal Root Ganglion Neurons ». *The Journal of Physiology* 579 (Pt 1): 1-14. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.121483>.
- Russell, Ryan C., Ye Tian, Haixin Yuan, Hyun Woo Park, Yu-Yun Chang, Joungmok Kim, Haerin Kim, Thomas P. Neufeld, Andrew Dillin, et Kun-Liang Guan. 2013. « ULK1 Induces Autophagy by Phosphorylating Beclin-1 and Activating VPS34 Lipid Kinase ». *Nature Cell Biology* 15 (7): 741-50. <https://doi.org/10.1038/ncb2757>.
- Russo, T. A., A. M. M. Banuth, H. B. Nader, et J. L. Dreyfuss. 2020. « Altered Shear Stress on Endothelial Cells Leads to Remodeling of Extracellular Matrix and Induction of Angiogenesis ». *PLOS ONE* 15 (11): e0241040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241040>.
- Ryu, Jeong Yeop, Yun Hyun Kim, Joon Seok Lee, Jeong Woo Lee, Eun Jung Oh, Hyun Mi Kim, Seok-Jong Lee, et al. 2021. « Oscillatory Shear Stress Promotes Angiogenic Effects in Arteriovenous Malformations Endothelial Cells ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 27 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00291-6>.
- Sabbagh, Mark F., Jacob S. Heng, Chongyuan Luo, Rosa G. Castanon, Joseph R. Nery, Amir Rattner, Loyal A. Goff, Joseph R. Ecker, et Jeremy Nathans. 2018. « Transcriptional and Epigenomic Landscapes of CNS and Non-CNS Vascular Endothelial Cells ». *ELife* 7 (septembre): e36187. <https://doi.org/10.7554/eLife.36187>.
- Salvage, Samantha C., Christopher L.-H. Huang, et Antony P. Jackson. 2020. « Cell-Adhesion Properties of β -Subunits in the Regulation of Cardiomyocyte Sodium Channels ». *Biomolecules* 10 (7): E989. <https://doi.org/10.3390/biom10070989>.
- Salvage, Samantha C., Wandu Zhu, Zaki F. Habib, Soyoon S. Hwang, Jennifer R. Irons, Christopher L. H. Huang, Jonathan R. Silva, et Antony P. Jackson. 2019. « Gating Control of the Cardiac Sodium Channel Nav1.5 by Its B3-Subunit Involves Distinct Roles for a Transmembrane Glutamic Acid and the Extracellular Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (51): 19752-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010283>.
- Sanchez-Sandoval, Ana Laura, et Juan Carlos Gomora. 2019. « Contribution of Voltage-Gated Sodium Channel β -Subunits to Cervical Cancer Cells Metastatic Behavior ». *Cancer Cell International* 19 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0757-6>.
- Sashihara, S., Y. Oh, J. A. Black, et S. G. Waxman. 1995. « Na⁺ Channel Beta 1 Subunit mRNA Expression in Developing Rat Central Nervous System ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 34 (2): 239-50. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(95\)00168-r](https://doi.org/10.1016/0169-328x(95)00168-r).
- Schaaf, Marco B., Diederik Houbart, Odeta Meçe, et Patrizia Agostinis. 2019. « Autophagy in Endothelial Cells and Tumor Angiogenesis ». *Cell Death & Differentiation* 26 (4): 665-79. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0287-8>.
- Scheffer, Ingrid E., Louise A. Harkin, Bronwyn E. Grinton, Leanne M. Dibbens, Samantha J. Turner, Marta A. Zielinski, Ruwei Xu, et al. 2007. « Temporal Lobe Epilepsy and GEFS+ Phenotypes Associated with SCN1B Mutations ». *Brain: A Journal of Neurology* 130 (Pt 1): 100-109. <https://doi.org/10.1093/brain/awl272>.
- Scheffer, Ingrid E., Yue-Hua Zhang, Jozef Gecz, et Leanne Dibbens. 2010. « Genetics of the Epilepsies: Genetic Twists in the Channels and Other Tales ». *Epilepsia* 51 Suppl 1 (février): 33-36. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02440.x>.

- Schiller, Herbert B., Michaela-Rosemarie Hermann, Julien Polleux, Timothée Vignaud, Sara Zanivan, Caroline C. Friedel, Zhiqi Sun, et al. 2013. « B1- and Av-Class Integrins Cooperate to Regulate Myosin II during Rigidity Sensing of Fibronectin-Based Microenvironments ». *Nature Cell Biology* 15 (6): 625-36. <https://doi.org/10.1038/ncb2747>.
- Schmidt, Kjestine, et Cor de Wit. 2020. « Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Myoendothelial Coupling: The in vivo Perspective ». *Frontiers in Physiology* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.602930>.
- Schnittler, H. J., B. Püschel, et D. Drenckhahn. 1997. « Role of Cadherins and Plakoglobin in Interendothelial Adhesion under Resting Conditions and Shear Stress ». *The American Journal of Physiology* 273 (5): H2396-2405. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.5.H2396>.
- Schober, Joseph M., Ningyu Chen, Tatiana M. Grzeszkiewicz, Igor Jovanovic, Eugene E. Emeson, Tatiana P. Ugarova, Richard D. Ye, Lester F. Lau, et Stephen C.-T. Lam. 2002. « Identification of Integrin Alpha(M)Beta(2) as an Adhesion Receptor on Peripheral Blood Monocytes for Cyr61 (CCN1) and Connective Tissue Growth Factor (CCN2): Immediate-Early Gene Products Expressed in Atherosclerotic Lesions ». *Blood* 99 (12): 4457-65. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.12.4457>.
- SenBanerjee, Sucharita, Zhiyong Lin, G. Brandon Atkins, Daniel M. Greif, Ravi M. Rao, Ajay Kumar, Mark W. Feinberg, et al. 2004. « KLF2 Is a Novel Transcriptional Regulator of Endothelial Proinflammatory Activation ». *Journal of Experimental Medicine* 199 (10): 1305-15. <https://doi.org/10.1084/jem.20031132>.
- Shah, B. S., E. B. Stevens, M. I. Gonzalez, S. Bramwell, R. D. Pinnock, K. Lee, et A. K. Dixon. 2000. « Beta3, a Novel Auxiliary Subunit for the Voltage-Gated Sodium Channel, Is Expressed Preferentially in Sensory Neurons and Is Upregulated in the Chronic Constriction Injury Model of Neuropathic Pain ». *The European Journal of Neuroscience* 12 (11): 3985-90. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00294.x>.
- Shay-Salit, Ayelet, Moran Shushy, Efrat Wolfovitz, Hava Yahav, Ferruccio Breviario, Elisabetta Dejana, et Nitzan Resnick. 2002. « VEGF Receptor 2 and the Adherens Junction as a Mechanical Transducer in Vascular Endothelial Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (14): 9462-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.142224299>.
- Shih, Yung-Luen, Hsiao-Min Chou, Hsiu-Chen Chou, Hsu-Feng Lu, Yung-Lin Chu, Hung-Sheng Shang, et Jing-Gung Chung. 2017. « Casticin Impairs Cell Migration and Invasion of Mouse Melanoma B16F10 Cells via PI3K/AKT and NF-KB Signaling Pathways ». *Environmental Toxicology* 32 (9): 2097-2112. <https://doi.org/10.1002/tox.22417>.
- Shihata, Waled A., Danielle L. Michell, Karen L. Andrews, et Jaye P. F. Chin-Dusting. 2016. « Caveolae: A Role in Endothelial Inflammation and Mechanotransduction? ». *Frontiers in Physiology* 7: 628. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00628>.
- Shimizu, Hideaki, Haruko Miyazaki, Noboru Ohsawa, Shisako Shoji, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Asako Tosaki, Fumitaka Oyama, et al. 2016. « Structure-Based Site-Directed Photo-Crosslinking Analyses of Multimeric Cell-Adhesive Interactions of Voltage-Gated Sodium Channel β Subunits ». *Scientific Reports* 6 (1): 26618. <https://doi.org/10.1038/srep26618>.
- Shiroishi, Mitsunori, et Takuya Kobayashi. 2017. « Structural Analysis of the Histamine H1 Receptor ». *Handbook of Experimental Pharmacology* 241: 21-30. https://doi.org/10.1007/164_2016_10.
- Shiu, Yan-Ting, Song Li, William A. Marganski, Shunichi Usami, Martin A. Schwartz, Yu-Li Wang, Micah Dembo, et Shu Chien. 2004. « Rho Mediates the Shear-Enhancement of Endothelial Cell Migration and Traction Force Generation ». *Biophysical Journal* 86 (4): 2558-65. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74311-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74311-8).
- Shyy, John Y.-J., et Shu Chien. 2002. « Role of Integrins in Endothelial Mechanosensing of Shear Stress ». *Circulation Research* 91 (9): 769-75. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000038487.19924.18>.
- Simmons, Rachel D., Sandeep Kumar, et Hanjoong Jo. 2016. « The Role of Endothelial Mechanosensitive Genes in Atherosclerosis and Omics Approaches ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 591 (février): 111-31. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.005>.
- Sjöblom, Tobias, Siân Jones, Laura D. Wood, D. Williams Parsons, Jimmy Lin, Thomas D. Barber, Diana Mandelker, et al. 2006. « The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers ». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5797): 268-74. <https://doi.org/10.1126/science.1133427>.
- Soeki, Takeshi, Toshiyuki Niki, Kenya Kusunose, Sachiko Bando, Yoichiro Hirata, Noriko Tomita, Koji Yamaguchi, et al. 2011. « Elevated Concentrations of Pentraxin 3 Are Associated with Coronary Plaque Vulnerability ». *Journal of Cardiology* 58 (2): 151-57. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2011.04.005>.
- Sokolov, Maxim V., Petra Henrich-Noack, Carina Raynoschek, Bo Franzén, Olof Larsson, Martin Main, et Michael Dabrowski. 2018. « Co-Expression of β Subunits with the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.7: The Importance of Subunit Association and Phosphorylation and Their Effects on Channel Pharmacology and

- Biophysics ». *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 65 (2): 154-66. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1082-6>.
- Song, En-Lin, Ya-Ping Hou, Shen-Ping Yu, Sheng-Guo Chen, Jun-Ting Huang, Tao Luo, Ling-Ping Kong, Jie Xu, et Hua-Qiao Wang. 2011. « EFEMP1 Expression Promotes Angiogenesis and Accelerates the Growth of Cervical Cancer in Vivo ». *Gynecologic Oncology* 121 (1): 174-80. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.11.004>.
- Sontheimer, H, E Fernandez-Marques, N Ullrich, CA Pappas, et SG Waxman. 1994. « Astrocyte Na⁺ channels are required for maintenance of Na⁺/K⁺-ATPase activity ». *The Journal of Neuroscience* 14 (5): 2464-75. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-02464.1994>.
- Sowa, Grzegorz. 2012. « Caveolae, Caveolins, Cavins, and Endothelial Cell Function: New Insights ». *Frontiers in Physiology* 2: 120. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00120>.
- Srinivasan, J., M. Schachner, et W.A. Catterall. 1998. « Interaction of Voltage-Gated Sodium Channels with the Extracellular Matrix Molecules Tenascin-C and Tenascin-R ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15753-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15753>.
- Stemerman, M. B., E. M. Morrel, K. R. Burke, C. K. Colton, K. A. Smith, et R. S. Lees. 1986. « Local Variation in Arterial Wall Permeability to Low Density Lipoprotein in Normal Rabbit Aorta ». *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 6 (1): 64-69. <https://doi.org/10.1161/01.atv.6.1.64>.
- Stevens, Edward B., Peter J. Cox, Bhaval S. Shah, Alistair K. Dixon, Peter J. Richardson, Robert D. Pinnock, et Kevin Lee. 2001. « Tissue Distribution and Functional Expression of the Human Voltage-Gated Sodium Channel B3 Subunit ». *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 441 (4): 481-88. <https://doi.org/10.1007/s004240000449>.
- Strege, Peter R., Adrian N. Holm, Adam Rich, Steven M. Miller, Yijun Ou, Michael G. Sarr, et Gianrico Farrugia. 2003. « Cytoskeletal Modulation of Sodium Current in Human Jejunal Circular Smooth Muscle Cells ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 284 (1): C60-66. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00532.2001>.
- Strege, Peter R., Arnaldo Mercado-Perez, Amelia Mazzone, Yuri A. Saito, Cheryl E. Bernard, Gianrico Farrugia, et Arthur Beyder. 2019. « SCN5A Mutation G615E Results in Nav1.5 Voltage-Gated Sodium Channels with Normal Voltage-Dependent Function yet Loss of Mechanosensitivity ». *Channels (Austin, Tex.)* 13 (1): 287-98. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1632670>.
- Strege, Peter R., Yijun Ou, Lei Sha, Adam Rich, Simon J. Gibbons, Joseph H. Szurszewski, Michael G. Sarr, et Gianrico Farrugia. 2003. « Sodium Current in Human Intestinal Interstitial Cells of Cajal ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 285 (6): G1111-1121. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00152.2003>.
- Sutkowski, E. M., et W. A. Catterall. 1990. « Beta 1 Subunits of Sodium Channels. Studies with Subunit-Specific Antibodies ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (21): 12393-99.
- Suzuki, Takafumi, Tatsuhiro Shibata, Kai Takaya, Kouya Shiraishi, Takashi Kohno, Hideo Kunitoh, Koji Tsuta, et al. 2013. « Regulatory Nexus of Synthesis and Degradation Deciphers Cellular Nrf2 Expression Levels ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (12): 2402-12. <https://doi.org/10.1128/MCB.00065-13>.
- Sweet, David R., Liyan Fan, Paishiun N. Hsieh, et Mukesh K. Jain. 2018. « Krüppel-Like Factors in Vascular Inflammation: Mechanistic Insights and Therapeutic Potential ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5: 6. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00006>.
- Syeda, Ruhma, Maria N. Florendo, Charles D. Cox, Jennifer M. Kefauver, Jose S. Santos, Boris Martinac, et Ardem Patapoutian. 2016. « Piezo1 Channels Are Inherently Mechanosensitive ». *Cell Reports* 17 (7): 1739-46. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.033>.
- Tabarean, I. V., P. Juranka, et C. E. Morris. 1999. « Membrane Stretch Affects Gating Modes of a Skeletal Muscle Sodium Channel ». *Biophysical Journal* 77 (2): 758-74. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76930-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76930-4).
- Tan, Bi-Hua, Kavitha N. Pundi, David W. Van Norstrand, Carmen R. Valdivia, David J. Tester, Argelia Medeiros-Domingo, Jonathan C. Makielski, et Michael J. Ackerman. 2010. « Sudden Infant Death Syndrome-Associated Mutations in the Sodium Channel Beta Subunits ». *Heart Rhythm* 7 (6): 771-78. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2010.01.032>.
- Teng, Jinfeng, Stephen Loukin, Andriy Anishkin, et Ching Kung. 2015. « The Force-From-Lipid (FFL) principle of mechanosensitivity, at large and in elements ». *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 467 (1): 27-37. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1530-2>.
- Terlau, H., S. H. Heinemann, W. Stühmer, M. Pusch, F. Conti, K. Imoto, et S. Numa. 1991. « Mapping the Site of Block by Tetrodotoxin and Saxitoxin of Sodium Channel II ». *FEBS Letters* 293 (1-2): 93-96. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81159-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81159-6).

- Thi, Mia M, John M Tarbell, Sheldon Weinbaum, et David C Spray. 2004. « The Role of the Glycocalyx in Reorganization of the Actin Cytoskeleton under Fluid Shear Stress: A "Bumper-Car" Model ». *CELL BIOLOGY*.
- Thijssen, Victor L. 2021. « Galectins in Endothelial Cell Biology and Angiogenesis: The Basics ». *Biomolecules* 11 (9): 1386. <https://doi.org/10.3390/biom11091386>.
- Tourdout, Benjamin E., Michelle K. Brenner, Kathleen C. Keough, Trudy Holyst, Peter J. Newman, et Debra K. Newman. 2013. « Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif (ITIM)-Mediated Inhibitory Signaling Is Regulated by Sequential Phosphorylation Mediated by Distinct Nonreceptor Tyrosine Kinases: A Case Study Involving PECAM-1 ». *Biochemistry* 52 (15): 2597-2608. <https://doi.org/10.1021/bi301461t>.
- Touyz, R. M., et E. L. Schiffrin. 2004. « Reactive Oxygen Species in Vascular Biology: Implications in Hypertension ». *Histochemistry and Cell Biology* 122 (4): 339-52. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0696-7>.
- Traub, O., T. Ishida, M. Ishida, J. C. Tupper, et B. C. Berk. 1999. « Shear Stress-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation Is Regulated by Sodium in Endothelial Cells. Potential Role for a Voltage-Dependent Sodium Channel ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (29): 20144-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20144>.
- Traub, O., B. P. Monia, N. M. Dean, et B. C. Berk. 1997. « PKC-Epsilon Is Required for Mechano-Sensitive Activation of ERK1/2 in Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (50): 31251-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31251>.
- Trinidad, Jonathan C., David T. Barkan, Brittany F. Gullledge, Agnes Thalhammer, Andrej Sali, Ralf Schoepfer, et Alma L. Burlingame. 2012. « Global Identification and Characterization of Both O-GlcNAcylation and Phosphorylation at the Murine Synapse ». *Molecular & Cellular Proteomics* 11 (8): 215-29. <https://doi.org/10.1074/mcp.O112.018366>.
- Tzima, Eleni. 2006. « Role of Small GTPases in Endothelial Cytoskeletal Dynamics and the Shear Stress Response ». *Circulation Research* 98 (2): 176-85. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000200162.94463.d7>.
- Tzima, Eleni, Mohamed Irani-Tehrani, William B. Kiosses, Elizabetta Dejana, David A. Schultz, Britta Engelhardt, Gaoyuan Cao, Horace DeLisser, et Martin Alexander Schwartz. 2005. « A Mechanosensory Complex That Mediates the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress ». *Nature* 437 (7057): 426-31. <https://doi.org/10.1038/nature03952>.
- Tzima, Eleni, William B. Kiosses, Miguel A. del Pozo, et Martin Alexander Schwartz. 2003. « Localized Cdc42 Activation, Detected Using a Novel Assay, Mediates Microtubule Organizing Center Positioning in Endothelial Cells in Response to Fluid Shear Stress ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (33): 31020-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301179200>.
- Valdivia, Carmen R., Argelia Medeiros-Domingo, Bin Ye, Win-Kuang Shen, Timothy J. Algers, Michael J. Ackerman, et Jonathan C. Makielski. 2010. « Loss-of-Function Mutation of the SCN3B-Encoded Sodium Channel {beta}3 Subunit Associated with a Case of Idiopathic Ventricular Fibrillation ». *Cardiovascular Research* 86 (3): 392-400. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp417>.
- Van der Heiden, Kim, Beerend P. Hierck, Rob Krams, Rini de Crom, Caroline Cheng, Martin Baiker, Mathieu J.B.M. Pourquie, et al. 2008. « Endothelial Primary Cilia in Areas of Disturbed Flow Are at the Base of Atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 196 (2): 542-50. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.030>.
- Vanhoutte, P. M. 1999. « How to Assess Endothelial Function in Human Blood Vessels ». *Journal of Hypertension* 17 (8): 1047-58. <https://doi.org/10.1097/00004872-199917080-00001>.
- Vásquez, Valeria, Marcos Sotomayor, Julio Cordero-Morales, Klaus Schulten, et Eduardo Perozo. 2008. « A Structural Mechanism for MscS Gating in Lipid Bilayers ». *Science (New York, N.Y.)* 321 (5893): 1210-14. <https://doi.org/10.1126/science.1159674>.
- Vicente-Manzanares, Miguel, Colin Kiwon Choi, et Alan Rick Horwitz. 2009. « Integrins in cell migration – the actin connection ». *Journal of Cell Science* 122 (2): 199-206. <https://doi.org/10.1242/jcs.018564>.
- Villarreal, Guadalupe, Yuzhi Zhang, H. Benjamin Larman, Jorge Gracia-Sancho, Andrew Koo, et Guillermo García-Cardeña. 2010. « Defining the Regulation of KLF4 Expression and Its Downstream Transcriptional Targets in Vascular Endothelial Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391 (1): 984-89. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.002>.
- Vion, Anne-Clemence, Marouane Kheloufi, Adel Hammoutene, Johanne Poisson, Juliette Lasselin, Cecile Devue, Isabelle Pic, et al. 2017. « Autophagy Is Required for Endothelial Cell Alignment and Atheroprotection under Physiological Blood Flow ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (41): E8675-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702223114>.
- Virsolvy, Anne, Aurélie Fort, Lucie Erceau, Azzouz Charrabi, Maurice Hayot, Franck Aimond, et Sylvain Richard. 2021. « Hypoxic Conditions Promote Rhythmic Contractile Oscillations Mediated by Voltage-Gated

- Sodium Channels Activation in Human Arteries ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (5): 2570. <https://doi.org/10.3390/ijms22052570>.
- Vreeken, Dianne, Huayu Zhang, Anton Jan van Zonneveld, et Janine M. van Gils. 2020. « Ephs and Ephrins in Adult Endothelial Biology ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (16): 5623. <https://doi.org/10.3390/ijms21165623>.
- Wallace, R. H., D. W. Wang, R. Singh, I. E. Scheffer, A. L. George, H. A. Phillips, K. Saar, et al. 1998. « Febrile Seizures and Generalized Epilepsy Associated with a Mutation in the Na⁺-Channel Beta1 Subunit Gene SCN1B ». *Nature Genetics* 19 (4): 366-70. <https://doi.org/10.1038/1252>.
- Wang, D. W., K. Yazawa, A. L. George, et P. B. Bennett. 1996. « Characterization of Human Cardiac Na⁺ Channel Mutations in the Congenital Long QT Syndrome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (23): 13200-205. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13200>.
- Wang, Kuei-Chun, Yi-Ting Yeh, Phu Nguyen, Elaine Limquenco, Jocelyn Lopez, Satenick Thorossian, Kun-Liang Guan, Yi-Shuan J. Li, et Shu Chien. 2016. « Flow-Dependent YAP/TAZ Activities Regulate Endothelial Phenotypes and Atherosclerosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (41): 11525-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613121113>.
- Wang, Li, Jiang-Yun Luo, Bochuan Li, Xiao Yu Tian, Li-Jing Chen, Yuhong Huang, Jian Liu, et al. 2016. « Integrin-YAP/TAZ-JNK Cascade Mediates Atheroprotective Effect of Unidirectional Shear Flow ». *Nature* 540 (7634): 579-82. <https://doi.org/10.1038/nature20602>.
- Wang, Pengyun, Qinbo Yang, Xiaofen Wu, Yanzong Yang, Lisong Shi, Chuchu Wang, Gang Wu, et al. 2010. « Functional Dominant-Negative Mutation of Sodium Channel Subunit Gene SCN3B Associated with Atrial Fibrillation in a Chinese GeneID Population ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398 (1): 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.042>.
- Wang, Kai Qu, Jing Wang, Rui Qin, Bingyi Li, Juhui Qiu, et Guixue Wang. 2022. « Biomechanical Regulation of Planar Cell Polarity in Endothelial Cells ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1868 (12): 166495. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166495>.
- Wang, ShengPeng, Ramesh Chennupati, Harmandeep Kaur, Andras Iring, Nina Wettschureck, et Stefan Offermanns. 2016. « Endothelial Cation Channel PIEZO1 Controls Blood Pressure by Mediating Flow-Induced ATP Release ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (12): 4527-36. <https://doi.org/10.1172/JCI87343>.
- Warboys, Christina M., R. Eric Berson, Giovanni E. Mann, Jeremy D. Pearson, et Peter D. Weinberg. 2010. « Acute and Chronic Exposure to Shear Stress Have Opposite Effects on Endothelial Permeability to Macromolecules ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 298 (6): H1850-1856. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00114.2010>.
- Watanabe, Hiroshi, Dawood Darbar, Daniel W. Kaiser, Kim Jiramongkolchai, Sameer Chopra, Brian S. Donahue, Prince J. Kannankeril, et Dan M. Roden. 2009. « Mutations in Sodium Channel B1- and B2-Subunits Associated with Atrial Fibrillation ». *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* 2 (3): 268-75. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.779181>.
- Watanabe, Hiroshi, Tamara T. Koopmann, Solena Le Scouarnec, Tao Yang, Christiana R. Ingram, Jean-Jacques Schott, Sophie Demolombe, et al. 2008. « Sodium Channel B1 Subunit Mutations Associated with Brugada Syndrome and Cardiac Conduction Disease in Humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (6): 2260-68. <https://doi.org/10.1172/JCI33891>.
- Watanabe, Hiroyuki, John B. Davis, Darren Smart, Jeff C. Jernan, Graham D. Smith, Phil Hayes, Joris Vriens, et al. 2002. « Activation of TRPV4 Channels (HVRL-2/MTRP12) by Phorbol Derivatives ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 13569-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200062200>.
- Watanabe, Hiroyuki, Joris Vriens, Jean Prenen, Guy Droogmans, Thomas Voets, et Bernd Nilius. 2003. « Anandamide and Arachidonic Acid Use Epoxyeicosatrienoic Acids to Activate TRPV4 Channels ». *Nature* 424 (6947): 434-38. <https://doi.org/10.1038/nature01807>.
- Watanabe, Hiroyuki, Joris Vriens, Suk H. Suh, Christopher D. Benham, Guy Droogmans, et Bernd Nilius. 2002. « Heat-Evoked Activation of TRPV4 Channels in a HEK293 Cell Expression System and in Native Mouse Aorta Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (49): 47044-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208277200>.
- Waxman, Stephen G. 2006. « Axonal Conduction and Injury in Multiple Sclerosis: The Role of Sodium Channels ». *Nature Reviews Neuroscience* 7 (12): 932-41. <https://doi.org/10.1038/nrn2023>.
- Wei, Wei-Chun, Fabio Bianchi, Yang-Kao Wang, Ming-Jer Tang, Hua Ye, et Maïke D. Glitsch. 2018. « Coincidence Detection of Membrane Stretch and Extracellular PH by the Proton-Sensing Receptor OGR1 (GPR68) ». *Current Biology: CB* 28 (23): 3815-3823.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.10.046>.
- Wessel, Florian, Mark Winderlich, Maren Holm, Maïke Frye, Ronmy Rivera-Galdos, Matthias Vockel, Ruth Linnepe, et al. 2014. « Leukocyte Extravasation and Vascular Permeability Are Each Controlled in Vivo by Different

- Tyrosine Residues of VE-Cadherin ». *Nature Immunology* 15 (3): 223-30. <https://doi.org/10.1038/ni.2824>.
- White, Stephen J., Elaine M. Hayes, Stéphanie Lehoux, Jamie Y. Jeremy, Anton J. G. Horrevoets, et Andrew C. Newby. 2011. « Characterization of the Differential Response of Endothelial Cells Exposed to Normal and Elevated Laminar Shear Stress ». *Journal of Cellular Physiology* 226 (11): 2841-48. <https://doi.org/10.1002/jcp.22629>.
- Wiggins, Paul, et Rob Phillips. 2005. « Membrane-Protein Interactions in Mechanosensitive Channels ». *Biophysical Journal* 88 (2): 880-902. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047431>.
- Wojciak-Stothard, Beata, et Anne J. Ridley. 2003. « Shear Stress-Induced Endothelial Cell Polarization Is Mediated by Rho and Rac but Not Cdc42 or PI 3-Kinases ». *The Journal of Cell Biology* 161 (2): 429-39. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210135>.
- Wong, Hon-Kit, Takashi Sakurai, Fumitaka Oyama, Kumi Kaneko, Koji Wada, Haruko Miyazaki, Masaru Kurosawa, Bart De Strooper, Paul Saftig, et Nobuyuki Nukina. 2005. « Beta Subunits of Voltage-Gated Sodium Channels Are Novel Substrates of Beta-Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme (BACE1) and Gamma-Secretase ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (24): 23009-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414648200>.
- Woo, Kel Vin, Xianghu Qu, Vladimir R. Babaev, MacRae F. Linton, Raul J. Guzman, Sergio Fazio, et H. Scott Baldwin. 2011. « Tie1 Attenuation Reduces Murine Atherosclerosis in a Dose-Dependent and Shear Stress-Specific Manner ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (4): 1624-35. <https://doi.org/10.1172/JCI42040>.
- Wu, David, Ru-Ting Huang, Robert B Hamanaka, Matt Krause, Myung-Jin Oh, Cheng-Hsiang Kuo, Recep Nigdelioglu, et al. 2017. « HIF-1 α is required for disturbed flow-induced metabolic reprogramming in human and porcine vascular endothelium ». Édité par Kari Alitalo. *eLife* 6 (mai): e25217. <https://doi.org/10.7554/eLife.25217>.
- Wu, Hao, Ruixia Deng, Xingmiao Chen, Waiman Connie Wong, Hansen Chen, Lei Gao, Yichu Nie, Wutian Wu, et Jiangang Shen. 2016. « Caveolin-1 Is Critical for Lymphocyte Trafficking into Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36 (19): 5193-99. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3734-15.2016>.
- Wu, Yi-Shuan Li, Jason H. Haga, Roland Kaunas, Jeng-Jiann Chiu, Fong-Chin Su, Shunichi Usami, et Shu Chien. 2007. « Directional Shear Flow and Rho Activation Prevent the Endothelial Cell Apoptosis Induced by Micropatterned Anisotropic Geometry ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (4): 1254-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609806104>.
- Wu, Wei, Han Xiao, Andrés Laguna-Fernandez, Guadalupe Villarreal, Kuei-Chun Wang, Greg G. Geary, Yuzhi Zhang, et al. 2011. « Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a ». *Circulation* 124 (5): 633-41. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.005108>.
- Xanthis, Ioannis, Celine Souilhol, Jovana Serbanovic-Canic, Hannah Roddie, Antreas C. Kalli, Maria Fragiadaki, Raymond Wong, et al. 2019. « B1 Integrin Is a Sensor of Blood Flow Direction ». *Journal of Cell Science* 132 (11): jcs229542. <https://doi.org/10.1242/jcs.229542>.
- Xiao, Z. C., D. S. Ragsdale, J. D. Malhotra, L. N. Mattei, P. E. Braun, M. Schachner, et L. L. Isom. 1999. « Tenascin-R Is a Functional Modulator of Sodium Channel Beta Subunits ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (37): 26511-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26511>.
- Xu, Bao-Feng, Rui Liu, Chun-Xia Huang, Bin-Sheng He, Guang-Yi Li, Hong-Shuo Sun, Zhong-Ping Feng, et Mei-Hua Bao. 2020. « Identification of Key Genes in Ruptured Atherosclerotic Plaques by Weighted Gene Correlation Network Analysis ». *Scientific Reports* 10 (1): 10847. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67114-2>.
- Xu, Jie, Jayanti Mathur, Emilie Vessièrès, Scott Hammack, Keiko Nonomura, Julie Favre, Linda Grimaud, et al. 2018. « GPR68 Senses Flow and Is Essential for Vascular Physiology ». *Cell* 173 (3): 762-775.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.076>.
- Xu, Suowen, Marina Koroleva, Meimei Yin, et Zheng Gen Jin. 2016. « Atheroprotective Laminar Flow Inhibits Hippo Pathway Effector YAP in Endothelial Cells ». *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 176 (octobre): 18-28.e2. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.05.003>.
- Xu, Yan, Xiaoqiang Ding, Jianzhou Zou, Zhonghua Liu, Suhua Jiang, Shaowei Xu, Bo Shen, Yuemei Chen, Yisheng Shan, et Xuesen Cao. 2011. « Plasma Pentraxin 3 Is Associated with Cardiovascular Disease in Hemodialysis Patients ». *Renal Failure* 33 (10): 998-1004. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2011.618969>.
- Yang, Baohua, Chris Radel, Dalton Hughes, Sheri Kelemen, et Victor Rizzo. 2011. « P190 RhoGTPase-Activating Protein Links the B1 Integrin/Caveolin-1 Mechanosignaling Complex to RhoA and Actin Remodeling ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (2): 376-83. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.217794>.

- Yang, Ming, David J. Kozminski, Lindsey A. Wold, Rohan Modak, Jeffrey D. Calhoun, Lori L. Isom, et William J. Brackenbury. 2012. « Therapeutic Potential for Phenytoin: Targeting Nav1.5 Sodium Channels to Reduce Migration and Invasion in Metastatic Breast Cancer ». *Breast Cancer Research and Treatment* 134 (2): 603-15. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2102-9>.
- Yao, Yu, Aleksandr Rabodzey, et C. Forbes Dewey. 2007. « Glycocalyx Modulates the Motility and Proliferative Response of Vascular Endothelium to Fluid Shear Stress ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 293 (2): H1023-1030. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00162.2007>.
- Yu, Frank H., et William A. Catterall. 2003. « Overview of the Voltage-Gated Sodium Channel Family ». *Genome Biology* 4 (3): 207. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-207>.
- Yu, Frank H., Ruth E. Westenbroek, Inmaculada Silos-Santiago, Kimberly A. McCormick, Deborah Lawson, Pei Ge, Holly Ferreira, et al. 2003. « Sodium Channel B4, a New Disulfide-Linked Auxiliary Subunit with Similarity to B2 ». *Journal of Neuroscience* 23 (20): 7577-85. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-20-07577.2003>.
- Yu, Jun, Sonia Bergaya, Takahisa Murata, Ilkay F. Alp, Michael P. Bauer, Michelle I. Lin, Marek Drab, Teymuraz V. Kurzchalia, Radu V. Stan, et William C. Sessa. 2006. « Direct Evidence for the Role of Caveolin-1 and Caveolae in Mechanotransduction and Remodeling of Blood Vessels ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (5): 1284-91. <https://doi.org/10.1172/JCI27100>.
- Zaidel-Bar, Ronen, et Benjamin Geiger. 2010. « The Switchable Integrin Adhesome ». *Journal of Cell Science* 123 (9): 1385-88. <https://doi.org/10.1242/jcs.066183>.
- Zebda, Nouredine, Oleksii Dubrovskiy, et Konstantin G. Birukov. 2012. « Focal Adhesion Kinase Regulation of Mechanotransduction and Its Impact on Endothelial Cell Functions ». *Microvascular Research* 83 (1): 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2011.06.007>.
- Zeng, Ye, et John M. Tarbell. 2014. « The Adaptive Remodeling of Endothelial Glycocalyx in Response to Fluid Shear Stress ». *PLOS ONE* 9 (1): e86249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086249>.
- Zhang, Chenghu, Ting Zhou, Zhipeng Chen, Meng Yan, Bochuan Li, Huizhen Lv, Chunjong Wang, et al. 2020. « Coupling of Integrin A5 to Annexin A2 by Flow Drives Endothelial Activation ». *Circulation Research* 127 (8): 1074-90. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316857>.
- Zhang, Ji, et Morton H. Friedman. 2012. « Adaptive Response of Vascular Endothelial Cells to an Acute Increase in Shear Stress Magnitude ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 302 (4): H983-991. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00168.2011>.
- Zhang, Wei, Li E. Cheng, Maike Kittelmann, Jiefu Li, Maja Petkovic, Tong Cheng, Peng Jin, et al. 2015. « Ankyrin Repeats Convey Force to Gate the NOMPC Mechanotransduction Channel ». *Cell* 162 (6): 1391-1403. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.024>.
- Zhao, Juan, Michael E. O'Leary, et Mohamed Chahine. 2011. « Regulation of Nav1.6 and Nav1.8 peripheral nerve Na⁺ channels by auxiliary β -subunits ». *Journal of Neurophysiology* 106 (2): 608-19. <https://doi.org/10.1152/jn.00107.2011>.
- Zhao, Yingzi, Paul M. Vanhoutte, et Susan W.S. Leung. 2015. « Vascular Nitric Oxide: Beyond ENOS ». *Journal of Pharmacological Sciences* 129 (2): 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>.
- Zhao, Yongbo, Guangxing Feng, Yanzhi Wang, Yuehong Yue, et Weichao Zhao. 2014. « A key mediator, PTX3, of IKK/I κ B/NF- κ B exacerbates human umbilical vein endothelial cell injury and dysfunction ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7 (11): 7699-7707.
- Zheng, Qi, Yonggang Zou, Peng Teng, Zhenghua Chen, Yuefeng Wu, Xiaoyi Dai, Xiya Li, et al. 2022. « Mechanosensitive Channel PIEZO1 Senses Shear Force to Induce KLF2/4 Expression via CaMKII/MEKK3/ERK5 Axis in Endothelial Cells ». *Cells* 11 (14): 2191. <https://doi.org/10.3390/cells11142191>.
- Zhou, Changqian, Kaili Ma, Ruize Gao, Chenglong Mu, Linbo Chen, Qiangqiang Liu, Qian Luo, Du Feng, Yushan Zhu, et Quan Chen. 2017. « Regulation of MATG9 Trafficking by Src- and ULK1-Mediated Phosphorylation in Basal and Starvation-Induced Autophagy ». *Cell Research* 27 (2): 184-201. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.146>.
- Zhou, Guangjin, Anne Hamik, Lalitha Nayak, Hongmei Tian, Hong Shi, Yuan Lu, Nikunj Sharma, et al. 2012. « Endothelial Kruppel-like Factor 4 Protects against Atherothrombosis in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (12): 4727-31. <https://doi.org/10.1172/JCI66056>.
- Zhou, Haoyue, Feng Gao, Xiaoli Yang, Tingting Lin, Zhenxing Li, Qiong Wang, Yang Yao, et al. 2022. « Endothelial BACE1 Impairs Cerebral Small Vessels via Tight Junctions and ENOS ». *Circulation Research* 130 (9): 1321-41. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.320183>.
- Zhou, Jing, Yi-Shuan Li, et Shu Chien. 2014. « Shear Stress-Initiated Signaling and Its Regulation of Endothelial Function ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34 (10): 2191-98. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303422>.

- Zhou, Ting-ting, Zhen-wei Zhang, Jun Liu, Jian-peng Zhang, et Bing-hua Jiao. 2012. « Glycosylation of the Sodium Channel B4 Subunit Is Developmentally Regulated and Involves in Neuritic Degeneration ». *International Journal of Biological Sciences* 8 (5): 630-39. <https://doi.org/10.7150/ijbs.3684>.
- Zhou, Xi, Jining Yang, Min Zhou, Yu Zhang, Yang Liu, Pengfei Hou, Xianglong Zeng, Long Yi, et Mantian Mi. 2019. « Resveratrol attenuates endothelial oxidative injury by inducing autophagy via the activation of transcription factor EB ». *Nutrition & Metabolism* 16 (juillet): 42. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0371-6>.
- Zhu, Guoqi, Yan Lai, Fei Chen, Jun Qian, Hao Lin, Deqiang Yuan, Tongqing Yao, et XueBo Liu. 2022. « Exploration of the Crucial Genes and Molecular Mechanisms Mediating Atherosclerosis and Abnormal Endothelial Shear Stress ». *Disease Markers* 2022: 6306845. <https://doi.org/10.1155/2022/6306845>.
- Zhu, Linlin, Hongfeng Yang, Yuelin Chao, Yue Gu, Junxia Zhang, Feng Wang, Wande Yu, et al. 2021. « Akt Phosphorylation Regulated by IKK ϵ in Response to Low Shear Stress Leads to Endothelial Inflammation via Activating IRF3 ». *Cellular Signalling* 80 (avril): 109900. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109900>.
- Zhu, Wandi, Taylor L. Voelker, Zoltan Varga, Angela R. Schubert, Jeanne M. Nerbonne, et Jonathan R. Silva. 2017. « Mechanisms of noncovalent β subunit regulation of NaV channel gating ». *Journal of General Physiology* 149 (8): 813-31. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711802>.
- Zhu, Yi, Tamara Tchkonja, Tamar Pirtskhalava, Adam C. Gower, Husheng Ding, Nino Giorgadze, Allyson K. Palmer, et al. 2015. « The Achilles' Heel of Senescent Cells: From Transcriptome to Senolytic Drugs ». *Aging Cell* 14 (4): 644-58. <https://doi.org/10.1111/acer.12344>.

ANNEXES

Dans cette partie, sont intégrés l'engagement de non-plagiat ainsi que les publications scientifiques en co-auteur sur des études qui ne sont pas directement liées au travail de thèse.

L'article où mon nom apparaît en premier auteur, a été publié dans le journal *International Journal of Molecular Sciences* en Janvier 2022 et est intitulé « Pharmacological Dissection of the Crosstalk between Nav and Cav Channels in GH3b6 Cells ». Dans cet article, nous avons montré que les cellules GH3b6 issues de glandes antéhypophysaires de rat, expriment majoritairement l'isoforme Nav1.3 à l'origine des courant sodiques dépendant du potentiel enregistrés par patch-clamp. Nous avons également montré par l'utilisation d'une sonde calcique ratiométrique (Fura-2) et de différents activateurs et inhibiteurs pharmacologiques, que l'activation pharmacologique des canaux Nav induit une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺, via l'activation des canaux Cav de type-L révélant la communication existante entre les canaux Nav et les canaux Cav dans les cellules GH3b6.

J'ai participé à cette étude en réalisant les expériences de qPCR, de Western Blot, de patch-clamp manuel, de mesure de la concentration calcique intracellulaire. J'ai également contribué aux analyses des résultats expérimentaux, à leur mise en forme et à l'écriture du manuscrit.

L'article de Joohee Park, publié dans le journal *marine drugs* en 2023 est intitulé « Tetrodotoxin Decreases the Contractility of Mesenteric Arteries, Revealing the Contribution of Voltage-Gated Na⁺ Channels in Vascular Tone Regulation ». Dans cette étude, l'expression des canaux Nav a été caractérisée dans l'aorte et les artères mésentériques de souris, et il a été montré que la tétrodotoxine potentialise la dilatation flux-dépendante dans les artères mésentériques, suggérant que l'inhibition des canaux Nav dans les artères de résistance diminue le tonus vasculaire.

Mon nom apparaît en 4^{ième} auteure dans cet article car j'ai apporté ma contribution dans les expériences de qPCR et de Western Blot.

L'article de Julie Favre publié dans journal *eLife* en 2021 intitulé « Membrane estrogen receptor alpha (ERα) participates in flow-mediated dilation in a ligand-independent manner » a étudié le rôle du récepteur ERα et sa fonction dans la dilatation médiée par le flux dans les artères mésentériques murines. Il a été montré grâce à des modèles murins spécifiques que l'absence du récepteur ERα à la membrane plasmique réduit fortement la dilatation flux-dépendante. Le récepteur ERα a donc un rôle majeur dans la dilatation médiée par le flux, en particulier lorsqu'il est localisé à la membrane plasmique et non lié à son ligand. Ce mécanisme semble intervenir via l'activation du NO et/ou la diminution de la production de ROS.

Mon nom apparaît en 8^{ième} auteure dans cet article car mon implication dans ce travail se résume à l'étude de l'expression protéique de la phosphorylation de eNOS et Akt en réponse au flux par Western Blot.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée **Léa Réthoré**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiante le **04/05/2023**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00





Article

Pharmacological Dissection of the Crosstalk between Na_V and Ca_V Channels in GH3b6 Cells

Léa Réthoré¹, Joohee Park¹, Jérôme Montnach² , Sébastien Nicolas², Joseph Khoury^{1,3} , Elodie Le Seac'h¹, Kamel Mabrouk⁴, Harold De Pomyers⁵, Hélène Tricoire-Leignel¹ , César Mattei¹ , Daniel Henrion¹ , Ziad Fajloun^{3,6} , Michel De Waard^{2,7} , Claire Legendre^{1,*} and Christian Legros^{1,*}

- ¹ INSERM, CNRS, MITOVASC, Equipe CarME, SFR ICAT, University of Angers, 49000 Angers, France; lea.rethore@univ-angers.fr (L.R.); pakjoohee25@gmail.com (J.P.); joseph-0-khoury@hotmail.com (J.K.); elodieleseach@gmail.com (E.L.S.); helene.tricoire-leignel@univ-angers.fr (H.T.-L.); cesar.mattei@univ-angers.fr (C.M.); daniel.henrion@univ-angers.fr (D.H.)
- ² Institut du Thorax, Université de Nantes INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291, 44007 Nantes, France; jerome.montnach@univ-nantes.fr (J.M.); sebastien.nicolas@univ-nantes.fr (S.N.); michel.dewaard@univ-nantes.fr (M.D.W.)
- ³ Department of Biology, Faculty of Science III, Michel Slayman Tripoli Campus, Lebanese University, Tripoli 1352, Lebanon; zfajloun@gmail.com
- ⁴ Institut de Chimie Radicale, UMR CNRS 7273, Aix-Marseille Université, 13013 Marseille, France; kamel.mabrouk@univ-amu.fr
- ⁵ Latoxan Laboratory, 26800 Portes lès Valence, France; harold.pomyers@latoxan.com
- ⁶ Laboratory of Applied Biotechnology (LBA3B), Azm Centre for Research in Biotechnology and Its Application, EDST, Lebanese University, Tripoli 1300, Lebanon
- ⁷ Laboratory of Excellence Ion Channels, Science & Therapeutics, 59650 Villeneuve d'Ascq, France
- * Correspondence: claire.legendre@univ-angers.fr (C.L.); christian.legros@univ-angers.fr (C.L.)
- † These authors jointly supervised.



Citation: Réthoré, L.; Park, J.; Montnach, J.; Nicolas, S.; Khoury, J.; Le Seac'h, E.; Mabrouk, K.; De Pomyers, H.; Tricoire-Leignel, H.; Mattei, C.; et al. Pharmacological Dissection of the Crosstalk between Na_V and Ca_V Channels in GH3b6 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 827. <https://doi.org/10.3390/ijms23020827>

Academic Editor: Guido R.M.M. Haenen

Received: 22 December 2021

Accepted: 9 January 2022

Published: 13 January 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: Thanks to the crosstalk between Na^+ and Ca^{2+} channels, Na^+ and Ca^{2+} homeostasis interplay in so-called excitable cells enables the generation of action potential in response to electrical stimulation. Here, we investigated the impact of persistent activation of voltage-gated Na^+ (Na_V) channels by neurotoxins, such as veratridine (VTD), on intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in a model of excitable cells, the rat pituitary GH3b6 cells, in order to identify the molecular actors involved in Na^+ - Ca^{2+} homeostasis crosstalk. By combining RT-qPCR, immunoblotting, immunocytochemistry, and patch-clamp techniques, we showed that GH3b6 cells predominantly express the $\text{Na}_V1.3$ channel subtype, which likely endorses their voltage-activated Na^+ currents. Notably, these Na^+ currents were blocked by ICA-121431 and activated by the β -scorpion toxin Tf2, two selective $\text{Na}_V1.3$ channel ligands. Using Fura-2, we showed that VTD induced a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. This effect was suppressed by the selective Na_V channel blocker tetrodotoxin, as well by the selective L-type Ca_V channel (LTCC) blocker nifedipine. We also evidenced that clobenafente, a Na_V channel blocker, abolished VTD-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation, while it had no effects on LTCC. Altogether, our findings highlight a crosstalk between Na_V and LTCC in GH3b6 cells, providing a new insight into the mode of action of neurotoxins.

Keywords: GH3b6 cells; voltage-gated sodium channel; L-type voltage-gated calcium channel; veratridine; patch-clamp; Fura-2

1. Introduction

Voltage-gated Na^+ (Na_V) channels are key molecular components involved in the electrical-excitability properties of the so-called excitable cells, such as neurons and myocytes (i.e., they can develop action potentials in response to electrical stimulation) [1]. Na_V channels constitute validated pharmacological molecular targets for a large panel of clinically used drugs, such as anti-arrhythmics, anti-convulsants, anesthetics, and analgesics [2]. They are also targeted by various natural toxins from animals, plants, and

microorganisms [2,3]. In mammalian genomes, nine genes (*scn1a*, *2a*, *3a*, *4a*, *5a*, and *scn8a*, *9a*, *10a*, *11a*) encode as many Na_V channel α -subunit isoforms ($\text{Na}_V1.1$, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, and 1.9) [4,5]. These genes share high sequence identities and pharmacological properties among mammalian species, in particular in rodents and humans [5]. Na_V channels are pharmacologically classified according to their sensitivity to tetrodotoxin (TTX). Six isoforms are highly sensitive (nanomolar range) to TTX (TTX-S): $\text{Na}_V1.1$, 1.2, 1.3, 1.4, $\text{Na}_V1.6$, and $\text{Na}_V1.7$ and reciprocally three isoforms are much less sensitive and thus called resistant to TTX (TTX-R): $\text{Na}_V1.5$, 1.8, and $\text{Na}_V1.9$ [2,3]. These α -subunits are complex pore-forming and glycosylated membrane proteins containing all molecular determinants needed to form a rapid inactivating voltage-gated channel, highly selective to Na^+ [5]. They are associated with one or two auxiliary β -subunits ($\text{Na}_V\beta1$ –4), encoded by four different genes. These β -subunits play a chaperon, gating, and regulatory role for Na_V channels and belong to the cell adhesion molecule family [6].

The pharmacology of Na_V channels is particularly vast and complex. At least seven molecular binding sites (Sites 1–7) have been described for various neurotoxins, pyrethroids, local anesthetics, antiarrhythmics, and antiepileptics [2,7,8]. All clinically used drugs block Na_V channels through binding to the so-called “local anesthetic receptor site”, within the pore. TTX and saxitoxin, two natural alkaloids, are pore-binding blockers, defining Site 1. Various neurotoxins act as activators, such as (i) veratridine (VTD) and batrachotoxin (BTX) through binding to Site 2; (ii) animal toxins (from scorpion, snake, wasp and sea anemone), which interact with Sites 3 and 4; (iii) polycyclic toxins including brevetoxins (with PbTx-2) and ciguatoxins, which interact with Site 5; (iv) δ -conotoxins by binding to Site 6; and (v) pyrethroid insecticides with deltamethrin, defining Site 7 [2,7,8].

Na_V channels are mainly expressed in excitable cells, such as neurons of the central nervous system ($\text{Na}_V1.1$ –3 and $\text{Na}_V1.6$) and of the peripheral nervous system ($\text{Na}_V1.6$, 1.7, 1.8, 1.9 and possibly 1.1), myocytes ($\text{Na}_V1.4$), and cardiomyocytes ($\text{Na}_V1.5$) [2]. In neurons [9–12], synaptosomes [13], and neuroblastoma cells [14–17], Na_V channels could be activated by neurotoxins, such as VTD or brevetoxin (PbTx), leading to a large intracellular Ca^{2+} overload, as a consequence of the activation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger reverse mode (NCX), or/and NMDA receptor or/and voltage-gated Ca^{2+} channels (Ca_V), including L-type Ca_V (LTCC). Besides the neurotoxicity linked to Ca^{2+} overload, these mechanisms reveal a close relationship between Na^+ and Ca^{2+} homeostasis, which is crucial for the regulation of membrane excitability [11,18,19].

Na_V channels are also expressed in endocrine networks, such as chromaffin cells, pancreatic β cells, and somatotrophic cells in the pituitary gland, which also exhibit membrane excitability properties playing a key role in hormone release [18,20,21]. Among endocrine cells, the GH3 pituitary cell line and subclones, such as GH4C1 and GH3b6 cells, exhibit spontaneous action potentials and intracellular Ca^{2+} oscillations that can be modified by altering Na_V channel activity [22,23]. Interestingly, these characteristics have been already used to test the effects of new toxins and drugs targeting Na_V channels using electrophysiology [24–26] but never for a cell-based assay using fluorescent probe.

Here, we hypothesized that activation by neurotoxins of Na_V channels endogenously expressed in GH3b6 cells would lead to an increase of the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), which could be measured by a Ca^{2+} fluorescent probe. By combining RT-qPCR, immunoblotting and immunolocalization experiments, we showed for the first time that GH3b6 cells mainly express the $\text{Na}_V1.3$ channel subtype and the $\text{Na}_V\beta1$ subunit. The gating and pharmacological properties of Na^+ currents elicited by these cells indeed correspond to $\text{Na}_V1.3$ channels. We demonstrated that the pharmacological activation of Na_V channels induces $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation mediated by LTCC. Taken together, our data highlight a crosstalk between Ca^{2+} and Na^+ homeostasis in GH3b6 cells and particularly between $\text{Na}_V1.3$ and LTCC.

2. Results

2.1. GH3b6 Cells Mainly Express the Nav1.3 Channel Subtype

We first characterized the expression of Nav channels in GH3b6 cells by combining RT-qPCR, immunoblotting, and immunolocalization (Figure 1). *Scn2a*, *scn3a*, and *scn8a* cDNAs encoding three TTX-S Nav channels (Nav1.2, Nav1.3, and Nav1.6, respectively) were amplified (Figure 1A). *Scn1a* and *scn4a* cDNAs encoding Nav1.1 and Nav1.4 were also detected but at very low levels (Ct-values > 32, with 10 ng of cDNA), and thus their expression was disregarded. Absolute quantification of *scn2a*, *scn3a*, and *scn8a* mRNA copies showed that the transcription level of *scn3a* was about 13.7-fold and 1.6-fold higher than those of *scn2a* and *scn8a*, respectively ($p < 0.0001$, $n = 3$; Figure 1B). RT-qPCR experiments allowed the amplifications of *scn1b* and *scn3b* cDNAs encoding Nav β 1 and Nav β 3 subunits while *scn2b* and *scn4b* cDNAs were not detected (Figure 1A). The number of *scn1b* mRNA copies was 8.9-fold higher than that of *scn3b* ($p < 0.0001$, $n = 3$, Figure 1B).

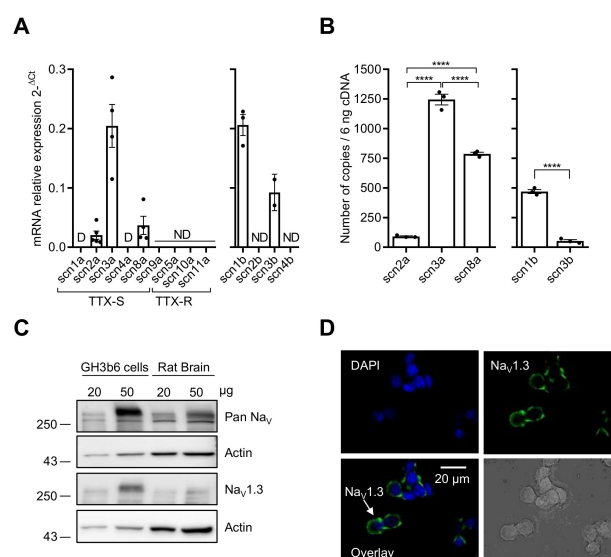


Figure 1. Nav channel expression in GH3b6 cells. (A) The mRNA expression levels of all α and β subunits were first determined by relative RT-qPCR. (B) RT-qPCR with absolute quantification for the genes, which were detected by relative RT-qPCR. One-way ANOVA (**** $p < 0.0001$) followed by Tukey post-hoc multiple comparison test was performed. The data are mean $\pm$ SEM. D: Disregarded (Ct > 32); ND: Not Detected. (C) Western blot analysis of Nav channel expression. Immunoblotting was performed using pan-Nav and Nav1.3 channels antibodies with 20 and 50 μ g of protein extracts from GH3b6 cells and rat brain, after separation on 8% SDS-PAGE. Actin was the loading control. (D) Immunocytochemical localization of Nav1.3 channels in GH3b6 cells. Fluorescence labeling (green) using Alexa Fluor 488 anti-mouse secondary antibody allowed the detection of Nav1.3 channels at the plasma membrane. Nuclei (blue) were stained with DAPI. Original magnification $\times 60$.

Since the detection of mRNAs encoding these Nav channel subtypes does not mandatorily reflect their expression at the protein level, we performed Western blot and immunocytochemistry analysis. The immunoblots of GH3b6 cell protein extracts showed an intense immunoreactivity for a band with an apparent molecular weight of ~ 250 kDa with Pan-Nav and Nav1.3 antibodies (Figure 1C). While Nav1.2 were immunodetected using protein extracts from rat brain, the Western blot with GH3b6 cell proteins did not show Nav1.2 channels at the protein level (Supplementary Figure S1). In addition, the antibodies against Nav1.6 allowed strong immunofluorescent labeling with neurons but not with GH3b6 cells (Supplementary Figure S2). The expression of the Nav1.3 channel at the plasma membrane was confirmed by fluorescent labeling with a specific monoclonal antibody (Figure 1D). Altogether, these findings showed that the Nav1.3 channel is the main Nav channel subtype expressed at the protein level in GH3b6 cells.

Thus, it is likely that the $\text{Na}_v1.3$ channel subtype endorses the genesis of voltage-activated Na^+ current in GH3b6 cells. To address this hypothesis, we characterized the Na^+ current (I_{Na}) in GH3b6 cells by patch-clamp electrophysiology. As expected, depolarizing pulses triggered inward currents, which were blocked by a low concentration of TTX (300 nM, Figure 2A), in accordance with the presence of TTX-S Na_v channels as previously described in GH3 cells [27,28]. Current–voltage relationships showed that I_{Na} activated between -45 and -40 mV, gradually increased to a maximum current density of -82.87 ± 12.17 pA/pF at -5 mV, and reversed at $+58.20 \pm 5.14$ mV (Figure 2A). We also observed persistent currents at the end of the depolarization pulse (Figure 2A). The voltage dependence of the activation and steady-state inactivation of I_{Na} were assessed using specific voltage-clamp protocols. The normalized conductance or peak current amplitudes were plotted versus voltage and fitted to the Boltzmann equation, yielding a $V_{1/2}$ of -12.23 ± 1.34 mV ($n = 11$) for activation, and a $V_{1/2}$ of -53.58 ± 1.66 ($n = 16$) for inactivation (Figure 2B, Table 1). The recovery from inactivation was also examined and the analysis of the data showed that the recovery of I_{Na} is mono-exponential with a time constant of 9.38 ms. These data were in agreement with those previously reported [27,29]. Finally, to confirm that I_{Na} in GH3b6 cells are endorsed by $\text{Na}_v1.3$ channels, we tested slow ramp depolarization stimulation (Figure 2D). Our data showed that GH3b6 cells indeed produce a ramp-triggered inward current, which is the hallmark of the $\text{Na}_v1.3$ channel [30].

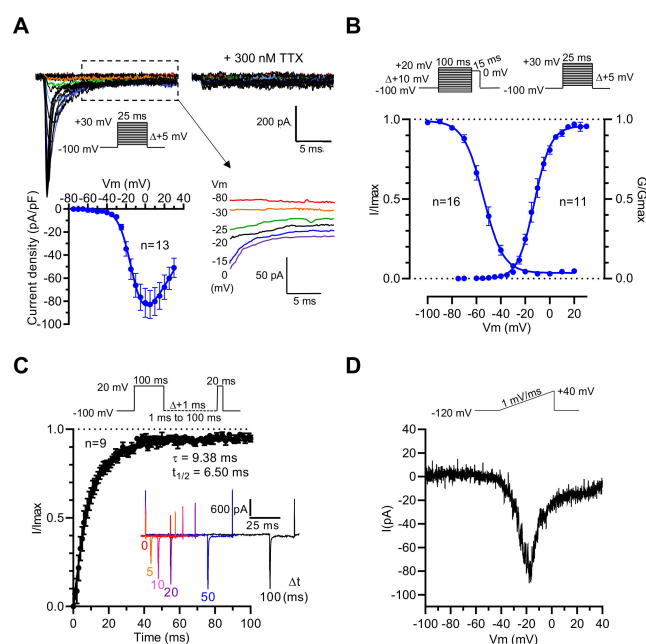


Figure 2. Electrophysiological characterization of I_{Na} in GH3b6 cells by manual patch-clamp recording. (A) Representative family of Na^+ current traces recorded in GH3b6 cells before and after the application of 300 nM TTX. The currents were elicited by stepping the membrane potential (V_m) as shown in inset. I–V relationship curve obtained by plotting the mean peak current density to V_m ($n = 13$). Data were fitted to the equation of Stuehmer with $E_{\text{Na}} = 58.2 \pm 5.1$ mV, $g = 1.92 \pm 1.34$ nS, $V_{1/2} = -10.39 \pm 0.97$ mV, and $k = 7.06 \pm 0.33$ ($n = 13$). Selected traces illustrating persistent currents are shown in an enlarged view. (B) The voltage dependences of activation (circles) and inactivation (close circles). Depolarization protocols are shown in insets. Fitting was done with the Boltzmann equation as described in the “Material and Methods” section. (C) The graph shows the kinetic of recovery from inactivation at -100 mV. The data (mean $\pm$ SEM) were best fitted with a monoexponential equation. To illustrate the rate of recovery from inactivation, selected traces are shown in the inset. (D) Example of the ramp response. The current evoked during increasing the voltage ramp from -120 mV to $+40$ mV during 160 ms is shown.

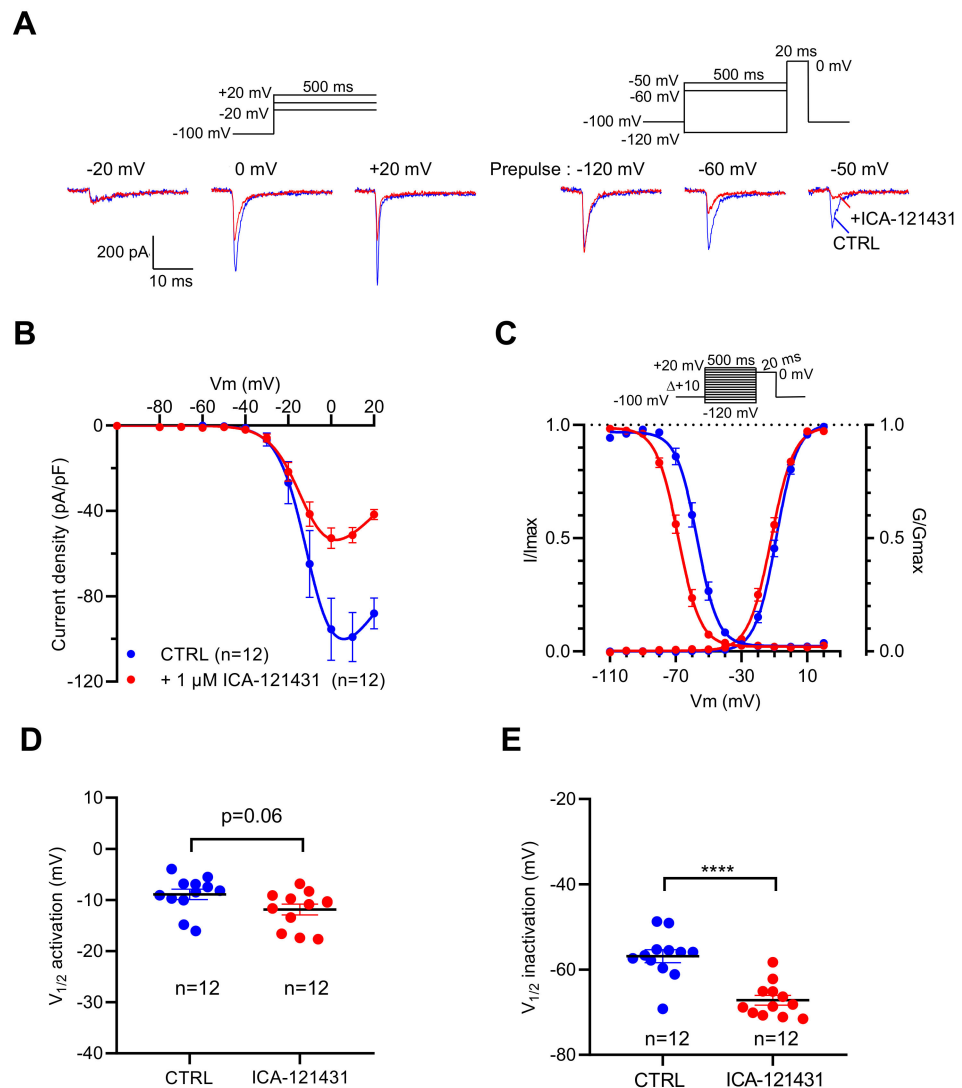


Figure 3. Effects of ICA-121431, a selective inhibitor of Nav1.3 channels, on I_{Na} recorded in GH3b6 cells by manual patch-clamp. (**A,B**) To illustrate the effects of ICA-121431, examples of superimposed I_{Na} elicited by 500 ms depolarizing pulses (at -20 , 0 , and $+20$ mV) and examples of superimposed I_{Na} elicited by depolarizing pulse at 0 mV immediately after a 500 ms prepulse (-120 , -60 , and -50 mV) are shown. The control traces are in blue (CTRL) and red traces correspond to I_{Na} after ICA-121431 application (1μ M). (**B**) Current–voltage relationships and (**C**) activation/inactivation curves of I_{Na} recorded before (blue circles) and after 1μ M ICA-121431 (red circles). Comparison of $V_{1/2}$ activation (**D**) and inactivation (**E**) in the absence (CTRL) and in the presence of 1μ M Tf2. Statistical analysis was performed using the two-tailed unpaired t -test, **** $p < 0.0001$. Data represent the mean $\pm$ SEM.

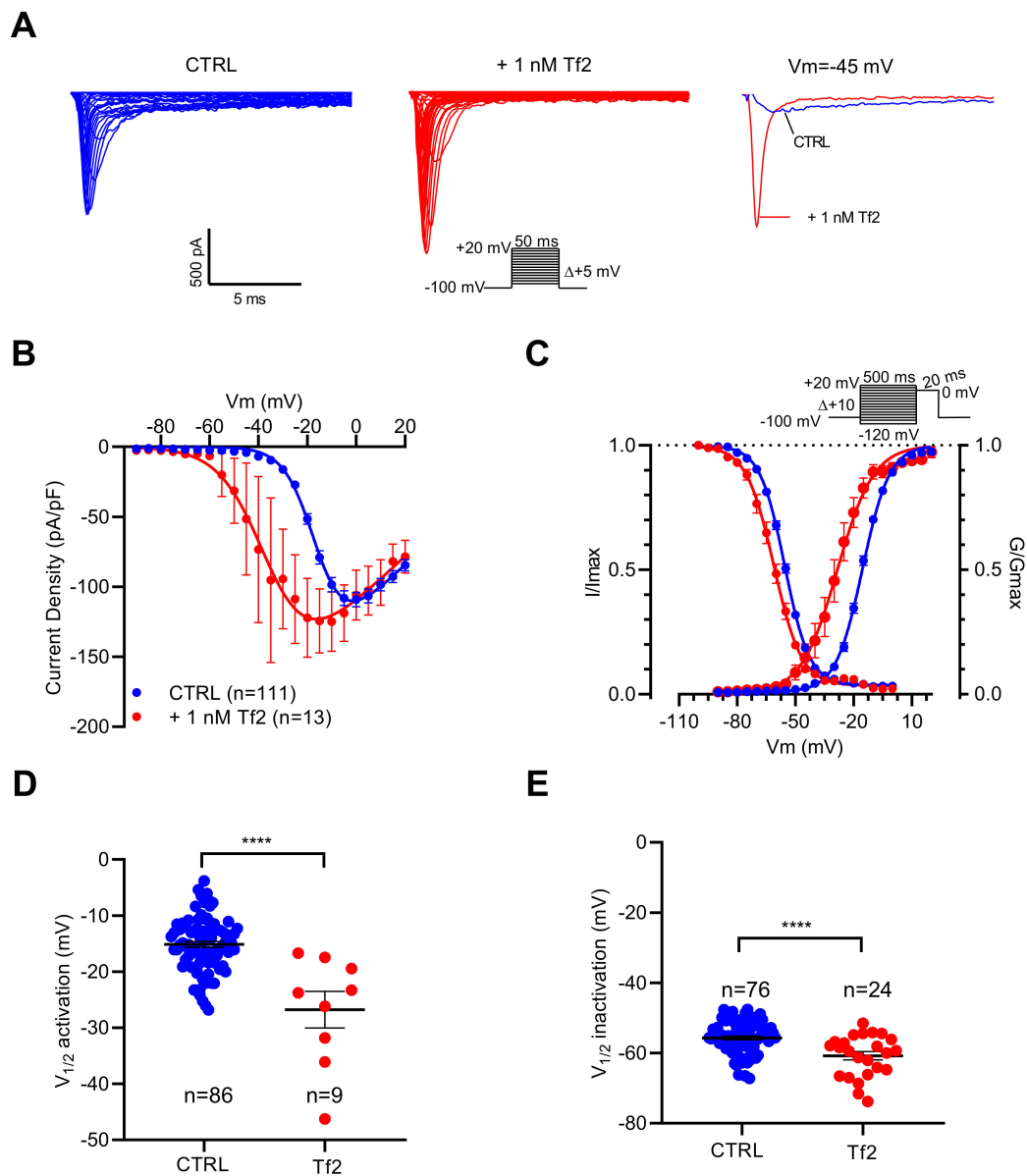


Figure 4. Effects of Tf2, a selective β -scorpion toxin of $Na_v1.3$ channels, on I_{Na} recorded in GH3b6 cells by automated patch-clamp. **(A)** Representative examples of I_{Na} elicited by 50 ms depolarization steps (protocol inset), in the absence and presence of 1 nM Tf2. To illustrate the strong effect of 1 nM Tf2, superimposed I_{Na} traces at -45 mV are shown. **(B)** Current–voltage relationships **(C)** and activation/inactivation curves of I_{Na} recorded before (blue circles) and after 1 nM Tf2 (red circles). Comparison of $V_{1/2}$ activation **(D)** and inactivation **(E)** in the absence (CTRL) and in the presence of 1 nM Tf2. Statistical analysis was performed using the two-tailed unpaired t -test, **** $p < 0.0001$. Data represent the mean $\pm$ SEM.

Table 1. Biophysical parameters of voltage-gated Na⁺ currents recorded in GH3b6 cells.

Condition	Voltage-Dependency of Activation		Voltage-Dependency of Inactivation	
	V _{1/2} (mV)	k (mV)	V _{1/2} (mV)	k (mV)
Control ²	−12.23 ± 1.34 n = 11	6.06 ± 0.20	−53.58 ± 1.66 n = 16	5.26 ± 0.17
Control ³	−8.92 ± 1.01 n = 12	6.06 ± 0.20	−56.85 ± 1.54 n = 12	5.26 ± 0.17
+ 1 μM ICA-121431 ³	−11.86 ± 1.05 n = 12 (p = 0.06)	6.67 ± 0.36 n = 12 (p < 0.05)	−67.19 ± 1.15 n = 12 (p < 0.0001)	5.18 ± 0.18 (p = 0.72)
Control ⁴	−15.07 ± 0.51 n = 86	5.78 ± 0.14	−55.69 ± 0.53 n = 76	5.86 ± 0.14
+1 nM Tf2 ⁴	−26.78 ± 3.24 n = 9 (p < 0.0001)	5.83 ± 0.52 (p = 0.90)	−60.77 ± 1.20 n = 24 (p < 0.0001)	5.87 ± 0.32 ns, p = 0.97

², ³ and ⁴ curve fitting parameters of Figures 2–4, respectively.

To explore the contribution of the Nav1.3 channel subtype in the genesis of I_{Na} in this cell line, we used ICA-121431 [31–33] and the β-scorpion toxin Tf2 [32,34], two selective ligands of this Nav channel subtype. At 1 μM, ICA-121431 reduced by 50% the amplitude of I_{Na} when they were elicited by depolarizing pulse from −100 mV, while it almost abolished I_{Na} evoked by the depolarizing pulse from −50 mV (Figure 3A). ICA-121431 reduced the I_{Na} amplitude in a non-voltage-dependent manner (Figure 3B), and thus did not alter the voltage dependency of activation (p = 0.06) (Figure 3C,D). However, ICA-121431 induced a negative shift of 10.3 mV (p < 0.0001) of the voltage dependence of inactivation (Figure 3C,E). These data are in agreement with previous data indicating that ICA-121431 preferentially interacts with inactivated Nav1.3 channels [31–33]. At a very low concentration (1 nM), Tf2 strongly altered the activation of I_{Na}.

As illustrated in Figure 4A, depolarizing pulses elicited I_{Na} with higher amplitudes in the presence of the Tf2 compared to the control. The current–voltage relationships showed that Nav channels opened at potentials more negative in the presence than in the absence of Tf2 (Figure 4B). The V_{1/2} of activation was positively shifted by 11.7 mV (p < 0.0001) (Figure 4C,D). In addition, Tf2 induced a negative shift of V_{1/2} of inactivation by 5.1 mV (p < 0.0001) (Figure 4C,E). In conclusion, I_{Na} is sensitive to both ICA-121431 and Tf2, indicating that it is promoted by the Nav1.3 channel subtype.

2.2. Activation of Nav Channels by Various Neurotoxins Triggers the Increase of Intracellular Ca²⁺ in GH3b6 Cells

To explore the impact of Nav channel activation by neurotoxins on [Ca²⁺]_i, we first determined whether the two most often used Nav neurotoxins, VTD and BTX, could induce [Ca²⁺]_i elevation in GH3b6 cells. Using the Ca²⁺ fluorescent probe, Fura 2-AM, we showed that both VTD and BTX efficiently increased Fura-2 fluorescence, which indicated [Ca²⁺]_i elevation (Figure 5A,D). Thus, both toxins were able to induce [Ca²⁺]_i elevation with different kinetics and in a TTX-sensitive manner (Figure 5A,D). Indeed, the BTX-induced Ca²⁺ response was slow and reached a plateau after 250 s of injection, while in comparison, VTD induced a transient increases in [Ca²⁺]_i, which peaked at ~1 min. The VTD and BTX-induced Ca²⁺ responses were concentration dependent and best fitted by the Hill–Langmuir equation for a bimolecular reaction (Figure 5B,E). As expected, VTD exhibited a lower potency, with an EC₅₀ of 5.39 ± 2.3 μM (Figure 5B), compared to BTX, with an EC₅₀ of 0.66 ± 0.18 μM (Figure 4E). The TTX-induced inhibition of VTD- and BTX-evoked Ca²⁺ responses was fitted by a single site bimolecular equation, yielding similar IC₅₀ values in the nanomolar range in each case (IC₅₀ of 15.63 ± 0.72 nM with VTD and IC₅₀ of 21.13 ± 3.32 nM with BTX), in agreement with the blockade of TTX-S Nav1.3 channels (Figure 5C,F).

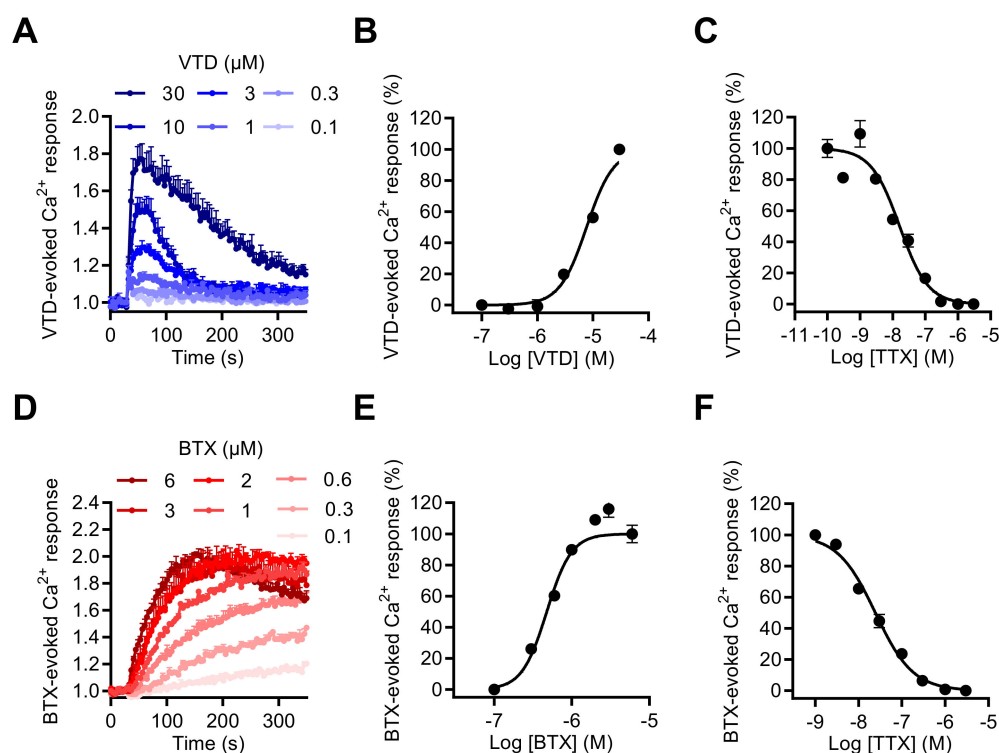


Figure 5. Effects of VTD and BTX, two selective Na_V channel activators, on the intracellular Ca^{2+} level in GH3b6 cells. (A,D) Representative kinetics of Fura-2 fluorescence in GH3b6 cells treated with increasing concentrations of VTD or BTX. The increase of the Fura-2 fluorescence emission ratio reflects $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation. (B,E) The Ca^{2+} responses induced by VTD and BTX are concentration dependent. In both cases, the concentration–response relationships were analyzed using the Hill–Langmuir equation with variable slope. The values of EC_{50} and the Hill coefficient were respectively $5.39 \pm 2.3 \mu\text{M}$ and 2.00 ± 0.21 with VTD ($R^2 = 0.98$) and $0.66 \pm 0.18 \mu\text{M}$, 2.88 ± 0.15 with BTX ($R^2 = 0.95$). (C,F) The Na_V channels involved in Ca^{2+} responses induced by VTD and BTX are TTX-S. TTX inhibits in a concentration-dependent manner the Ca^{2+} responses elicited by 10 μM of VTD (C) or by 1 μM of BTX (F) with similar IC_{50} ($15.63 \pm 0.72 \text{ nM}$, $21.13 \pm 3.32 \text{ nM}$, respectively) and Hill coefficients (1.21 ± 0.21 , $R^2 = 0.97$ and 0.95 ± 0.04 , $R^2 = 0.99$ for VTD and BTX, respectively). Data represent the mean $\pm$ SEM ($n = 3$ wells) and are representative of at least two independent experiments.

To investigate the involvement of the $\text{Na}_V1.3$ subtype in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by Na_V channel neurotoxins in GH3b6 cells, we used, as in the patch-clamp recordings of I_{Na} , the $\text{Na}_V1.3$ -selective scorpion toxin, Tf2. This toxin also induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in our cell model and the Tf2-induced Ca^{2+} responses were concentration dependent with an EC_{50} value of $17.51 \pm 1.4 \text{ nM}$ and best fitted by the Hill–Langmuir equation for a bimolecular reaction with a Hill slope of 1.38 (Figure 6A,B). The TTX inhibition of Tf2-evoked Ca^{2+} responses was fitted by a single site bimolecular equation, giving an IC_{50} value of $7.9 \pm 2.1 \text{ nM}$ and a Hill coefficient of 1.31 ± 0.14 , in agreement with the blockade of the TTX-S $\text{Na}_V1.3$ channel subtype (Figure 6C).

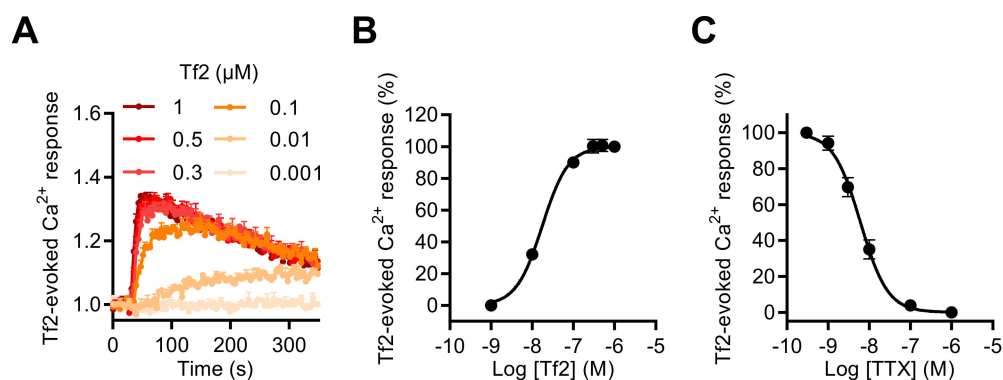


Figure 6. Effect of Tf2, a selective β -scorpion toxin of $\text{Na}_V1.3$, on the intracellular Ca^{2+} level in GH3b6 cells. (A) Representative kinetics of Fura-2 fluorescence emission in GH3b6 cells treated with increasing concentrations of Tf2. (B) The Ca^{2+} responses induced by Tf2 are concentration dependent. The concentration–response relationships were analyzed using the Hill–Langmuir equation with variable slope. The values of EC_{50} and the Hill coefficient were 17.51 ± 1.4 nM and 1.378 ($R^2 = 0.99$). (C) TTX inhibits in a concentration-dependent manner the Ca^{2+} responses elicited by 0.5 μM of Tf2 with an IC_{50} value of 7.9 ± 2.1 nM and a Hill coefficient of 1.31 ± 0.135 , $R^2 = 0.94$. The data represent the mean $\pm$ SEM ($n = 3$ wells) and are representative of at least two independent experiments.

Finally, to explore if other neurotoxins, which activate Na_V channels through binding to other pharmacological sites, could also enhance $[\text{Ca}^{2+}]_i$, we tested the wasp venom peptide β -PMTX (Site 3) [31,35,36], the marine toxin PbTx-2 (Site 5), and the pyrethroid deltamethrin (Site 7). These three molecules induced intracellular Ca^{2+} responses with various kinetic profiles (Figure 7). At 100 μM , β -PMTX triggered a rapid and transient Ca^{2+} elevation, in a concentration-dependent manner, as observed with VTD (Figure 7A). In comparison, PbTx-2 (3 μM) provoked a rapid response followed by a slower decrease of the Ca^{2+} signal (Figure 7B). In contrast, deltamethrin (10 μM) caused Ca^{2+} responses with a peak, followed by a plateau (Figure 7C). Ca^{2+} responses induced by these three toxins were fully blocked by TTX at 1 μM .

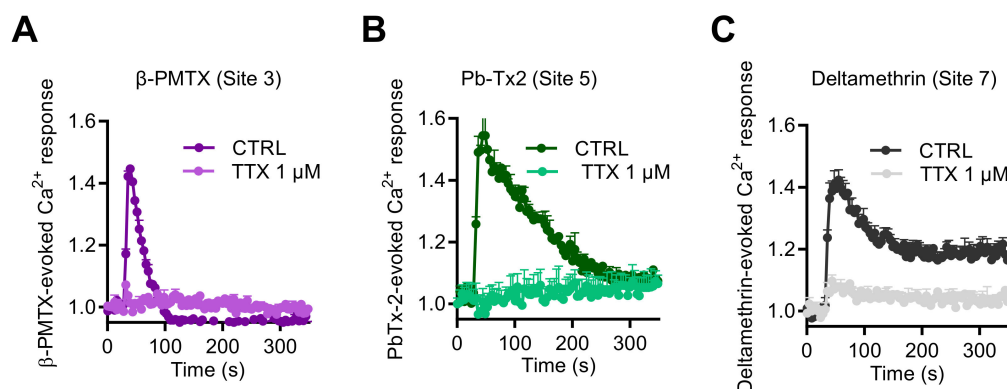


Figure 7. Effects of Na_V channel activators, which bind to Site 3, Site 5, and Site 7, on intracellular Ca^{2+} in GH3b6 cells. Representative Fura-2 fluorescence kinetics traces were obtained after injection of 100 μM β -PMTX (A), 3 μM of Pb-Tx2 (B), or 10 μM of deltamethrin (C). All of them were fully abolished by TTX use at 1 μM . Data represent the mean $\pm$ SEM ($n = 3$ wells) from at least two independent experiments.

2.3. Na_V Channel Activation by Neurotoxins Triggers Ca^{2+} Influx Mediated by L-Type Ca_V Channels (LTCC)

Since it is well-known that in neurons, persistent Na^+ entry induced by VTD is associated with $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation mediated by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger NCX, and/or LTCC,

and/or N-type channels [11,13,15,17,37], we challenged whether NCX and Ca_V channels contribute to VTD-induced Ca^{2+} responses. To identify the source of Ca^{2+} mobilized by VTD, Fura-2 experiments were performed in Ca^{2+} -free medium. In this condition, the VTD-evoked Ca^{2+} response was completely suppressed (Supplementary Figure S3). Moreover, the depletion of Ca^{2+} stores by with thapsigargin (2 μM , 10 min prior to injection of VTD) did not modify the VTD-induced Ca^{2+} -response (Supplementary Figure S3). Thus, Na_V channel activation by VTD did not involve intracellular Ca^{2+} stores and leads to Ca^{2+} entry mediated by transport through the plasma membrane by NCX and/or Ca_V channels.

The NCX gene expression profile by RT-qPCR revealed that NCX1–3 subtype transcripts were expressed in GH3b6 cells with the following ranking order: *slc8a3* > *slc8a2* > *slc8a1* (Figure 8A). Since KB-R7943 inhibited the Na^+ current [38], we used the two other NCX inhibitors available: the selective NCX inhibitor SN-6 [39] with IC_{50} values of 2.9, 16, and 8.6 μM for NCX1, NCX2, and NCX3, respectively, and the selective NCX1 and NCX2 inhibitor SEA-0400 [40] with IC_{50} values of 0.056 and 0.98 μM , respectively. Both SN-6 and SEA-0400 did not significantly inhibit the VTD-induced Ca^{2+} responses, at a concentration of 10 μM (Figure 8B,C), thus excluding the implication of NCX. Next, we characterized the gene expression profiles of Ca_V channels by RT-qPCR in GH3b6 cells. The cDNAs of *cacna1c* and *cacna1d*, encoding two LTCC ($\text{Ca}_V1.2$ and $\text{Ca}_V1.3$), *cacna1a* encoding a P/Q type Ca_V channel ($\text{Ca}_V2.1$), *cacna1g* and *cacna1i*, encoding two t-type Ca_V channels ($\text{Ca}_V3.1$ and $\text{Ca}_V3.3$) (Figure 8D), were detected at significant expression levels. The highest expression levels of transcription were found for *cacna1c*, *cacna1d*, and *cacna1i*, indicating that both L-type and T-type Ca_V channels represent the main Ca_V channel subtypes expressed in GH3b6 cells, as previously described in GH3 or GH3b6 cells [41,42]. The VTD-evoked Ca^{2+} responses were totally suppressed either by Cd^{2+} (at ~ 30 μM) or nifedipine (at ~ 10 μM) (Figure 8E). Both compounds induced a concentration-dependent inhibition of VTD-evoked Ca^{2+} responses, which were best fitted with the Langmuir–Hill equation, with IC_{50} values of 1.04 ± 0.65 μM for nifedipine and 9.76 ± 1.74 μM for Cd^{2+} (Figure 8E). Taken together, our data shown that Na_V channel activation by neurotoxins that triggers Ca^{2+} influx is fully mediated by LTCC.

2.4. GH3b6 Cell-Based Assay Using Fura-2 Offers a Convenient Model to Characterize Na_V Channel Modulators

In order to validate our model as a suitable assay for Na_V channel pharmacological studies, we used a novel selective blocker of Site 2 of Na_V channels BIII 890 CL (crobenetine) [43–45] together with BI 55CL, which is a structurally close analogue of BIII 890 CL but with more than 1000-fold lower potency for Na_V channels. When co-injected with VTD (10 μM), 1 or 10 μM of BIII 890 CL blocked the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with a percentage of inhibition of $34.9\% \pm 0.9\%$ and $74.2\% \pm 4.2\%$, respectively, whereas BI 55CL did not significantly modify the Ca^{2+} entry induced by VTD (Figure 9A). The BIII 890 CL inhibition of VTD-evoked Ca^{2+} responses could be fitted by a single site bimolecular equation, giving an IC_{50} value of 1.47 ± 0.18 μM (Figure 9B). Importantly, Ca^{2+} responses induced by Bay K8644, a specific LTCC activator, were not modified by BIII 890 CL nor BI 55CL whereas 10 μM of nifedipine totally blocked the Bay K8644-evoked Ca^{2+} entry in GH3b6 cells (Figure 9C), demonstrating the selectivity of BIII 890 CL toward Na_V channels and the specificity of the Ca^{2+} monitoring when Na_V channels are activated by selective neurotoxin. Taken together, the crosstalk between Na_V and Ca_V channels in GH3b6 cells appears as a new strategy to modulate Na_V channels.

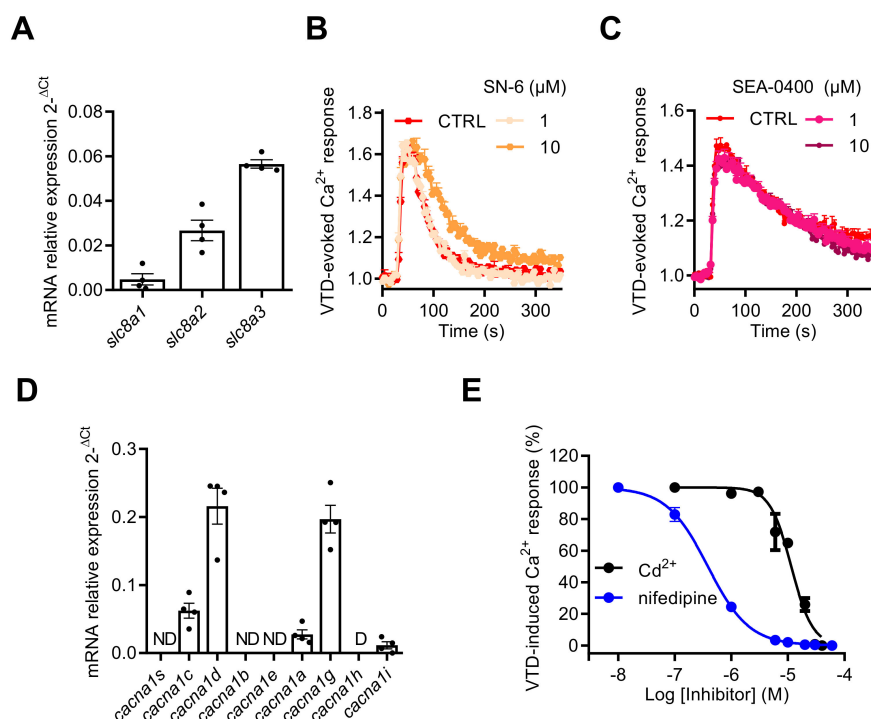


Figure 8. Effects of NCX and Ca_V channel inhibitors on VTD-evoked Ca^{2+} responses in GH3b6 cells. (A) The expression profile of NCX1–3 genes (*slc8a1–3*) in GH3b6 cells was characterized by relative RT-qPCR. The data are mean of mRNA relative expression $\pm$ SEM. Effects of SN-6 (B) and SEA0400 (C), two specific inhibitors of NCX, on VTD-induced Ca^{2+} responses in GH3b6 cells. VTD was used at 10 μM . (D) The expression profile of Ca_V channel genes (*cacna1a–e*, *g–i*, and *s*) in GH3b6 cells was characterized by relative RT-qPCR. The data are mean $\pm$ SEM. D: Disregarded ($\text{Ct} > 32$); ND: Not Detected. (E) Concentration–inhibition relationship of VTD-induced Ca^{2+} responses by nifedipine, a specific blocker of L-type Ca_V channels ($\text{IC}_{50} = 1.04 \pm 0.65 \mu\text{M}$, Hill slope = 1.30 ± 0.11 , $R^2 = 0.98$) and Cd^{2+} , a blocker of Ca_V channels ($\text{IC}_{50} = 9.76 \pm 1.74 \mu\text{M}$, Hill slope = 2.35 ± 0.03 , $R^2 = 0.97$) with VTD used at 10 μM . Data represent the mean $\pm$ SEM ($n = 3$) from two independent experiments.

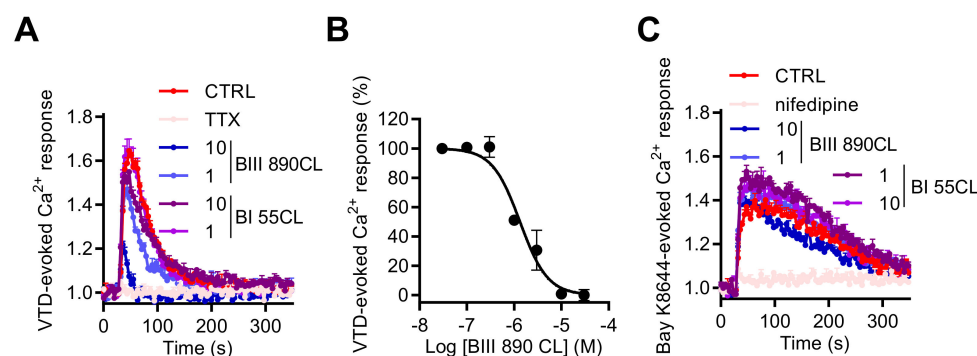


Figure 9. Effects of BIII 890CL on Ca^{2+} responses triggered by VTD or Bay K8644. (A) Representative Fura-2 fluorescence kinetic traces illustrating Ca^{2+} response induced by 10 μM of VTD, alone or co-injected with 1 μM of TTX or with 10 or 1 μM of BIII 890 CL or with BI 55CL (10 and 1 μM), used as a negative control. (B) Concentration–inhibition relationship of VTD-induced Ca^{2+} responses by BIII 890CL, ($\text{IC}_{50} = 1.47 \pm 0.18 \mu\text{M}$, Hill slope = 1.26 ± 0.23 , $R^2 = 0.94$). (C) Representative Fura-2 fluorescence kinetics traces illustrating Ca^{2+} response induced by 1 μM of Bay K8644, a specific L-type Ca_V channel activator, alone or co-injected with 10 μM of nifedipine or with 10 or 1 μM of BIII 890 CL or with BI 55CL (10 and 1 μM), used as a negative control. Data represent the mean $\pm$ SEM ($n = 3$) of recordings of two independent experiments.

3. Discussion

All pituitary cells, including GH3 cells and its subclone GH3b6, exhibit membrane excitability and signaling pathways similar to those observed in neurons, because they endogenously express Na_V and Ca_V channels [22]. Here, we showed that the $\text{Na}_V1.3$ channel is the predominant subtype expressed at the plasma membrane and endorses the voltage-gated I_{Na} in GH3b6 cells. Various neurotoxins or activators of Na_V channels (VTD, BTX, β -PMTX, PbTx2, and deltamethrin) and notably Tf2, a selective neurotoxin of the $\text{Na}_V1.3$ channel subtype, activate Na_V channels in GH3b6 cells, which leads in turn to the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. We determined that this $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation is due to plasmalemmal Ca^{2+} entry mediated by LTCC, highlighting a crosstalk between Na_V channels and Ca_V channels in GH3b6 cells.

GH3b6 cells express TTX-S Na_V channel subtype transcripts (*scn2a*, *scn3a*, *scn8a*) commonly expressed in neurons of the central nervous system. It appears that *scn3a* transcript is the most abundant and only the $\text{Na}_V1.3$ channel subtype was detected at the protein level and at the plasma membrane in these cells. *scn1b* and *scn3b*, encoding $\beta 1$ and $\beta 3$ subunits, were also found, in accordance with the high level of $\text{Na}_V1.3$ expression [46,47]. Since GH3b6 cells are a subclone of GH3 cells, it is not surprising that both share similar Na_V channel gene expression profiles except for $\text{Na}_V1.1$, which was not detected in our model [48,49]. Although we did not detect $\text{Na}_V1.2$ and $\text{Na}_V1.6$ channels at the protein level, $\text{Na}_V1.2$ and $\text{Na}_V1.6$ channels are likely expressed at very low densities and thus their contribution to I_{Na} could be disregarded. Indeed, the biophysical and pharmacological properties of I_{Na} recorded in GH3b6 cells perfectly match with those of $\text{Na}_V1.3$ channels. This subtype produces I_{Na} with fast repriming kinetics and recovers rapidly from inactivation, ramp currents, and persistent currents [50,51]. Moreover, $\text{Na}_V1.3$ channels are blocked by ICA-121431, and were activated at more negative V_m in the presence of the β -scorpion toxin Tf2, both being selective ligands of this Na_V channel subtype.

Based on these data, the activation of Na_V channels by neurotoxins could lead to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation, as previously demonstrated in neuronal cells, through a crosslink between Na_V and/or NCX and/or Ca_V channels [9,11,14,16,17] but never in endocrine cells. In GH3b6 cells, we found that VTD-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation was totally blocked by TTX in the nanomolar range, confirming the involvement of TTX-S Na_V channels. These Ca^{2+} responses to VTD were only sensitive to Ca_V channel inhibitors, such as Cd^{2+} and nifedipine, a selective LTCC inhibitor, which completely blocked the Ca^{2+} entry, with IC_{50} values close to those previously determined by electrophysiology [52,53]. Thus, when VTD induced Na^+ entry through Na_V channels and subsequent membrane depolarization, only LTCC were and promoted a subsequent large Ca^{2+} influx. This is supported by the Ca_V channel gene expression profile, showing LTCC as one of the main abundant Ca_V channels in GH3b6 cells ($\text{Ca}_V1.2$ and $\text{Ca}_V1.3$). $\text{Ca}_V3.1$ encoded by *cacna1g* is also expressed in GH3b6 cells at a similar level to *cacna1d*. However, since nifedipine totally blocked VTD-induced Ca^{2+} elevation, T-type Ca_V channels certainly do not contribute to these Ca^{2+} entries. Thus, by inducing intracellular Ca^{2+} overload, neurotoxins that activate Na_V channels might also alter hormone secretion in endocrine cells.

Other neurotoxins activating Na_V channels, such as BTX or the β -scorpion toxin Tf2 [32,34], the wasp toxin β -PMTX [31], the marine toxin PbTx-2 [3], and the pyrethroid deltamethrin [54], are also able to increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in GH3b6 cells. Moreover, the kinetics of Ca^{2+} entry exhibited different patterns according to each type of neurotoxin (Figure 10). Since these Ca^{2+} responses result from membrane depolarization mediated by Na_V channels, their distinct kinetics likely reflect the Na_V channel gating modification induced by their interaction with these ion channels. For example, although BTX and VTD both bind to Site 2 of open-state Na_V channels and block the inactivation process, BTX induced a slow and sustained Ca^{2+} responses, while VTD triggered rapid Ca^{2+} responses (Figure 10). This is probably because BTX permanently maintains Na_V channels in the open state, whereas VTD behaves as a partial activator, triggering reversible and rapid alteration of the inactivation process [55,56]. Thus, according to the profile of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation kinetics,

four types of Na_V activator “class” can be distinguished (Figure 10). For class I (BTX), a slow and sustained increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ time-rate was observed. For class II (deltamethrin and Tf2 toxin), a rapid $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase was followed by a slow decrease. For class III (VTD and PbTx-2), intermediate rapid $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation kinetics with a peak were seen. Finally, for class IV (β -PMTX), the responses were characterized by a rapid and transient kinetics. Altogether, our model allows the establishment of a “fingerprint” for each class of Na_V channel activators.

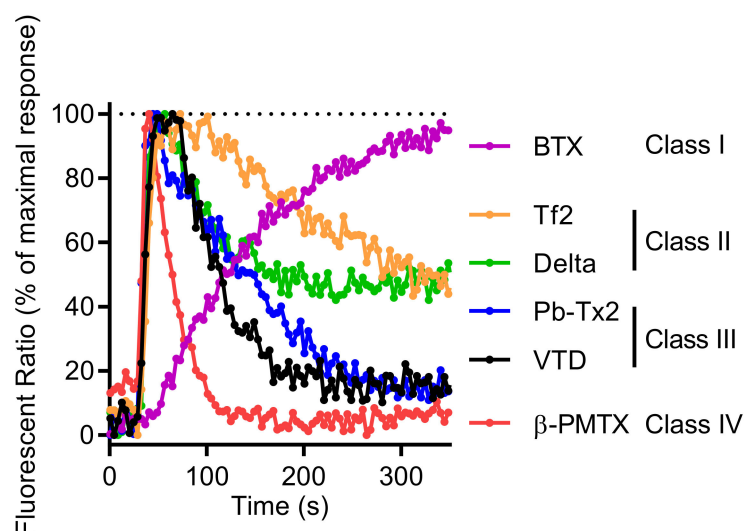


Figure 10. Comparison of representative Fura-2 fluorescence kinetic traces illustrating the Ca^{2+} response induced by $0.6 \mu\text{M}$ of BTX, $0.5 \mu\text{M}$ of Tf2, $10 \mu\text{M}$ of deltamethrin (Delta), $3 \mu\text{M}$ of Pb-TX2, $10 \mu\text{M}$ of VTD, and $100 \mu\text{M}$ of β -PMTX. Each kinetic trace was normalized against the maximum of signal, given the 100% of maximum response.

This strategy could also be useful to characterize new Na_V inhibitors. Indeed, we showed that BIII 890 CL, a use-dependent Na_V channel blocker [43–45], was able to inhibit the VTD-induced Ca^{2+} responses. The absence of effects of BIII 890 CL on Bay K8644-induced Ca^{2+} responses evidenced that BIII 890 CL selectively blocked Na_V channels in GH3b6 cells. In addition, the pharmacological profile towards Na_V channels has not been described. Our data showed for the first time that BIII 890 CL potentially inhibits $\text{Na}_V 1.3$ channels with IC_{50} in the micromolar range. Since only one report has shown a similar IC_{50} ($0.6 \mu\text{M}$) on $\text{Na}_V 1.8$ channels [44], its selectivity towards the other Na_V channel subtypes deserves to be clarified.

Thus, GH3b6 cells appear as an interesting cellular model, which mainly express the $\text{Na}_V 1.3$ channel subtype at the physiological level. This particular Na_V channel subtype is now considered as an emerging pharmacological therapeutic target for neurological diseases, such as epilepsy or neuropathic pain, after channel upregulation due to spinal cord injury [57–60]. The β -scorpion toxin Tf2, which selectively activates the $\text{Na}_V 1.3$ subtype, exhibited the strongest EC_{50} value in the nanomolar range, highlighting the relevance of the use of this toxin for investigating the implication of this ion channel in pain [32].

The crosstalk between the Na_V and Ca_V channel appears to be advantageous for characterizing the pharmacological properties of toxins or drugs. The pharmacological profile of BIII 890 CL, which has been claimed to be a potent blocker of the Na_V channel [43], has not been extensively described. In our assay, we rapidly showed that this drug has no effects on LTCC even at high concentrations. The crosstalk between the Na_V and Ca_V channel has been used in screening test-based assay with SH-SY5Y neuroblastoma cells, which has led to the discovery of potent and selective inhibitors of the $\text{Na}_V 1.7$ channel subtype [17,61], evidencing the interest in using such a strategy. GH3b6 cells could offer a

way to follow in parallel, by monitoring $[Ca^{2+}]_i$ with Fura-2, the possibility to screen for ligands of $Na_v1.3$ and LTCC.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals

BTX and TTX were from Latoxan (Valence, France). VTD was from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), Tf2 and pompilotoxin (β -PMTX) were purchased from Smarttox Biotechnology (Saint Egrève, France) and PbTx-2 was a gift from Andrea Bourdelais (University of North Carolina Wilmington, Wilmington, NC, USA). BIII 890 CL, such as BI 55 CL, was kindly provided by Boehringer Ingelheim (Biberach an der Riss, Germany) and Bay K8644 was from Alomone (Jerusalem, Israel). All other reagents and solvents, including Fura-2 AM, Pluronic®-F127 acid, ICA-121431, SN-6, SEA-0400, deltamethrin, thapsigargin, nifedipine, and cadmium chloride ($CdCl_2$), were obtained from Sigma-Aldrich Merck (Saint-Louis, MO, USA) or Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

4.2. Cell Line

The GH3b6 cells, a subclone of the rat GH3 pituitary cell line [62], were a generous gift of Dr Françoise Macari (IGF, Montpellier, France). GH3b6 cells were cultured from passage 14 until passage 32 at 37 °C/5% CO_2 in Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 medium (without L-glutamine, with 15 mM HEPES, with 1.2 g/L $NaHCO_3$) (PAN-Biotech, P04-41550) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, CVFSVF00-01), 1 mM L-glutamine (PAN-Biotech, P04-80100), and 1 mM of penicillin/streptomycin (PAN-Biotech, P06-07100) (called DMEM/F12 medium supplemented). GH3b6 cells were routinely cultivated in Flask T75, and when 80% of confluence was reached, split in a ratio of 1/5 in a new Flask T75. DMEM/F12 medium, removed every two or three days, and fresh DMEM/F12 medium supplement added (15 mL for a Flask T75).

4.3. Quantitative Real-Time PCR

First, 100,000 GH3b6 cells per cm^2 were seeded in multiwell 6 plates in 2 mL of DMEM/F12 medium supplemented by well until 80% confluence. After 3 days of culture, cells were washed in ice-cold PBS and total RNA from GH3b6 cells was extracted using the RNeasy micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). In total, 1 μ g of total RNA was processed for cDNA synthesis using random hexamers and the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). Real-time PCR assays were assessed on a LightCycler 480 Instrument II (Roche, Meylan, France) using Sybr® Select Master Mix (Applied Biosystems®), 2.5, 5, and 10 ng of cDNA in duplicate, and gene-specific primers (Supplementary Table S1) previously designed using the Primer3 Software. Amplicon sizes (70–106 bp) and AT% (47–55%) were chosen to allow comparison between the relative expression values obtained for each gene [63]. Differences in transcript expression levels were determined using the cycle threshold method, as described earlier [64]. Amplification specificity was confirmed by one peak–melting curve at the end of the amplification process. Relative quantification of gene expression was normalized to the mean of the expression of two validated housekeeping genes using the $2^{-\Delta C_t}$ method, where C_t is the threshold cycle: *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and *GUSB* (beta-glucuronidase). To perform absolute quantification, synthetic cDNA spanning each PCR amplicon were cloned into pUC57 and sequenced to check if their sequences were identical to those deposited in the GenBank (Genecust, Boynes, France). Absolute quantification of mRNA copies was then carried out using the calibration curve method, using the recombinant double-stranded plasmid DNA molecule determination as already described [65]. The plasmid copy numbers of eight dilutions of pure plasmids were used to establish the calibration curves for each gene. The calibration curves were used to evaluate PCR efficiency, which reached 100% for each gene.

4.4. Immunoblot

In total, 100,000 GH3b6 cells per cm² were seeded in multiwell 6 plates and cultivated in 2 mL of DMEM/F12 medium supplemented by well until 80% confluence. After 3 days of culture, cells were washed, scratched in ice-cold PBS, and lysed in 100 µL of RIPA buffer (150 mM Tris-HCl, 50 mM Tris, 12 mM sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, pH 8), supplemented with Complete™ Mini Protease Inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Laval, Quebec). Lysates were centrifuged for 15 min at 15,000 rpm and supernatants were collected. After protein quantification (Pierce™ BCA Protein Assay Kit), 20–50 µg of either GH3b6 cells or rat brain protein extracts were separated by 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and were transferred onto a PVDF membrane 0.45 µM (Thermo Fisher Scientific). The primary antibodies used were anti-pan Nav (rabbit, SP19, ASC-003, Alomone labs, Jerusalem, Israel), anti-Nav1.3 (rabbit, ASC-004, Alomone labs or mouse, WH0006328M1, Sigma-Aldrich Merck), and anti-actin used as loading control (mouse, clones AC-203 or AC-74, Sigma-Aldrich Merck). Peroxidase-conjugated secondary antibodies and a Pierce™ ECL-Plus Chemiluminescence kit (Thermo Fisher Scientific) were used before visualization using a LAS-3000 imager (Fujifilm, Tokyo, Japan).

4.5. Immunofluorescence Staining

In total, 200,000 cells per cm² were seeded in a Nunc Lab-Tek chamber slide (Thermo Scientific) and cultivated for 3 days and cultivated until 80% confluence. After being washed with ice-cold PBS, the cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde, rinsed with PBS, and incubated in blocking solution (10% BSA in PBS) for one hour at room temperature (RT). Immunofluorescence staining was processed, first overnight at 4 °C using the mouse primary antibody anti-Nav1.3 (1/50, WH0006328M1, Sigma-Aldrich) and then for one hour at RT using goat anti-mouse IgG (H + L) cross-adsorbed Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1/200, Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI 10 µg/mL (Molecular probes, Invitrogen). The localization and expression of the targeted proteins were visualized using a Nikon Eclipse TE2000S confocal microscope, and the images were analyzed using the Metamorph® software. Control experiments excluding the primary antibody were performed to verify the specificity of the fluorescence.

4.6. Measurement of Intracellular Ca²⁺

GH3b6 cells were plated at a density of 100,000 cells by well (96 wells black/clear bottom plate) in 100 µL of DMEM/F12 medium supplemented by well. Twenty-four hours after plating, cells were incubated with Fura-2 AM. The Fura-2 AM dye (10 mM, DMSO) was freshly prepared in a Fura-2 buffer composed of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) supplemented (in mM): 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES-K, and 0.5% BSA (pH 7.4). Cells were first incubated with Fura-2 AM (4 µM) and Pluronic®-F127 acid (0.02%) in Fura-2 buffer for 60 min at RT. After washing, cells were incubated with Fura-2 buffer for 60 min for a complete de-esterification of the dye. The plates were illuminated at 340 and 380 nm excitation wavelengths and the fluorescence emission spectra was recorded at 510 nm using a FlexStation® 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader. After a 30 s baseline, Nav activators including VTD, BTX, Tf2, PbTx-2, β-PMTX, and deltamethrin and Bay K8644 were automatically injected, and the fluorescence emission spectra were monitored for 320 s at an acquisition frequency of 0.25 Hz. Co-injection of Nav (TTX, BIII 890 CL, or its negative control BI 55 CL) or NCX (SN-6, SEA 0400) or LTCC (nifedipine, CdCl₂) inhibitors was achieved with activators. All experiments were performed in triplicate at least twice. Data analysis was performed using the SoftMax Pro 5.4.1 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.7. Manual Patch-Clamp Experiments

The manual whole-cell patch-clamp technique [66] was used to record inward Na⁺ currents, using an EPC 10 USB amplifier controlled with PATCHMASTER software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). GH3b6 cells were plated at a density of 30,000 cells

by glass coverslips and placed in perfusion chamber thermostated at 27 °C. Microelectrodes were prepared by pulling glass capillaries with a resistance of 2.4–2.5 MΩ. The procedure for patch-clamp recordings used in this work followed all recommendations kindly provided by Prof. Stefan H. Heinemann (Friedrich Schiller University of Jena, Jena, Germany) and adapted from previous studies [67,68]. The intracellular solution contained (in mM): 35 CsCl, 80 CsF, 15 NaCl, 10 TEACl, 10 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.4, osmolarity 299 mOsm), and the extracellular solution contained (in mM): 140 NaCl, 5 CsCl, 0.2 CdCl₂, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 10 HEPES (pH 7.4, osmolarity 290 mOsm).

4.8. High-Throughput Electrophysiology

Automated patch-clamp recordings were performed using the SyncroPatch 384PE from Nanion (München, Germany). Single-hole 384-well recording chips with medium resistance (4.77 ± 0.01 MΩ, $n = 384$) were used for the recordings of HEK-293 cells stably expressing human Na_v1.3 channel or GH3b6 cells (300,000/mL) in a whole-cell configuration. Pulse generation and data collection were performed with the PatchControl384 v1.5.2 software (Nanion) and the Biomek v1.0 interface (Beckman Coulter). Whole-cell recordings were conducted according to the recommended procedures of Nanion. Cells were stored in a cell hotel reservoir at 10 °C with a shaking speed of 60 rpm. After initiating the experiment, cell catching, sealing, whole-cell formation, buffer exchanges, recording, and data acquisition were all performed sequentially and automatically. The intracellular solution contained (in mM): 10 CsCl, 110 CsF, 10 NaCl, 10 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.2, osmolarity 280 mOsm), and the extracellular solution contained (in mM): 140 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4, osmolarity 298 mOsm). For GH3b6 cells, 10 μM of nifedipine were added to the external buffer to block LTCC. Whole-cell experiments were performed at a holding potential of −100 mV at room temperature (18–22 °C). Currents were sampled at 20 kHz. Tf2 was diluted in external buffer supplemented with 0.3% BSA.

4.9. Data Analysis

All graphs and statistical analysis were established using GraphPad Prism 7.02 (La Jolla, CA, USA). Data are presented as the mean ± SEM, calculated from at least $n = 3$ replicates and representative of at least 2 or 3 independent experiments. The kinetic traces of Fura-2 fluorescence were plotted as an emission ratio (λ_{ex} 340 nm/ λ_{ex} 380 nm). Non-linear analysis with variable slope was used to fit the concentration–response data with the Langmuir–Hill equation. For these analyses, the integration of the fluorescence kinetics (area under curve, AUC) obtained with increasing concentrations were used. Normality of the data distribution was evaluated using the Shapiro–Wilk test before choosing parametric or non-parametric tests. Multiple groups were compared by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test or a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test, when appropriate. Differences between independent groups were assessed by using the non-parametric Mann–Whitney test. Differences with $p < 0.05$ were considered significant (ns: not significant, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$, **** for $p < 0.0001$).

5. Conclusions

Na⁺ and Ca²⁺ homeostasis is intimately linked in excitable cells thanks to the crosstalk between Na⁺ channels, Ca²⁺ channels, and/or Na⁺/Ca²⁺ exchanger. Here, we demonstrated this crosstalk occurs between the Na_v1.3 channel subtype and LTCC in the endocrine cell line GH3b6. Thereby, neurotoxins that specifically persistently activate Na_v channels induce intracellular Ca²⁺ overload, which could in turn alter hormone secretion. Moreover, GH3b6 cells represent a convenient model for in vitro characterization of neurotoxins targeting Na_v channels and particularly those that could be selective for Na_v1.3 by measuring [Ca²⁺]_i levels, thanks to Na_v–Ca_v channels interplay.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23020827/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, C.L. (Christian Legros) and C.L. (Claire Legendre); methodology, C.L. (Christian Legros) and C.L. (Claire Legendre); formal analysis, L.R., C.L. (Christian Legros), C.L. (Claire Legendre) and J.M.; investigation, L.R., J.P., J.M., S.N., E.L.S. and J.K.; resources, C.L. (Christian Legros), K.M., H.D.P.; writing—original draft preparation, C.L. (Christian Legros) and C.L.; writing—review and editing, C.L. (Christian Legros), C.L. (Claire Legendre), L.R., J.M., K.M., H.D.P., H.T.-L., C.M., D.H., Z.F. and M.D.W.; supervision, C.L. (Christian Legros) and C.L. (Claire Legendre); project administration, C.L. (Christian Legros); funding acquisition, C.L. (Christian Legros). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the “Region Pays de la Loire, Paris scientifique 2017, SODI-VASC”. J.P. was a recipient PhD fellowship from this grant.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All the data are contained within the article.

Acknowledgments: We are grateful to Andrea Bourdelais (University of North Carolina Wilmington, USA) for kindly provided brevetoxin-2 and to Françoise Macari (IGF, Montpellier, France) for the GH3b6 cell line. We are also grateful to Linda Grimaud and Louis Gourdin for their technical assistance.

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

Abbreviations

AUC	area under curve
BTX	batrachotoxin
INa	Na ⁺ current
PbTx	brevetoxin
β-PMTX	β-pompidilotoxin
CaV channel	voltage-gated Ca ²⁺ channel
[Ca ²⁺] _i	intracellular Ca ²⁺ concentration
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GUSB	beta-glucuronidase
LTCC	L-type voltage-gated Ca ²⁺ channel
NaV channel	voltage-gated Na ⁺ channel
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
TTX	tetrodotoxin
TTX-S	sensitive to tetrodotoxin
TTX-R	resistant to tetrodotoxin;
VTD	veratridine

References

1. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*; Sinauer: Sunderland, MA, USA, 2001; p. 507.
2. De Lera Ruiz, M.; Kraus, R.L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7093–7118. [[CrossRef](#)]
3. Mattei, C.; Legros, C. The Voltage-Gated Sodium Channel: A Major Target of Marine Neurotoxins. *Toxicon* **2014**, *91*, 84–95. [[CrossRef](#)]
4. Catterall, W.A.; Goldin, A.L.; Waxman, S.G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 397–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Goldin, A.L. Evolution of Voltage-Gated Na⁺ Channels. *J. Exp. Biol.* **2002**, *205*, 575–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chahine, M.; O’Leary, M.E. Regulatory Role of Voltage-Gated Na Channel β Subunits in Sensory Neurons. *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*, 70. [[CrossRef](#)]
7. Bajaj, S.; Ong, S.T.; Chandy, K.G. Contributions of Natural Products to Ion Channel Pharmacology. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 703–716. [[CrossRef](#)]

8. England, S.; de Groot, M.J. Subtype-Selective Targeting of Voltage-Gated Sodium Channels. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 1413–1425. [[CrossRef](#)]
9. Berman, F.W.; Murray, T.F. Brevetoxin-Induced Autocrine Excitotoxicity Is Associated with Manifold Routes of Ca^{2+} Influx. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 1443–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Dravid, S.M.; Baden, D.G.; Murray, T.F. Brevetoxin Activation of Voltage-Gated Sodium Channels Regulates Ca Dynamics and ERK1/2 Phosphorylation in Murine Neocortical Neurons. *J. Neurochem.* **2004**, *89*, 739–749. [[CrossRef](#)]
11. Fekete, Á.; Franklin, L.; Ikemoto, T.; Rózsa, B.; Lendvai, B.; Vizi, E.S.; Zelles, T. Mechanism of the Persistent Sodium Current Activator Veratridine-evoked Ca^{2+} Elevation: Implication for Epilepsy. *J. Neurochem.* **2009**, *111*, 745–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Li, W.I.; Berman, F.W.; Okino, T.; Yokokawa, F.; Shioiri, T.; Gerwick, W.H.; Murray, T.F. Antillatoxin Is a Marine Cyanobacterial Toxin That Potently Activates Voltage-Gated Sodium Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7599–7604. [[CrossRef](#)]
13. Meder, W.; Fink, K.; Zentner, J.; Göthert, M. Calcium Channels Involved in K^{+} - and Veratridine-Induced Increase of Cytosolic Calcium Concentration in Human Cerebral Cortical Synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *290*, 1126–1131. [[PubMed](#)]
14. George, J.; Baden, D.G.; Gerwick, W.H.; Murray, T.F. Bidirectional Influence of Sodium Channel Activation on NMDA Receptor-Dependent Cerebrocortical Neuron Structural Plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 19840–19845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kopper, K.L.; Adorante, J.S. Regulation of Intracellular Calcium in N1E-115 Neuroblastoma Cells: The Role of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Exchange. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2002**, *282*, C1000–C1008. [[CrossRef](#)]
16. LePage, K.T.; Goeger, D.; Yokokawa, F.; Asano, T.; Shioiri, T.; Gerwick, W.H.; Murray, T.F. The Neurotoxic Lipopeptide Kalkitoxin Interacts with Voltage-Sensitive Sodium Channels in Cerebellar Granule Neurons. *Toxicol. Lett.* **2005**, *158*, 133–139. [[CrossRef](#)]
17. Vetter, I.; Mozar, C.A.; Durek, T.; Wingerd, J.S.; Alewood, P.F.; Christie, M.J.; Lewis, R.J. Characterisation of $\text{Na}(\text{v})$ Types Endogenously Expressed in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 1562–1571. [[CrossRef](#)]
18. Fletcher, P.A.; Sherman, A.; Stojilkovic, S.S. Common and Diverse Elements of Ion Channels and Receptors Underlying Electrical Activity in Endocrine Pituitary Cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *463*, 23–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Verkhatsky, A.; Trebak, M.; Perocchi, F.; Khananshvil, D.; Sekler, I. Crosslink between Calcium and Sodium Signalling. *Exp. Physiol.* **2018**, *103*, 157–169. [[CrossRef](#)]
20. Szabat, M.; Modi, H.; Ramracheya, R.; Girbinger, V.; Chan, F.; Lee, J.T.C.; Piske, M.; Kamal, S.; Carol Yang, Y.H.; Welling, A.; et al. High-Content Screening Identifies a Role for Na^{+} Channels in Insulin Production. *R. Soc. Open Sci.* **2015**, *2*, 150306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Vandael, D.H.F.; Ottaviani, M.M.; Legros, C.; Lefort, C.; Guérineau, N.C.; Allio, A.; Carabelli, V.; Carbone, E. Reduced Availability of Voltage-Gated Sodium Channels by Depolarization or Blockade by Tetrodotoxin Boosts Burst Firing and Catecholamine Release in Mouse Chromaffin Cells. *J. Physiol.* **2015**, *593*, 905–927. [[CrossRef](#)]
22. Stojilkovic, S.S.; Bjelobaba, I.; Zemkova, H. Ion Channels of Pituitary Gonadotrophs and Their Roles in Signaling and Secretion. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 126. [[CrossRef](#)]
23. Zhang, Q.; Chibalina, M.V.; Bengtsson, M.; Groschner, L.N.; Ramracheya, R.; Rorsman, N.J.G.; Leiss, V.; Nassar, M.A.; Welling, A.; Gribble, F.M.; et al. Na^{+} Current Properties in Islet α - and β -Cells Reflect Cell-Specific *Scn3a* and *Scn9a* Expression. *J. Physiol.* **2014**, *592*, 4677–4696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Beltran-Parrazal, L.; Charles, A. Riluzole Inhibits Spontaneous Ca^{2+} Signaling in Neuroendocrine Cells by Activation of K^{+} Channels and Inhibition of Na^{+} Channels. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 881–888. [[CrossRef](#)]
25. Campos, F.V.; Coronas, F.I.V.; Beirão, P.S.L. Voltage-Dependent Displacement of the Scorpion Toxin Ts3 from Sodium Channels and Its Implication on the Control of Inactivation. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 1115–1122. [[CrossRef](#)]
26. Kushmerick, C.; Romano-Silva, M.A.; Gomez, M.V.; Prado, M.A. Changes in Ca^{2+} Channel Expression upon Differentiation of SN56 Cholinergic Cells. *Brain Res.* **2001**, *916*, 199–210. [[CrossRef](#)]
27. Dubinsky, J.M.; Oxford, G.S. Ionic Currents in Two Strains of Rat Anterior Pituitary Tumor Cells. *J. Gen. Physiol.* **1984**, *83*, 309–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Matteson, D.R.; Armstrong, C.M. Na and Ca Channels in a Transformed Line of Anterior Pituitary Cells. *J. Gen. Physiol.* **1984**, *83*, 371–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kushmerick, C.; Kalapothakis, E.; Beirão, P.S.; Penaforte, C.L.; Prado, V.F.; Cruz, J.S.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Gomez, M.V.; Romano-Silva, M.A.; et al. Phorbol Nigroventer Toxin Tx3-1 Blocks A-Type K^{+} Currents Controlling Ca^{2+} Oscillation Frequency in GH3 Cells. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 1472–1481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Theile, J.W.; Cummins, T.R. Recent Developments Regarding Voltage-Gated Sodium Channel Blockers for the Treatment of Inherited and Acquired Neuropathic Pain Syndromes. *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*, 54. [[CrossRef](#)]
31. Garrison, C.E.; Guan, W.; Kato, M.; Tamsett, T.; Patel, T.; Sun, Y.; Pathak, T.P. Structure-Activity Relationship Evaluation of Wasp Toxin β -PMTX Leads to Analogs with Superior Activity for Human Neuronal Sodium Channels. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 353–357. [[CrossRef](#)]
32. Israel, M.R.; Dash, T.S.; Bothe, S.N.; Robinson, S.D.; Deuis, J.R.; Craik, D.J.; Lampert, A.; Vetter, I.; Durek, T. Characterization of Synthetic Tf2 as a NaV1.3 Selective Pharmacological Probe. *Biomedicines* **2020**, *8*, 155. [[CrossRef](#)]
33. McCormack, K.; Santos, S.; Chapman, M.L.; Krafte, D.S.; Marron, B.E.; West, C.W.; Krambis, M.J.; Antonio, B.M.; Zellmer, S.G.; Printzenhoff, D.; et al. Voltage Sensor Interaction Site for Selective Small Molecule Inhibitors of Voltage-Gated Sodium Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E2724–E2732. [[CrossRef](#)]

34. Camargos, T.S.; Bosmans, F.; Rego, S.C.; Mourão, C.B.F.; Schwartz, E.F. The Scorpion Toxin Tf2 from *Tityus Fasciolatus* Promotes Nav1.3 Opening. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128578. [\[CrossRef\]](#)
35. Kinoshita, E.; Maejima, H.; Yamaoka, K.; Konno, K.; Kawai, N.; Shimizu, E.; Yokote, S.; Nakayama, H.; Seyama, I. Novel Wasp Toxin Discriminates between Neuronal and Cardiac Sodium Channels. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1457–1463. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Schiavon, E.; Stevens, M.; Zaharenko, A.J.; Konno, K.; Tytgat, J.; Wanke, E. Voltage-Gated Sodium Channel Isoform-Specific Effects of Pompilidotoxins. *FEBS J.* **2010**, *277*, 918–930. [\[CrossRef\]](#)
37. White, R.J.; Reynolds, I.J. Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ Exchange Buffer Glutamate-Induced Calcium Loads in Cultured Cortical Neurons. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 1318–1328. [\[CrossRef\]](#)
38. Tanaka, H.; Nishimaru, K.; Aikawa, T.; Hirayama, W.; Tanaka, Y.; Shigenobu, K. Effect of SEA0400, a Novel Inhibitor of Sodium-Calcium Exchanger, on Myocardial Ionic Currents. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *135*, 1096–1100. [\[CrossRef\]](#)
39. Iwamoto, T.; Inoue, Y.; Ito, K.; Sakae, T.; Kita, S.; Katsuragi, T. The Exchanger Inhibitory Peptide Region-Dependent Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ Exchange by SN-6 [2-[4-(4-Nitrobenzyloxy)Benzyl]Thiazolidine-4-Carboxylic Acid Ethyl Ester], a Novel Benzyloxyphenyl Derivative. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 45–55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Iwamoto, T.; Kita, S.; Uehara, A.; Imanaga, I.; Matsuda, T.; Baba, A.; Katsuragi, T. Molecular Determinants of Na⁺/Ca²⁺ Exchange (NCX1) Inhibition by SEA0400. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7544–7553. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Glassmeier, G.; Hauber, M.; Wulfsen, I.; Weinsberg, F.; Bauer, C.K.; Schwarz, J.R. Ca²⁺ Channels in Clonal Rat Anterior Pituitary Cells (GH3/B6). *Pflug. Arch.* **2001**, *442*, 577–587.
42. Safa, P.; Boulter, J.; Hales, T.G. Functional Properties of Cav1.3 (Alpha1D) L-Type Ca²⁺ Channel Splice Variants Expressed by Rat Brain and Neuroendocrine GH3 Cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38727–38737. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Carter, A.J.; Grauert, M.; Pschorn, U.; Bechtel, W.D.; Bartmann-Lindholm, C.; Qu, Y.; Scheuer, T.; Catterall, W.A.; Weiser, T. Potent Blockade of Sodium Channels and Protection of Brain Tissue from Ischemia by BIII 890 CL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4944–4949. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Dekker, L.V.; Daniels, Z.; Hick, C.; Elsegood, K.; Bowden, S.; Szeszak, T.; Burley, J.R.; Southan, A.; Cronk, D.; James, I.F. Analysis of Human Nav1.8 Expressed in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *528*, 52–58. [\[CrossRef\]](#)
45. Laird, J.M.A.; Carter, A.J.; Grauert, M.; Cervero, F. Analgesic Activity of a Novel Use-Dependent Sodium Channel Blocker, Crobenetine, in Mono-Arthritic Rats: Sodium Channel Blockers in Arthritic Rats. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 1742–1748. [\[CrossRef\]](#)
46. Cusdin, F.S.; Nietlispach, D.; Maman, J.; Dale, T.J.; Powell, A.J.; Clare, J.J.; Jackson, A.P. The Sodium Channel {beta}3-Subunit Induces Multiphasic Gating in Nav1.3 and Affects Fast Inactivation via Distinct Intracellular Regions. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 33404–33412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Shah, B.S.; Stevens, E.B.; Pinnock, R.D.; Dixon, A.K.; Lee, K. Developmental Expression of the Novel Voltage-Gated Sodium Channel Auxiliary Subunit Beta3, in Rat CNS. *J. Physiol.* **2001**, *534*, 763–776. [\[CrossRef\]](#)
48. Baroni, D.; Moran, O. Molecular Differential Expression of Voltage-Gated Sodium Channel α and β Subunit MRNAs in Five Different Mammalian Cell Lines. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2011**, *43*, 729–738. [\[CrossRef\]](#)
49. Vega, A.V.; Espinosa, J.L.; López-Domínguez, A.M.; López-Santiago, L.F.; Navarrete, A.; Cota, G. L-Type Calcium Channel Activation up-Regulates the MRNAs for Two Different Sodium Channel α Subunits (Nav1.2 and Nav1.3) in Rat Pituitary GH3 Cells. *Brain Res.* **2003**, *116*, 115–125. [\[CrossRef\]](#)
50. Cummins, T.R.; Aglieco, F.; Renganathan, M.; Herzog, R.I.; Dib-Hajj, S.D.; Waxman, S.G. Nav1.3 Sodium Channels: Rapid Repriming and Slow Closed-State Inactivation Display Quantitative Differences after Expression in a Mammalian Cell Line and in Spinal Sensory Neurons. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 5952–5961. [\[CrossRef\]](#)
51. Estacion, M.; Waxman, S.G. The Response of Na_v 1.3 Sodium Channels to Ramp Stimuli: Multiple Components and Mechanisms. *J. Neurophysiol.* **2013**, *109*, 306–314. [\[CrossRef\]](#)
52. Hobai, I.A.; Bates, J.A.; Howarth, F.C.; Levi, A.J. Inhibition by External Cd²⁺ of Na/Ca Exchange and L-Type Ca Channel in Rabbit Ventricular Myocytes. *Am. J. Physiol.* **1997**, *272*, H2164–H2172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Shen, J.B.; Jiang, B.; Pappano, A.J. Comparison of L-Type Calcium Channel Blockade by Nifedipine and/or Cadmium in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 562–570. [\[PubMed\]](#)
54. Meacham, C.; Brodfuehrer, P.; Watkins, J.; Shafer, T. Developmentally-Regulated Sodium Channel Subunits Are Differentially Sensitive to α -Cyano Containing Pyrethroids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *231*, 273–281. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Catterall, W.A. Membrane Potential-Dependent Binding of Scorpion Toxin to the Action Potential Na⁺ Ionophore. Studies with a Toxin Derivative Prepared by Lactoperoxidase-Catalyzed Iodination. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 8660–8668. [\[CrossRef\]](#)
56. Weinsberg, F.; Bauer, C.K.; Schwarz, J.R. The Class III Antiarrhythmic Agent E-4031 Selectively Blocks the Inactivating Inward-Rectifying Potassium Current in Rat Anterior Pituitary Tumor Cells (GH3/B6 Cells). *Pflug. Arch.* **1997**, *434*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
57. Hains, B.C.; Waxman, S.G. Sodium Channel Expression and the Molecular Pathophysiology of Pain after SCI. *Prog. Brain Res.* **2007**, *161*, 195–203. [\[CrossRef\]](#)
58. Luiz, A.P.; Wood, J.N. Sodium Channels in Pain and Cancer: New Therapeutic Opportunities. *Adv. Pharmacol.* **2016**, *75*, 153–178. [\[CrossRef\]](#)
59. Su, S.; Shao, J.; Zhao, Q.; Ren, X.; Cai, W.; Li, L.; Bai, Q.; Chen, X.; Xu, B.; Wang, J.; et al. MiR-30b Attenuates Neuropathic Pain by Regulating Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.3 in Rats. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 126. [\[CrossRef\]](#)
60. Yang, L.; Li, Q.; Liu, X.; Liu, S. Roles of Voltage-Gated Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels Nav1.3 and Nav1.7 in Diabetes and Painful Diabetic Neuropathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1479. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

61. Klint, J.K.; Smith, J.J.; Vetter, I.; Rupasinghe, D.B.; Er, S.Y.; Senff, S.; Herzig, V.; Mobli, M.; Lewis, R.J.; Bosmans, F.; et al. Seven Novel Modulators of the Analgesic Target NaV 1.7 Uncovered Using a High-Throughput Venom-Based Discovery Approach. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 2445–2458. [[CrossRef](#)]
62. Tashjian, A.H. Clonal Strains of Hormone-Producing Pituitary Cells. *Meth. Enzymol.* **1979**, *58*, 527–535.
63. Colborn, J.M.; Byrd, B.D.; Koita, O.A.; Krogstad, D.J. Estimation of Copy Number Using SYBR Green: Confounding by AT-Rich DNA and by Variation in Amplicon Length. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *79*, 887–892. [[CrossRef](#)]
64. Morrison, T.B.; Weis, J.J.; Wittwer, C.T. Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR Green I Monitoring during Amplification. *BioTechniques* **1998**, *24*, 954–958.
65. Pfaffl, M.W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)]
66. 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.-Eur. J. Physiol.* **1981**, *391*, 85–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Leipold, E.; Hansel, A.; Borges, A.; Heinemann, S.H. Subtype Specificity of Scorpion β -Toxin Tz1 Interaction with Voltage-Gated Sodium Channels Is Determined by the Pore Loop of Domain 3. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 340–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Leipold, E.; Borges, A.; Heinemann, S.H. Scorpion β -Toxin Interference with NaV Channel Voltage Sensor Gives Rise to Excitatory and Depressant Modes. *J. Gen. Physiol.* **2012**, *139*, 305–319. [[CrossRef](#)]

Article

Tetrodotoxin Decreases the Contractility of Mesenteric Arteries, Revealing the Contribution of Voltage-Gated Na⁺ Channels in Vascular Tone Regulation

Joohee Park ¹, Coralyne Proux ¹, William Ehanno ¹, Léa Réthoré ¹, Emilie Vessièrès ¹, Jennifer Bourreau ¹, Julie Favre ^{1,2}, Gilles Kauffenstein ^{1,3}, César Mattei ¹, Hélène Tricoire-Leignel ¹, Daniel Henrion ¹, Claire Legendre ¹ and Christian Legros ^{1,*}

¹ INSERM, CNRS, MITOVASC, Equipe CarME, SFR ICAT, University Angers, 49000 Angers, France

² UMR INSERM 1121, CRBS, Strasbourg University, 67000 Strasbourg, France

³ UMR INSERM 1260, CRBS, Strasbourg University, 67084 Strasbourg, France

* Correspondence: christian.legros@univ-angers.fr; Tel.: +33-244-688-273

Abstract: Tetrodotoxin (TTX) poisoning through the consumption of contaminated fish leads to lethal symptoms, including severe hypotension. This TTX-induced hypotension is likely due to the downfall of peripheral arterial resistance through direct or indirect effects on adrenergic signaling. TTX is a high-affinity blocker of voltage-gated Na⁺ (Na_V) channels. In arteries, Na_V channels are expressed in sympathetic nerve endings, both in the intima and media. In this present work, we aimed to decipher the role of Na_V channels in vascular tone using TTX. We first characterized the expression of Na_V channels in the aorta, a model of conduction arteries, and in mesenteric arteries (MA), a model of resistance arteries, in C57Bl/6J mice, by Western blot, immunohistochemistry, and absolute RT-qPCR. Our data showed that these channels are expressed in both endothelium and media of aorta and MA, in which *scn2a* and *scn1b* were the most abundant transcripts, suggesting that murine vascular Na_V channels consist of Na_V1.2 channel subtype with Na_Vβ1 auxiliary subunit. Using myography, we showed that TTX (1 μM) induced complete vasorelaxation in MA in the presence of veratridine and cocktails of antagonists (prazosin and atropine with or without suramin) that suppressed the effects of neurotransmitter release. In addition, TTX (1 μM) strongly potentiated the flow-mediated dilation response of isolated MA. Altogether, our data showed that TTX blocks Na_V channels in resistance arteries and consecutively decreases vascular tone. This could explain the drop in total peripheral resistance observed during mammal tetrodotoxinizations.

Keywords: TTX; voltage-gated Na⁺ channels; aorta; mesenteric arteries; veratridine; RT-qPCR



Citation: Park, J.; Proux, C.; Ehanno, W.; Réthoré, L.; Vessièrès, E.; Bourreau, J.; Favre, J.; Kauffenstein, G.; Mattei, C.; Tricoire-Leignel, H.; et al. Tetrodotoxin Decreases the Contractility of Mesenteric Arteries, Revealing the Contribution of Voltage-Gated Na⁺ Channels in Vascular Tone Regulation. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 196. <https://doi.org/10.3390/md21030196>

Academic Editor: David Adams

Received: 21 February 2023

Revised: 11 March 2023

Accepted: 20 March 2023

Published: 22 March 2023



Copyright: © 2023 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/>).

1. Introduction

Voltage-gated Na⁺ (Na_V) channels are members of the voltage-gated ion channel superfamily, consisting of pore-forming α-subunits (Na_V1.1–9) encoded by nine distinct genes (*scn1a–5a*, *scn8–11a*) with one or two auxiliary subunits (Na_Vβ1–4) encoded by four genes (*scn1b–4b*) in mammals [1]. By controlling the Na⁺ currents through the plasma membrane of excitable and non-excitabile cells, Na_V channels exhibit different physiological roles, such as electrical coupling, muscle and heart contraction, or hormone secretion [1,2].

In the vasculature, Na_V channels are expressed and generate Na⁺ currents in both endothelial cells (EC) and vascular smooth muscle cells (VSMC) isolated from the aorta, pulmonary, mesenteric, coronary, uterine, and cremaster arteries [3–16]. Their involvement in vascular contractility has been demonstrated in rat mesenteric arteries (MA) [9]. Moreover, Na_V channels endogenously expressed in EC have been suggested to participate in conducted vasodilator response in murine cremaster arteries [13]. In addition, in vitro studies have shown that endothelial Na_V channels are activated by shear stress [16] and participate in VEGF-MAP-kinase signaling associated with proliferation, migration, and

tubulogenesis of EC [14]. Finally, vascular Na_V channels interfere with various features of vascular function, through a functional coupling with $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX), mediating Ca^{2+} entry in both VSMC and EC [9,14].

Na_V channels are pharmacologically classified according to their sensitivity to tetrodotoxin (TTX): TTX-sensitive (TTX-S) Na_V channels (IC_{50} in the nanomolar range for $\text{Na}_V1.1$ -4 and $\text{Na}_V1.6$ -7) and TTX-resistant (TTX-R) Na_V channels (IC_{50} in the micromolar range for $\text{Na}_V1.5$ and $\text{Na}_V1.8$ -9) [17]. TTX poisoning, also called tetrodotoxification, is an important health issue due to fish consumption and particularly in puffer fish eaters [18]. Deep hypotension is one of the most severe symptoms of human poisonings, which has been attributed to the reduction of vascular tone [18,19]. In rats, TTX-induced hypotension can be overcome by the $\alpha1$ -adrenergic agonist, phenylephrine (Phe), suggesting indirect effects of TTX on vascular tone [20]. These indirect effects are likely due to the inhibition of noradrenaline (NA) release by arterial sympathetic neurons. To date, the effects of TTX have not been investigated on isolated arteries, and one can not exclude that TTX might also act on arterial Na_V channels.

In this work, we characterized the gene expression profile of α and β Na_V channel subunits in a conductance artery (aorta) and a model of resistance arteries (MA) from mice. By using Western blot, immunohistochemistry, and absolute RT-qPCR, we showed that both arteries mainly expressed the $\text{Na}_V1.2$ channel subtype with $\text{Na}_V\beta1$. We then challenged isolated MA by myography and arteriography with TTX to investigate the role of Na_V channels in vascular tone to address their putative role in tetrodotoxification.

2. Results

2.1. *Nav Channels Are Expressed in Both Intima and Media of Murine Arteries*

In this work, we used two distinct branches of MA, which constitute the vascular bed of the small intestine, called first-order MA (FOMA) and cecocolic arteries (CA) (Figure 1a). The expression of Na_V channels in MA was evidenced by Western blot in FOMA, CA, and aorta using an anti-Pan Na_V antibody that strongly immunostained 2 proteins of ~250 and ~280 kDa (Figure 1b). The 280 kDa band corresponds to that observed with brain protein extracts, which mainly contain the $\text{Na}_V1.2$ subtype [1]. The expression of Na_V channels in MA was validated by immunohistochemistry in FOMA and CA (Figure 1c,d). This immunohistochemical analysis shows a strong immunofluorescence labeling with an anti-Pan Na_V antibody in both intima and media of FOMA and CA (Figure 1c,d). The localization of Na_V channels in the endothelium was confirmed using anti-PECAM1 antibodies (Figure 1c,d; merged image). Beyond PECAM1 staining, the immunofluorescence labeling with anti-Pan Na_V antibody likely corresponds to VSMC that expresses Na_V channels.

The expression of Na_V channels was also characterized in the aorta of C57Bl/6J mice (Figure 2a). Na_V channels were clearly immunodetected in the aorta using an anti-Pan Na_V antibody (Figure 2b). In addition, the $\text{Na}_V\beta1$ subunit was immunolabeled in the aorta (Figure 2c). Altogether, our immunohistochemical data indicate that both Na_V channel α - and β -subunits are expressed at the protein level in the intima and media of both MA and aorta from mice.

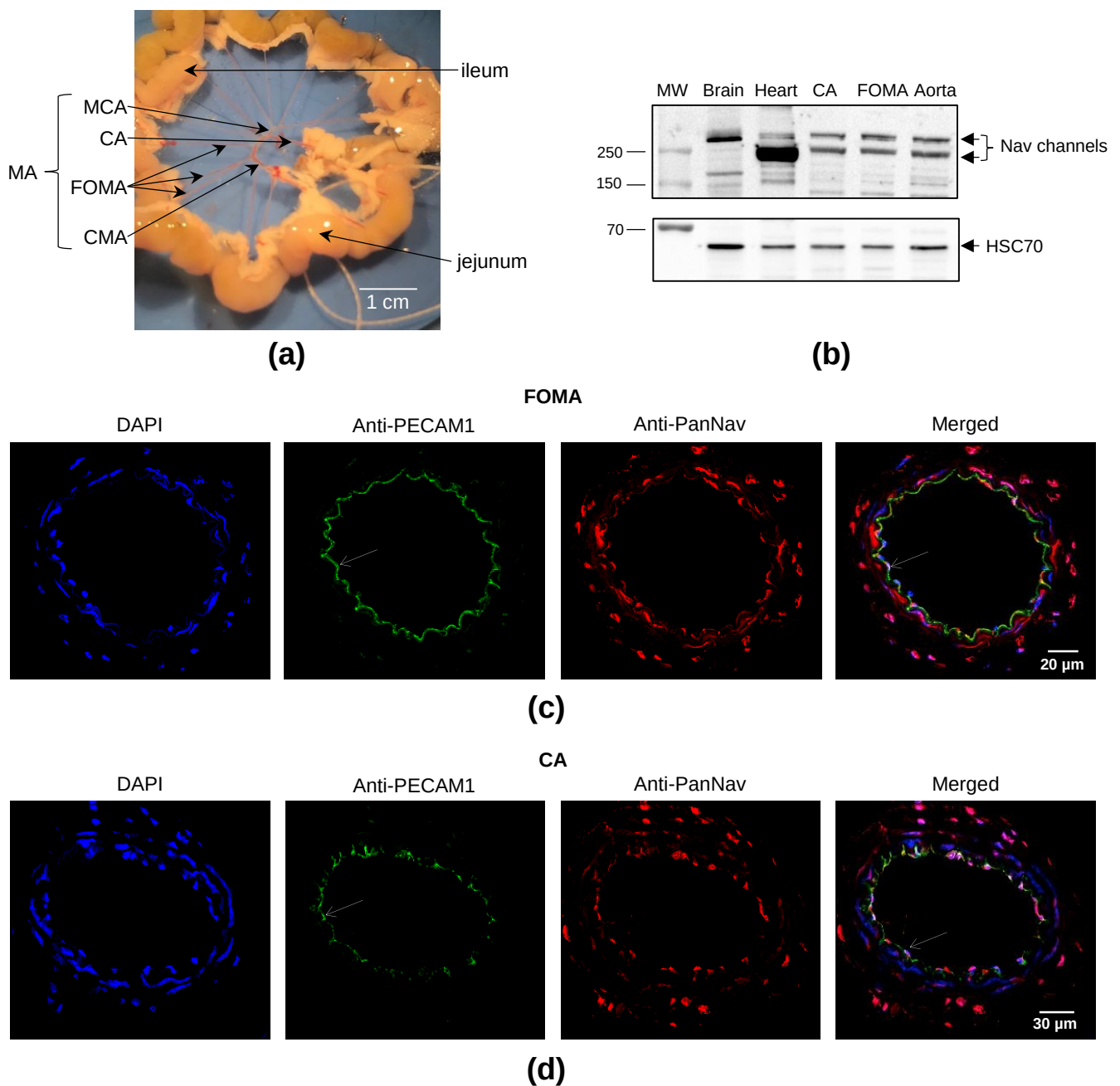


Figure 1. Expression of Nav channels in mesenteric arteries. **(a)** The image illustrates the vascular bed of the small intestine in C57Bl/6J mouse. The small intestine (jejunum followed by ileum) was dissected and prepared to show MA. The two different branches of MA used in this work are indicated with arrows: CA and FOMA, cranial MA (CMA), and middle colic artery (MCA). **(b)** Western blot using an anti-PanNav antibody. HSC70 was used as a loading control and mouse brain and heart as positive controls. The experiments were carried out with 10 µg of proteins. **(c,d)** Representative immunofluorescent images are shown to illustrate the immunolabeling of intima and media in FOMA and CA. The nuclei were labeled with DAPI (in blue). The mesenteric vascular endothelium was immunolabeled with anti-PECAM1 antibodies (in green). Nav channels were detected with an anti-PanNav antibody (PanNav, in red). The overlay images (Merged) are shown on the right panels. The arrows indicate the endothelium.

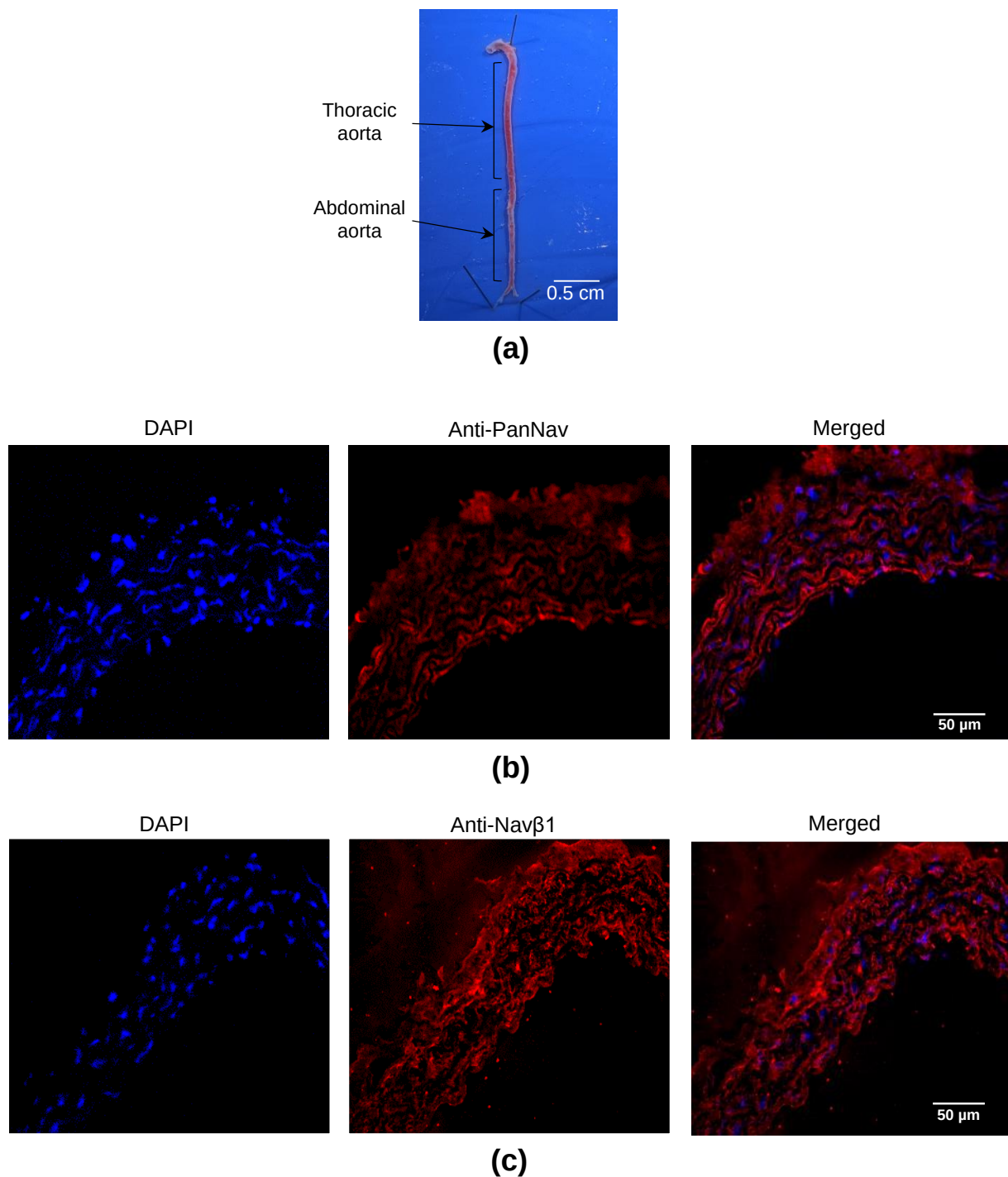


Figure 2. Immunolocalization of Nav channels in mouse aorta. (a) The image illustrates an isolated aorta, which was dissected from a C57Bl/6J mouse. The thoracic aorta was used in this work. (b,c) Representative immunofluorescent images are shown to illustrate the expression of Nav channel subunits in aortae. The nuclei were labeled with DAPI (left panels in blue). (b) The α -subunit was immunolocalized with an anti-PanNav antibody (in red). (c) The Nav β 1 subunit was immunodetected with anti-Nav β 1 antibodies (in red). The overlay of separated images (Merged) is shown on the right panels.

To identify which Nav channel isoforms are expressed in the aorta, FOMA, and CA in mice, we used RT-qPCR with absolute quantification. The data are shown in Table 1 and Figure 3. We amplified *nos3* and *desmin*, encoding the endothelial NO synthase (eNOS) and desmin, respectively, to show that our RNA extraction is a mixture of RNA from both

media and intima (Figure 3a). As expected, the expression levels of *desmin* were high and particularly in FOMA and CA, reflecting a higher content of desmin in resistance arteries, which contain more VSMC (Figure 3a). In comparison to *desmin*, the expression levels of *nos3* were found at much lower levels, certainly, because intima is organized in a single cell layer. In the aorta, FOMA, and CA, the following genes, encoding Nav α -subunit were not detected: *scn1a*, *scn4a*, *scn8a*, *scn9a*, *scn10a*, and *scn11a*. The *scn2a* transcript appeared to be the most abundant and particularly in the aorta, compared to FOMA and CA (Figure 3b, Table 1). The *scn3a* transcript was observed only in the aorta, while *scn5a* was found only in FOMA and CA but at low levels for both genes (Figure 3b). The *scn1b* transcript was revealed with the highest level of expression compared to the other β -subunit genes (Figure 3b, Table 1). The *scn2b* transcript is expressed at similar levels in the aorta, FOMA, and CA. Low expression levels of *scn3b* and *scn4b* transcripts were detected. Altogether, these RT-qPCR data showed that *scn2a* and *scn1b* transcripts are the most abundant Nav channel subunit genes expressed in the murine aorta, FOMA, and CA. This suggests that these arteries express the TTX-S Nav1.2 channels associated with Nav β 1.

Table 1. Comparison of *nos3*, *desmin*, and Nav channel gene expression between aorta, FOMA, and CA.

Gene Name	Protein Name	Arteries	Number of Genes (Mean $\pm$ SEM, $n = 11-12$)	Pairwise Comparison	p -Value
<i>scn2a</i>	Nav1.2	aorta	258.58 $\pm$ 30.51	aorta vs. FOMA	<0.0001
		FOMA	54.5 $\pm$ 6.9	aorta vs. CA	<0.0001
		CA	30.7 $\pm$ 2.2	FOMA vs. CA	0.0051
<i>scn3a</i>	Nav1.3	aorta	30.9 $\pm$ 5.8		
		FOMA	nd		
		CA	nd		
<i>scn5a</i>	Nav1.5	aorta	nd		0.0005
		FOMA	4.9 $\pm$ 0.9	FOMA vs. CA	0.022
		CA	1.5 $\pm$ 0.6		0.0122
<i>scn1b</i>	β 1-subunit	aorta	5300.9 $\pm$ 609.6	aorta vs. FOMA	0.0003
		FOMA	1879.4 $\pm$ 157.7	aorta vs. CA	<0.0001
		CA	1069.5 $\pm$ 93.2	FOMA vs. CA	0.0008
<i>scn2b</i>	β 2-subunit	aorta	60.8 $\pm$ 9.2	aorta vs. FOMA	0.5517
		FOMA	54.2 $\pm$ 3.2	aorta vs. CA	0.2275
		CA	45.3 $\pm$ 3.1	FOMA vs. CA	0.1176
<i>scn3b</i>	β 3-subunit	aorta	31.8 $\pm$ 4.1	aorta vs. FOMA	0.0001
		FOMA	4.4 $\pm$ 1.2	aorta vs. CA	<0.0001
		CA	2.0 $\pm$ 0.9	FOMA vs. CA	0.1134
<i>Scn4b</i>	β 4-subunit	aorta	nd		
		FOMA	2.7 $\pm$ 1.2		
		CA	nd		
<i>nos3</i>	eNOS	aorta	4961.4 $\pm$ 585.6	aorta vs. FOMA	0.0017
		FOMA	10,619.8 $\pm$ 1007.8	aorta vs. CA	0.7544
		CA	4721.6 $\pm$ 449.2	FOMA vs. CA	0.0008
<i>des</i>	desmin	aorta	11,414.8 $\pm$ 1644.2	aorta vs. FOMA	<0.0001
		FOMA	163,847.8 $\pm$ 13,848.2	Aorta vs. CA	<0.0001
		CA	113,193.8 $\pm$ 9609.1	FOMA vs. CA	0.0156

The gene copy numbers were evaluated for 6 ng cDNA. nd: not detected.

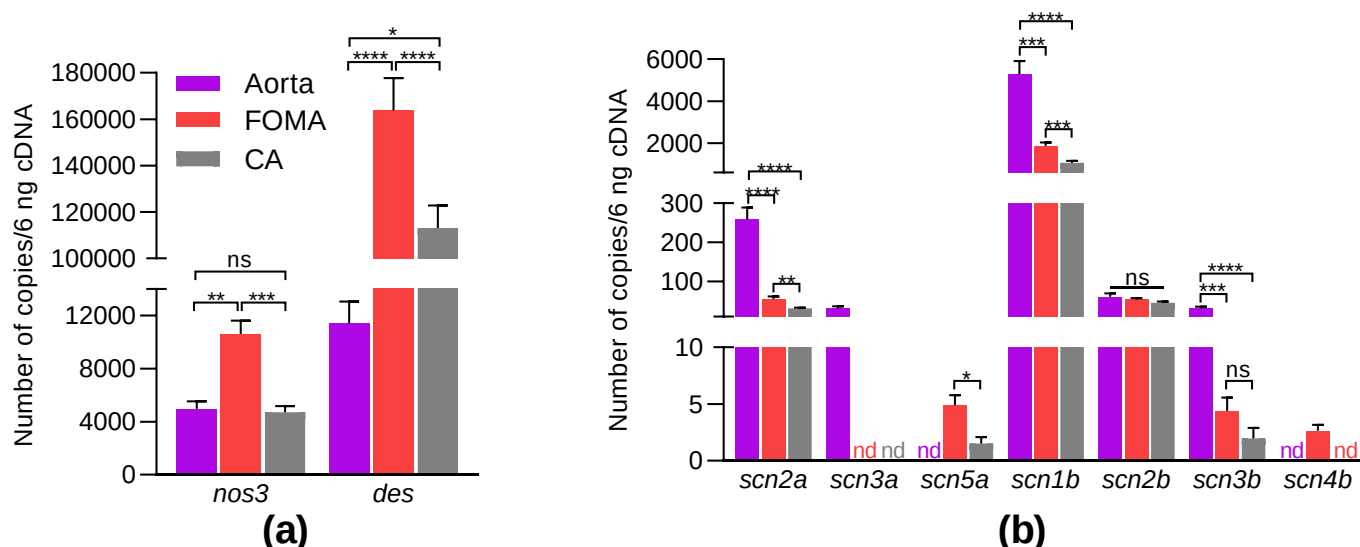


Figure 3. Gene expression profiles of Nav channels in murine aorta and mesenteric arteries. The expression levels of *nos3*, *desmin* gene (*des*), (a) and Nav channel genes (b) were determined by absolute RT-qPCR in aorta, FOMA, and CA. cDNA were prepared with RNA extracted from males ($n = 5-6$) and females ($n = 6$). Data are shown as mean $\pm$ SEM and were analyzed using two-way ANOVA corrected with Holm–Sidak’s test for multiple comparisons, ns: non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (p -values are shown in Table 1). nd: not detected.

2.2. Effects of TTX on Murine Mesenteric Artery Contractility

To explore the implication of Nav channels in the vascular tone of MA, we first investigated the effects of TTX on the contractile response of CA, a branch of MA by myography (Figure 4). We used veratridine (VTD) to activate all Nav channels in arteries, including those expressed in terminal nerve endings. To avoid any effects of neurotransmitter release, such as NA, acetylcholine (ACh), and ATP, we used prazosin (PZ), atropine (AP), and suramin (SUR) to antagonize $\alpha 1$ -adrenoreceptors, muscarinic, and ATP receptors, respectively, in order to discriminate the effects of VTD on vascular Nav channels and then challenged the action of TTX (Figure 4a). Without VTD, TTX has no effect on CA contractility (data not shown). The application of VTD did not significantly modify the contractile response induced by U46619, a thromboxane A2 analogue (a potent vasoconstrictor), in the following conditions: (1) in the presence of PZ and AP ($p > 0.99$, Figure 4b) and (2) in the presence of PZ, AP, and SUR ($p = 0.34$, Figure 4c). However, the addition of TTX triggered a fast and almost complete relaxation of arteries to a similar extent compared to control: $88.4 \pm 6.5\%$ ($p < 0.05$) and $92.5 \pm 1.6\%$ ($p < 0.01$), respectively (Figure 4b,c). Thus, there was no significant difference in TTX-induced relaxation in the absence or the presence of SUR ($p = 0.94$, Mann–Whitney test), indicating that VTD stimulation did not trigger the release of a sufficient amount of ATP to modify the vascular tone. In both cases, after washout, CA gave similar responses to U46619 and TTX. In conclusion, these data show that TTX induced a full relaxation of CA, suggesting the activation of vascular Nav channels by VTD.

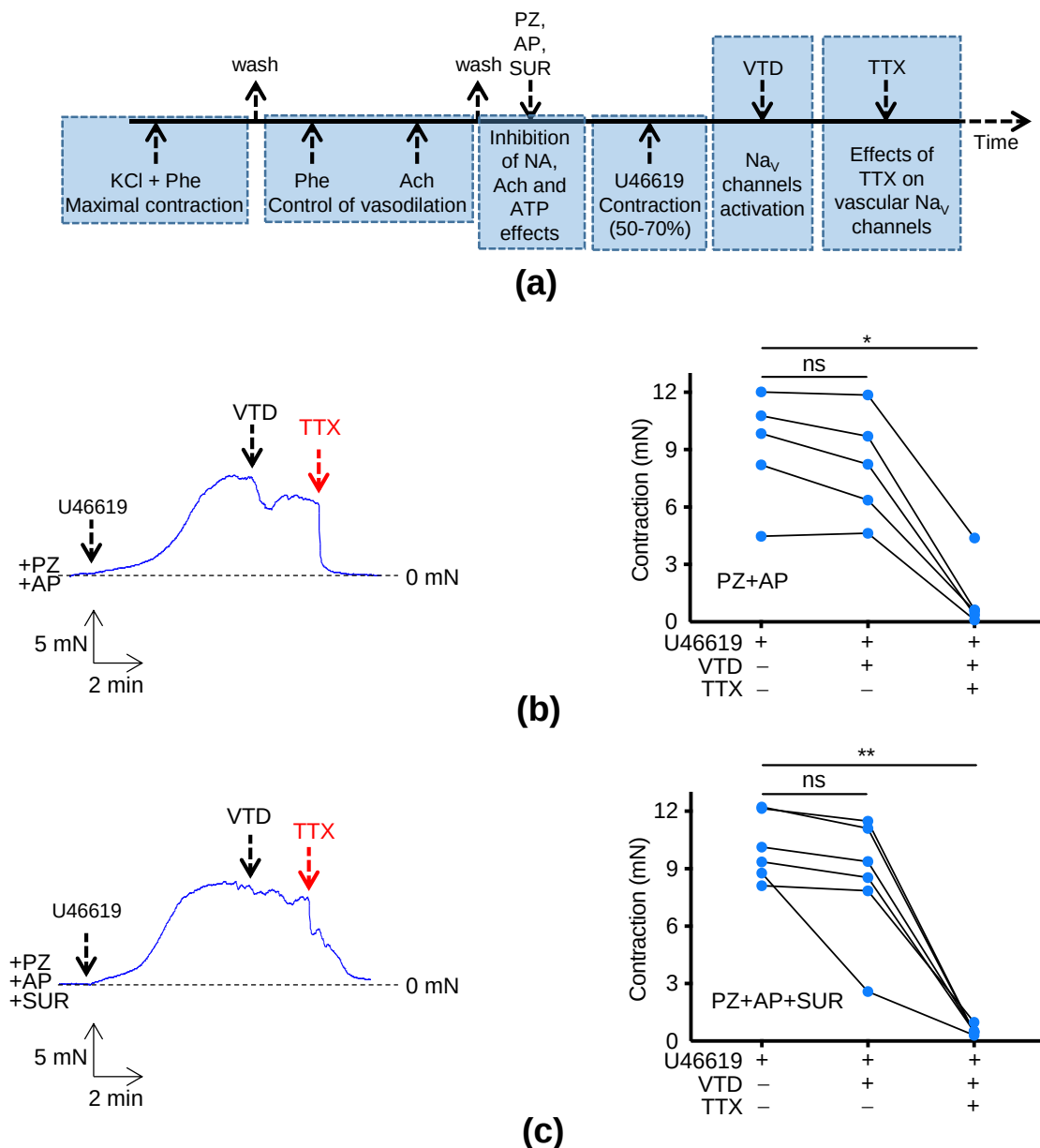


Figure 4. TTX induces vasorelaxation of mesenteric arteries. (a) The flow chart illustrates the experimental strategy used to unmask the effect of TTX on isolated CA of male C57Bl/6J mice. (b) The left panel shows a representative myograph trace, illustrating TTX-induced vasorelaxation, after treatment with PZ, AP, U46619, and VTD. (c) The left panel shows a representative myograph trace, illustrating TTX-induced vasorelaxation in the presence of SUR. As in (b), CA was treated with PZ, AP, U46619, and VTD. (b,c) The graphs on right represent connected scatter plot of individual values (contraction levels in mN) for each artery. Significance of differences between groups was evaluated with Friedman test (ns: not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

2.3. Effects of TTX on Dilation Capacity of Murine Mesenteric Arteries

In order to investigate the effects of TTX on endothelial-mediated dilation, we performed arteriography experiments on isolated FOMA and CA (Figure 5). For each artery, the initial contraction level induced by Phe was not significantly different in the presence or the absence of TTX (Figure 5a,b; left panels). As expected, CA and FOMA progressively developed flow-mediated dilation (FMD) from 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ to 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figure 5a,b; right panels). Interestingly, we observed that TTX significantly potentiated FMD responses of both CA and FOMA. TTX induced a significant potentiation ($p < 0.05$) of the dilation capac-

ity from 6 to 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 6 to 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ for CA and FOMA, respectively (Figure 5a,b; right panels). For CA, the highest potentiation of TTX-induced dilation was observed at 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ compared to the control (2.9-fold, $p < 0.05$). Concerning FOMA, TTX potentiated dilation up to 2.7-fold (Figure 5a,b; right panels). In conclusion, TTX potentiates FMD of CA and FOMA, revealing the contribution of vascular Na_V channels to vascular tone regulation in response to flow increase.

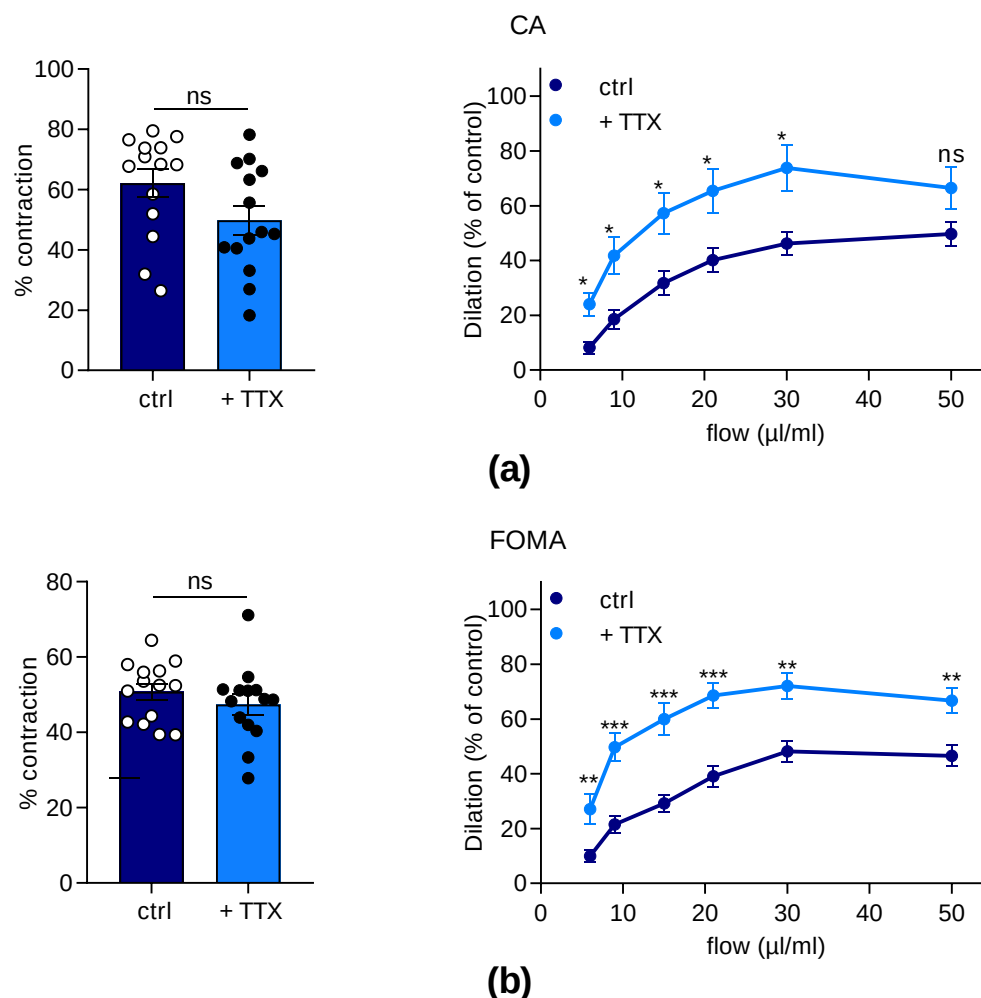


Figure 5. Effects of TTX on flow-mediated dilation of mesenteric arteries. Flow-mediated dilation was evaluated in both CA (a) and FOMA (b) from C57Bl/6J mice by arteriography in the absence (ctrl) or the presence of 1 μM TTX (+TTX). The left panels illustrate the scatter plots of the initial contraction level induced by Phe (1 μM) before flow rate increase. Mann–Whitney test was used to compare groups. The graphs showed in the right panels illustrate the flow–dilation relationship. Significance of difference between data was analyzed by mixed effect test followed by Holm–Sidak’s comparison test ($\alpha = 0.05$). Data obtained from male ($n = 7$) and female ($n = 7$) were mixed. The values are means $\pm$ SEM ($n = 14$). ns: not significant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Discussion

In this study, we evidenced that Na_V channels are expressed at the protein level in both intima and media of arteries from C57Bl/6J mice, including the aorta and MA. We determined that *scn2a* and *scn1b* encoding $\text{Na}_\text{V}1.2$ and $\text{Na}_\text{V}\beta 1$ subunits are the major isoforms expressed in both the aorta and MA. To unmask the contribution of vascular Na_V channels to vascular tone, we pretreated isolated MA with VTD in the presence of specific antagonists to prevent the effects of neurotransmitters released in response to neuronal Na_V channel activation. In these conditions, TTX induced a total relaxation of MA. More interestingly, we found that TTX potentiates the dilation response to increasing

flows. Thus, our data bring novel evidence that vascular Na_V channels contribute to the vascular tone and FMD, which could explain why TTX induces severe hypotension after tetrodotoxification.

Our data showed that Na_V channels are expressed in both endothelium and media of murine FOMA and CA in agreement with previous investigations performed on murine cremaster arteries [13], human subcutaneous arterioles [21], and human uterine arteries [15]. Our RT-qPCR data indicate that *scn2a*, encoding $\text{Na}_V1.2$, is the most abundant Na_V channel α -subunit gene expressed in both aorta and MA. This observation agrees with the immunodetection of a protein with similar molecular weight detected in the brain by Western blot and other reports. The Na_V channel gene, *scn2a* is also well expressed in mouse cremaster [13] and femoral arteries, the MA and aorta from rats [6,9]. However, in humans, *scn9a* encoding $\text{Na}_V1.7$ is the vascular Na_V channel isoform expressed in both uterine arteries and subcutaneous arterioles [15,21], but this subtype has not been detected in our mouse arteries. The *scn3a* transcript, encoding $\text{Na}_V1.3$, is present in the aorta, but at a low level, suggesting that this subtype could be weakly expressed at the protein level. The same conclusion can be made for the *scn5a* transcript, encoding the cardiac $\text{Na}_V1.5$, detected only in MA. Further experiments would be necessary to confirm the expression of these two Na_V channel subtypes. Indeed, low transcript expression level does not always reflect that of protein. However, the validation of Western blot or immunolocalization of a particular Na_V channel subtype with specific antibodies requires the use of negative controls, such as a knock-out mouse. The 250 kDa protein immunodetected in the aorta and MA could be a different glycosylated form of the $\text{Na}_V1.2$ channel or a shorter spliced variant (isoform X2, GenBank: XP_006498646.1).

We also showed that *scn1b* encoding the $\text{Na}_V\beta1$ subunit is the most abundant β -subunit expressed in both murine aorta and MA. In addition, *scn2b* and *scn3b* are also expressed but to a much lower extent. Indeed, the expression of $\text{Na}_V\beta$ subunits has hardly ever been studied in arteries, but similar to our data, *scn1b*, *scn2b*, and *scn3b* expressions have been reported in rat aorta [6], while *scn1-4b* are expressed in human uterine arteries [15]. Altogether, it seems that the expression profile of the Na_V channel gene in arteries is different in rodents and humans. Rodent arteries predominantly express *scn2a*, encoding $\text{Na}_V1.2$, while human arteries mainly express *scn3a* and *scn9a*, encoding $\text{Na}_V1.3$ and $\text{Na}_V1.7$ subtypes, respectively.

We brought evidence that TTX caused full arterial relaxation, unmasking the contribution of arterial Na_V channels to vascular tone regulation. This effect was induced at a relatively low concentration of TTX (1 μM), suggesting that TTX-induced vasorelaxation is mainly mediated by TTX-S Na_V channels. So far, the contribution of Na_V channels to contraction has been explored by a pharmacological approach using VTD on isolated arteries [6,9,15,22]. However, VTD can activate all Na_V channels, including those of perivascular nerve endings, which leads to the release of neurotransmitters, such as NA, Ach, ATP, or neuropeptide Y [23], etc. In this way, the inhibition of $\alpha1$ -adrenoreceptor by PZ abolishes the VTD-induced contractile response of rat aortic rings [6] and of human uterine arteries [15], while in the presence of this antagonist, a weaker VTD-induced contractile response is still seen in MA from rat [9]. In our study, we showed for the first time that TTX can induce a vasorelaxation of arteries, revealing a putative contribution of Na_V channels expressed in VSMC and/or EC to vascular tone regulation.

The mechanosensitivity of Na_V channels is supported by strong evidence that membrane deformations can trigger Na_V channel activation [24–26]. Moreover, this response is regulated by both $\text{Na}_V\beta1$ and $\text{Na}_V\beta3$ subunits [27]. Interestingly, we found that TTX induces a potent relaxation of pressurized murine MA, revealing the contribution of Na_V channels to arterial mechanotransduction response to shear stress. Hence, we hypothesize that Na_V channels are activated in VSMC in pressurized arteries and likely contribute to developing myogenic tone by mechanotransduction in physiological conditions [28]. Further experiments on isolated VSMC would help to show whether the electrophysiological properties of Na_V channels could be modulated by mechanical stimulation. Then,

if Na_V channel stimulation induces a Ca^{2+} increase in VSMC and subsequent increase of myogenic tone, its blockade by TTX would lead to vasorelaxation. The contribution of Na_V channels to the crosstalk between Na^+ and Ca^{2+} homeostasis has been clearly demonstrated in human coronary myocytes in which VTD triggers Ca^{2+} increase [11].

On the other hand, the vasorelaxant effects of TTX could also be mediated by its binding to endothelial Na_V channels and, thus, by inducing vasodilator factor release. Our data from arteriography clearly suggest that they contribute to the shear stress response. Indeed, it has been shown that Na_V channels expressed in HUVEC are activated by shear stress, which in turn could lead to a Ca^{2+} increase through NCX [16]. However, subsequent intracellular Ca^{2+} increase by Na_V channel activation has not been proven in EC. In HUVEC stimulated by VEGF, it has been shown that TTX induces an intracellular Ca^{2+} increase [14]. Since the increase of intracellular Ca^{2+} is an important pathway of NO synthase activation [29], this mechanism could be involved in the vasorelaxant effects of TTX observed in MA in response to flow increase. In addition, the activation of Na_V channels by shear stress limits Erk1/2 phosphorylation [14]. Since Erk1/2 could favor eNOS activation, this could explain why TTX increases vasodilation. However, the regulation of eNOS by Erk1/2 is controversial [30,31]. Further experiments are required to evaluate this hypothesis with isolated EC.

More recently, it has been shown that TTX suppresses a spontaneous contractile oscillation (vasomotion) of human uterine arteries under hypoxia, showing the contribution of Na_V channels to vasomotion through an electrogenic action in VSMC [15]. This assumption is reinforced by other data showing that TTX strongly reduces the upstroke of action potential induced by electrical stimulation in arteriolar SMC from murine skeletal muscle [32]. Hence, VSMC Na_V channels might be electrically activable and likely participate in the membrane depolarization leading to sarcolemmal Ca^{2+} entry and subsequent arterial myocyte contraction.

The effect of TTX on isolated arteries could partially explain why the arterial pressure drops down during tetrodotoxication [19]. Of course, TTX could reduce the sympathetic tone and, thus, the cardiac and vascular stimulation by decreasing NA release by sympathetic nerves and also adrenaline released by the adrenal medulla [33,34]. However, our data suggest that since TTX decreases contractility in isolated arteries, this toxin might also cause a significant reduction of total peripheral resistance and subsequent arterial hypotension, as observed during tetrodotoxication in dogs [19].

As suggested in the literature, we assume that in physiological conditions, Na_V channels are inactive or silent and do not contribute to physiological vascular responses [6,9,15]. In EC, patch clamp data indicate that Na_V channels are likely unavailable at resting potential [4,14,35], thus hyperpolarization is required to make them recover from inactivation. This could occur in tetrodotoxication, leading to hypoxia, which is known to activate K_{ATP} channels [15,36]. In VSMC, the situation is different since it has been shown that Na_V channel window currents are measurable at resting potential, suggesting their implication in action potential [5,10–12,32]. However, in isolated arteries, action potentials are insensitive to TTX in normal conditions [32]. Altogether, these data highlight that vascular Na_V channels are silent in normal conditions. Thus, since respiratory issues (dyspnea, hypoxia) occur during tetrodotoxication, this could favor the activation of these silent vascular Na_V channels.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and Reagents

TTX was from Latoxan (Valence, France). VTD was from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Sodium nitroprusside and Optical Cutting Temperature (OCT) compound were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). All other reagents, such as papaverine, Ach, Phe, PZ, AP, and SUR, were obtained from Sigma-Aldrich Merck (Saint-Louis, MO, USA). U46619 was from Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA).

4.2. Ethical Approval, Animals and Artery Preparations

All animal experiments were conducted in accordance with the European Community council directive 2010/63/EU for the care and use of laboratory animals. The experimental procedures used in this work were approved by our respective local ethical committees in addition to the French Ministry of Agriculture (N° A49007002, APAFIS#24014-202001311653562 authorization). The NC3R's ARRIVE guidelines were followed in the conducting and reporting of all experiments using animals. Five-month-old male and female mice C57Bl/6J (Janvier Labs, France) were used in this work. Animals were housed in individual cages (internal dimensions in mm: 369 × 165 × 132, L × W × H for 5 mice) in controlled temperature rooms (21–23 °C) of the Animal Facilities Unit of the Hospital University of Angers (SCAHU). They were maintained under a 12 h light/dark cycle with free access to water and food.

Animals were euthanized in a CO₂ chamber (Tem Segal, Pessac, France) with a concentration gradient: a first phase was carried out by mixing air with CO₂ for 1 min with a flow rate of 10 L/min, and death was induced by pure CO₂ for 1 min with a flow rate of 10 L/min. Then, aorta and MA were quickly harvested and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS, in mM: NaCl, 130; KCl, 3.7; MgSO₄(7H₂O), 1.2; NaHCO₃, 14.9; CaCl₂(2H₂O), 1.6; HEPES, 5; KH₂PO₄, 1.2; and D-glucose, 11). The pH of PSS was adjusted at 7.4 (pO₂ 160 mmHg and pCO₂ 37 mmHg). Adherent tissues of arteries were manually removed by the same experimenter. For immunohistochemical characterization, several segments of MA (Figure 1a) and aorta (Figure 2a) were conserved at −80 °C in embedding medium (OCT compound). To characterize the Nav channel expression by RT-qPCR, arteries were stored at −20 °C in Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Germany). For myography and arteriography, freshly harvested MA was used.

4.3. Western Blot

CA and FOMA were isolated from 5-month-old C57Bl/6J males. To extract total proteins, arterial tissues were ground in liquid nitrogen and then lysed in 50 µL of 1% SDS extraction buffer (1% SDS, 10 mM Tris-base, 5 mM EDTA and protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific)). After homogenization for 30 min at 8 °C, the sample was centrifuged at 14,000 × g at 10 °C for 20 min. Supernatant protein quantity was determined using the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). A total of 10 µg of extracted proteins were separated by SDS-PAGE (8% polyacrylamide gel) and transferred to a nitrocellulose membrane. Tris-buffered saline solution (0.1% Tween and 5% BSA) was used for 90 min to block the non-specific binding sites. Next, the membranes were incubated with the rabbit anti-PanNav primary antibody (1:500, ASC-003, Alomone Labs) overnight at 4 °C. The anti-HSC70 primary antibodies (1:10,000, SC-7298, Santa Cruz Biotechnology) were used as a loading control. After washing, the membranes were incubated with the anti-rabbit secondary antibodies conjugated to horse-radish peroxidase (1:5000, Thermo Fisher Scientific) for 90 min. Proteins were revealed using Pierce ECL Western Blotting Substrate kit (Thermo Fisher Scientific) by LAS-3000 imager (Fuji, Tokyo, Japan). The image acquisition was performed with Image Labs (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.4. Immunohistochemistry

Aorta and MA (from males) frozen in embedding medium were transversally cryosectioned at 10 or 12 µm thick by Cryostat (Leica) at −25 °C. Artery slices were transferred to SuperFrostPlus slides (Thermo Fisher Scientific, USA) and dried at room temperature. Immunofluorescence staining is processed using the rabbit primary anti-PanNav (1:200, ASC-003, Alomone labs) or the rabbit primary anti-Navβ1 (1:100, ASC-041, Alomone labs), and/or the rabbit primary anti-PECAM1 antibodies (anti-CD31 labeled with FITC, 1:50, eBioscience, San Diego, CA, USA) overnight at 4 °C. Nuclei were stained with DAPI 10 µg/mL (Molecular probes, Invitrogen). After washing, arteries were incubated with Alexa fluor 568 conjugated goat anti-rabbit antibodies (1:200, Invitrogen) for 3 h. After washing, the aqueous mounting medium (Fluoromount, Sigma-Aldrich Merck, Saint-

Quentin-Fallavier, France) was used before placing a lamella on slide. Fluorescent staining was visualized using a confocal microscope Nikon Eclipse TE2000-S. The imaging acquisition was performed with Metamorph software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Negative control experiments excluding the primary antibody were performed to verify the specificity of the immunofluorescence labeling.

4.5. RNA Extraction and RT-qPCR

Total RNAs were extracted from arteries using the RNeasy micro kit (Qiagen) as described, previously [37]. At least 300 ng (up to 1 µg, depending on RNA extraction yield) of total RNA were used for cDNA synthesis using random hexamers and the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). RT-qPCR experiments were run on a LightCycler 480 Instrument II (Roche, Meylan, France) using Sybr[®] Select Master Mix (Applied Biosystems[®]). PCR was performed with 6 ng of cDNA in duplicate and Nav channel gene-specific primers (Table 2), which were designed using the Primer3 Software (<https://github.com/primer3-org>, accessed on 21 February 2023). Differences in transcript expression levels were determined using the cycle threshold method, as described earlier [38]. Peak-melting curve was performed at the end of the amplification process to check amplification specificity, and amplicon sizes were verified by agarose gel electrophoresis. For absolute quantification method, synthetic cDNA spanning each PCR amplicons were cloned into pUC57 or its derivatives. All cDNA sequences were verified by sequencing (DNA sequencing facility of Angers CHU) and compared to those available in the GenBank. For absolute quantification, cDNA copies were evaluated using the calibration curve method, which consists in the recombinant double-stranded plasmid DNA molecule determination as already described [39]. The cDNA copy numbers of 8 dilutions of pure plasmids were used to build the calibration curves for each gene, allowing PCR efficiency determination (~100% for each gene). Data from male ($n = 5$ –6) and female ($n = 6$) were grouped.

Table 2. Sequence of primers used for RT-qPCR.

Gene Name	GenBank Accession Number	Forward Primer (5′–3′)	Reverse Primer (5′–3′)
<i>scn1a</i>	NM_018733.2	ttgcaaggggcttctgttta	aggtccacaaactccgtcac
<i>scn2a</i>	NM_001099298.2	gggttgcataatggtttcaa	cccaaggcatttgacagta
<i>scn3a</i>	NM_018732.3	tcctcagtagtggtgctttgg	gatgtaagtgaagactttgtcagca
<i>scn4a</i>	NM_133199.2	gaaaaccatcacggtcatcc	tccgagagcttttcacagac
<i>scn5a</i>	NM_021544.4	gccagatctctatggcaacc	ttgcccttattcagcacgat
<i>scn8a</i>	NM_001077499.2	ctggtgctggttgacttc	gccagggcattagctataa
<i>scn9a</i>	NM_001290674.1	gctgagcctatcaatgcaga	acttggcagcatggaatct
<i>scn10a</i>	NM_001205321.1	tgggtagcttatggctcaaa	ctatgaggcttgtagggaga
<i>scn11a</i>	NM_011887.3	ttcataatgtgtggcaactgg	ttattgcacgtggaaccatc
<i>nos3</i>	NM_008713.4	ccagtgcctgcttcac	gcagggcaagtaggatcag
<i>pecam1</i>	NM_008816.3	ccagtgcctgcttcac	gcagggcaagtaggatcag

4.6. Myography

CA was macrodissected under microscope from MA of 5-month-old male mice (Figure 1a). Arterial rings of 2 mm length were mounted in a Mulvany–Halpern-type wire myograph (Danish MyoTechnology, DMT, Aarhus, Denmark). Then, 2 tungsten wires with 40 µm diameter were inserted into the arterial lumen and fixed to a micrometer and a force transducer. Arterial segments were bathed in a 5 mL PSS maintained at 37 °C and pH of 7.4 (pO₂ 160 mmHg and pCO₂ 37 mmHg). Arterial wall tension was normalized, and then, arteries were stabilized for 40 min. To evaluate the maximal contractile capacity, a K⁺ rich PSS (80 mM) with 3 µM Phe was used. To control the endothelial integrity, contraction

was induced with 2 μ M Phe, and then, 2 μ M Ach was added to elicit vasorelaxation. Two cocktails of antagonists were then added in order to prevent any effects of neurotransmitter release (NA, Ach, and ATP) by terminal nerve endings: 1 μ M PZ with 100 nM AP (PZ + AP) or 1 μ M PZ with 100 nM AP with 100 μ M SUR (PZ + AP + SUR). Afterwards, U46619 (10 to 80 nM, thromboxane A2 analogue) was applied to reach 50 to 70% of maximal contraction, followed by VTD at 30 μ M. After the stabilization of VTD-induced effects, TTX was added to the bath. Since both TTX-S and TTX-R Na_V channel gene transcripts have been detected by RT-qPCR in MA, we chose 1 μ M TTX in order to affect both kinds of Na_V channels. At this concentration, we expected partial effects if TTX-R Na_V channels would contribute to arterial response or a full response mediated by TTX-S Na_V channels.

4.7. Arteriography

MA was harvested from 5-month-old male and female mice. CA and FOMA (Figure 1a) were cannulated at both ends on glass microcannulas mounted in a video-monitored perfusion system [40] (Living System, LSI, Burlington, VT, USA). Each artery segment was bathed in a 10 mL PSS maintained at 37 °C and at pH of 7.4 (pO_2 160 mmHg and pCO_2 37 mmHg). The perfusion of the arteries was monitored with two peristaltic pumps, one controlling the flow rate and the other under the control of a pressure-servo control system. The pressure was set at 75 mmHg. Contraction to Phe (1 μ M) and dilation to Ach (1 μ M) were assessed. Afterwards, to evaluate FMD, we contracted the arteries with Phe (1 μ M) under 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ and then, increased flow (6 to 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) by steps. To investigate the involvement of Na_V channels in FMD, the experiments were carried out in the absence or the presence of TTX (1 μ M). In the end, contractile response to KCl (80 mM) was tested, and arteries were bathed in a Ca^{2+} -free PSS with sodium nitroprusside (10 μ M) and papaverine (100 μ M). Pressure steps from 10 to 125 mmHg were performed to determine the passive diameter of the arteries. Data from male ($n = 7$) and female ($n = 7$) were grouped since no significant difference was found between both genders.

4.8. Data Acquisition and Analyses

The recording of myography and arteriography data was performed with AcqKnowledge software (Biopac, Goleta, CA, USA). Statistical analysis and graphs were made with GraphPad Prism 7.02 software (La Jolla, CA, USA). The non-parametric Mann–Whitney test, Friedman, and two-way ANOVA (mixed effect model) analysis followed by Holm–Sidak’s multiple comparison tests were used when appropriated (ns: not significant, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$, **** for $p < 0.0001$). Data were shown as mean $\pm$ SEM. Since no significant differences by appropriate statistical tests (Mann–Whitney or multiple t -tests corrected using the Holm–Sidak method) were observed between females and males, the data from both genders (RT-qPCR, myography, and arteriography) were pooled.

5. Conclusions

Na_V channels are expressed in murine aorta and MA, in both endothelium and media. The Na_V channel genes *scn2a* and *scn1b* are the most abundant transcripts, indicating that murine arterial Na_V channels contain $\text{Na}_V1.2$ channel with $\text{Na}_V\beta1$. TTX strongly decreases contractile responses of MA, a model of resistance arteries, and increases their dilation responses to flow. This reveals the contribution of vascular Na_V channels to vascular tone regulation and could explain the decrease of total peripheral resistance during mammal tetrodotoxification.

Author Contributions: Conceptualization, C.L. (Christian Legros); methodology, C.L. (Claire Legendre) and C.L. (Christian Legros); formal analysis, J.P.; investigation, J.P., C.P., L.R., E.V., W.E., J.F., G.K., J.B. and C.L. (Claire Legendre); writing—original draft preparation, C.L. (Christian Legros) and J.P.; writing—review and editing, C.M. (César Mattei), H.T.-L., G.K., D.H., C.L. (Christian Legros) and C.L. (Claire Legendre); supervision, C.L. (Christian Legros); project administration, C.L. (Christian Legros); funding acquisition, C.L. (Christian Legros). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the “Region Pays de la Loire, Paris scientifique 2017, SODI-VASC”. J.P. was a recipient Ph.D. fellowship from this grant.

Institutional Review Board Statement: All animal experiments were conducted in accordance with the European Community council directive 2010/63/EU for the care and use of laboratory animals. The experimental procedures used in this work were approved by our respective local ethical committees in addition to the French Ministry of Agriculture (N° A49007002, APAFIS#24014-202001311653562 authorization). The NC3R’s ARRIVE guidelines were followed in the conduct and reporting of all experiments using animals.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are grateful to Vincent Paillé and Céline Marionneau for helpful discussions during this work. We also thank Anne-Laure Guihot, Agnès Barbelivien, and Louis Gourdin for their help during this work.

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

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

Ach	acetylcholine
AP	atropine
CA	ceccocolic artery
EC	endothelial cell
eNOS	endothelial NO synthase
FMD	flow-mediated dilation
FOMA	first-order mesenteric artery
MA	mesenteric artery
NA	noradrenaline
Na _v channel	voltage-gated Na ⁺ channel
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
Phe	phenylephrine
PSS	physiological salt solution
PZ	prazosin
SUR	suramin
TTX	tetrodotoxin
TTX-R	resistant to tetrodotoxin
TTX-S	sensitive to tetrodotoxin
VSMC	vascular smooth muscle cell
VTD	veratridine

References

1. Catterall, W.A.; Goldin, A.L.; Waxman, S.G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 397–409. [\[CrossRef\]](#)
2. Black, J.A.; Waxman, S.G. Noncanonical Roles of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* **2013**, *80*, 280–291. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Okabe, K.; Kitamura, K.; Kuriyama, H. The Existence of a Highly Tetrodotoxin Sensitive Na Channel in Freshly Dispersed Smooth Muscle Cells of the Rabbit Main Pulmonary Artery. *Pflüg. Arch.* **1988**, *411*, 423–428. [\[CrossRef\]](#)
4. Walsh, K.B.; Wolf, M.B.; Fan, J. Voltage-Gated Sodium Channels in Cardiac Microvascular Endothelial Cells. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **1998**, *274*, H506–H512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Cox, R.H.; Zhou, Z.; Tulenko, T.N. Voltage-Gated Sodium Channels in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *JVR* **1998**, *35*, 310–317. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Fort, A.; Cordaillat, M.; Thollon, C.; Salazar, G.; Mechaly, I.; Villeneuve, N.; Vilaine, J.-P.; Richard, S.; Virsolvy, A. New Insights in the Contribution of Voltage-Gated Nav Channels to Rat Aorta Contraction. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Meguro, K.; Iida, H.; Takano, H.; Morita, T.; Sata, M.; Nagai, R.; Nakajima, T. Function and Role of Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.7 Expressed in Aortic Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2009**, *296*, H211–H219. [\[CrossRef\]](#)
8. Quignard, J.F.; Ryckwaert, F.; Albat, B.; Nargeot, J.; Richard, S. A Novel Tetrodotoxin-Sensitive Na⁺ Current in Cultured Human Coronary Myocytes. *Circ. Res.* **1997**, *80*, 377–382. [\[CrossRef\]](#)

9. Ho, W.-S.V.; Davis, A.J.; Chadha, P.S.; Greenwood, I.A. Effective Contractile Response to Voltage-Gated Na⁺ Channels Revealed by a Channel Activator. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2013**, *304*, C739–C747. [\[CrossRef\]](#)
10. Berra-Romani, R.; Blaustein, M.P.; Matteson, D.R. TTX-Sensitive Voltage-Gated Na⁺ Channels Are Expressed in Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2005**, *289*, H137–H145. [\[CrossRef\]](#)
11. Boccara, G.; Choby, C.; Frapier, J.M.; Quignard, J.F.; Nargeot, J.; Dayanithi, G.; Richard, S. Regulation of Ca²⁺ Homeostasis by Atypical Na⁺ Currents in Cultured Human Coronary Myocytes. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 606–613. [\[CrossRef\]](#)
12. Platoshyn, O.; Remillard, C.V.; Fantozzi, I.; Sison, T.; Yuan, J.X.-J. Identification of Functional Voltage-Gated Na(+) Channels in Cultured Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Pflüg. Arch.* **2005**, *451*, 380–387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Figueroa, X.F.; Chen, C.-C.; Campbell, K.P.; Damon, D.N.; Day, K.H.; Ramos, S.; Duling, B.R. Are Voltage-Dependent Ion Channels Involved in the Endothelial Cell Control of Vasomotor Tone? *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H1371–H1383. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Andrikopoulos, P.; Fraser, S.P.; Patterson, L.; Ahmad, Z.; Burcu, H.; Ottaviani, D.; Diss, J.K.J.; Box, C.; Eccles, S.A.; Djamgoz, M.B.A. Angiogenic Functions of Voltage-Gated Na⁺ Channels in Human Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 16846–16860. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Virsolvy, A.; Fort, A.; Erceau, L.; Charrabi, A.; Hayot, M.; Aimond, F.; Richard, S. Hypoxic Conditions Promote Rhythmic Contractile Oscillations Mediated by Voltage-Gated Sodium Channels Activation in Human Arteries. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2570. [\[CrossRef\]](#)
16. Traub, O.; Ishida, T.; Ishida, M.; Tupper, J.C.; Berk, B.C. Shear Stress-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation Is Regulated by Sodium in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20144–20150. [\[CrossRef\]](#)
17. Duran-Riveroll, L.M.; Cembella, A.D. Guanidinium Toxins and Their Interactions with Voltage-Gated Sodium Ion Channels. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 303. [\[CrossRef\]](#)
18. Katikou, P.; Gokbulut, C.; Kosker, A.R.; Campàs, M.; Ozogul, F. An Updated Review of Tetrodotoxin and Its Peculiarities. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Zimmer, T. Effects of Tetrodotoxin on the Mammalian Cardiovascular System. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 741–762. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Flachsenberger, W.A. Respiratory Failure and Lethal Hypotension Due to Blue-Ringed Octopus and Tetrodotoxin Envenomation Observed and Counteracted in Animal Models. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1986**, *24*, 485–502. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Rice, F.L.; Albrecht, P.J.; Wymer, J.P.; Black, J.A.; Merckies, I.S.; Faber, C.G.; Waxman, S.G. Sodium Channel Nav1.7 in Vascular Myocytes, Endothelium, and Innervating Axons in Human Skin. *Mol. Pain* **2015**, *11*, 26. [\[CrossRef\]](#)
22. Shinjoh, M.; Nakaki, T.; Otsuka, Y.; Sasakawa, N.; Kato, R. Vascular Smooth Muscle Contraction Induced by Na⁺ Channel Activators, Veratridine and Batrachotoxin. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *205*, 199–202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Aalkjær, C.; Nilsson, H.; De Mey, J.G.R. Sympathetic and Sensory-Motor Nerves in Peripheral Small Arteries. *Physiol. Rev.* **2021**, *101*, 495–544. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Morris, C.E. Voltage-Gated Channel Mechanosensitivity: Fact or Friction? *Front. Physiol.* **2011**, *2*, 25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Strege, P.R.; Mercado-Perez, A.; Mazzone, A.; Saito, Y.A.; Bernard, C.E.; Farrugia, G.; Beyder, A. SCN5A Mutation G615E Results in Na_v 1.5 Voltage-Gated Sodium Channels with Normal Voltage-Dependent Function yet Loss of Mechanosensitivity. *Channels* **2019**, *13*, 287–298. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Körner, J.; Meents, J.; Machtens, J.-P.; Lampert, A. B1 Subunit Stabilises Sodium Channel Nav1.7 against Mechanical Stress: Nav B1 Subunit as Mechanical Stabiliser. *J. Physiol.* **2018**, *596*, 2433–2445. [\[CrossRef\]](#)
27. Maroni, M.; Körner, J.; Schüttler, J.; Winner, B.; Lampert, A.; Eberhardt, E. B1 and B3 Subunits Amplify Mechanosensitivity Of the Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5. *Pflüg. Arch.-Eur. J. Physiol.* **2019**, *471*, 1481–1492. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Cheng, J.; Wen, J.; Wang, N.; Wang, C.; Xu, Q.; Yang, Y. Ion Channels and Vascular Diseases. *ATVB* **2019**, *39*, e146–e156. [\[CrossRef\]](#)
29. Förstermann, U.; Sessa, W.C. Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 829–837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Rafikov, R.; Fonseca, F.V.; Kumar, S.; Pardo, D.; Darragh, C.; Elms, S.; Fulton, D.; Black, S.M. ENOS Activation and NO Function: Structural Motifs Responsible for the Posttranslational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. *J. Endocrinol.* **2011**, *210*, 271–284. [\[CrossRef\]](#)
31. Cale, J.M.; Bird, I.M. Inhibition of MEK/ERK1/2 Signalling Alters Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity in an Agonist-Dependent Manner. *Biochem. J.* **2006**, *398*, 279–288. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Ulyanova, A.V.; Shirokov, R.E. Voltage-Dependent Inward Currents in Smooth Muscle Cells of Skeletal Muscle Arterioles. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194980. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Kilpatrick, D.L.; Slepatis, R.; Kirshner, N. Inhibition of Catecholamine Secretion from Adrenal Medulla Cells by Neurotoxins and Cholinergic Antagonists. *J. Neurochem.* **1981**, *37*, 125–131. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Dahlöf, C.; Linton-Dahlöf, P.; Lundberg, J.M. Tetrodotoxin-Sensitive Release of Adrenaline, Noradrenaline and Neuropeptide Y-like Immunoreactivity in the Pithed Guinea-Pig in the Absence of Electrical Preganglionic Nerve Stimulation. *J. Neurosci. Methods* **1994**, *52*, 215–218. [\[CrossRef\]](#)
35. Gordienko, D.V.; Tsukahara, H. Tetrodotoxin-Blockable Depolarization-Activated Na⁺ Currents in a Cultured Endothelial Cell Line Derived from Rat Interlobar Arter and Human Umbilical Vein. *Pflüg. Arch.* **1994**, *428*, 91–93. [\[CrossRef\]](#)
36. Aziz, Q.; Li, Y.; Tinker, A. Endothelial Biology and ATP-Sensitive Potassium Channels. *Channels* **2018**, *12*, 45–46. [\[CrossRef\]](#)

37. Vessieres, E.; Guihot, A.-L.; Grimaud, L.; Rivron, J.; Arnal, J.-F.; Loufrani, L.; Henrion, D. Estrogens and the Angiotensin II Type 2 Receptor Control Flow-Mediated Outward Remodeling in the Female Mouse Mesenteric Artery. *J. Vasc. Res.* **2021**, *58*, 16–26. [[CrossRef](#)]
38. Morrison, T.B.; Weis, J.J.; Wittwer, C.T. Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR Green I Monitoring during Amplification. *Biotechniques* **1998**, *960*, 962.
39. Lee, C.; Kim, J.; Shin, S.G.; Hwang, S. Absolute and Relative QPCR Quantification of Plasmid Copy Number in Escherichia Coli. *J. Biotechnol.* **2006**, *123*, 273–280. [[CrossRef](#)]
40. Henrion, D.; Terzi, F.; Matrougui, K.; Duriez, M.; Boulanger, C.M.; Colucci-Guyon, E.; Babinet, C.; Briand, P.; Friedlander, G.; Poitevin, P.; et al. Impaired Flow-Induced Dilation in Mesenteric Resistance Arteries from Mice Lacking Vimentin. *J. Clin. Investig.* **1997**, *100*, 2909–2914. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Membrane estrogen receptor alpha (ER α) participates in flow-mediated dilation in a ligand-independent manner

Julie Favre^{1†}, Emilie Vessieres^{1,2†}, Anne-Laure Guihot^{1,2}, Coralynne Proux^{1,2}, Linda Grimaud¹, Jordan Rivron^{1,2}, Manuela CL Garcia^{1,2}, Léa Réthoré¹, Rana Zahreddine³, Morgane Davezac³, Chanaelle Fébrissy³, Marine Adlanmerini³, Laurent Loufrani^{1,4}, Vincent Procaccio^{1,4}, Jean-Michel Foidart⁵, Gilles Flouriot⁶, Françoise Lenfant³, Coralie Fontaine³, Jean-François Arnal³, Daniel Henrion^{1,2,4*}

¹Angers University, MITOVASC, CNRS UMR 6015, INSERM U1083, Angers, France;

²CARFI facility, Angers University, Angers, France; ³INSERM U1297, Paul Sabatier University (Toulouse III), University Hospital (UHC) of Toulouse, Toulouse, France;

⁴University Hospital (CHU) of Angers, Angers, France; ⁵Groupe Interdisciplinaire de Génomprotéomique Appliquée, Université de Liège, Liège, Belgium; ⁶INSERM U1085, IRSET (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail), University of Rennes, Rennes, France

Abstract: Estrogen receptor alpha (ER α) activation by estrogens prevents atheroma through its nuclear action, whereas plasma membrane-located ER α accelerates endothelial healing. The genetic deficiency of ER α was associated with a reduction in flow-mediated dilation (FMD) in one man. Here, we evaluated ex vivo the role of ER α on FMD of resistance arteries. FMD, but not agonist (acetylcholine, insulin)-mediated dilation, was reduced in male and female mice lacking ER α (*Esr1*^{-/-} mice) compared to wild-type mice and was not dependent on the presence of estrogens. In C451A-ER α mice lacking membrane ER α , not in mice lacking AF2-dependent nuclear ER α actions, FMD was reduced, and restored by antioxidant treatments. Compared to wild-type mice, isolated perfused kidneys of C451A-ER α mice revealed a decreased flow-mediated nitrate production and an increased H₂O₂ production. Thus, endothelial membrane ER α promotes NO bioavailability through inhibition of oxidative stress and thereby participates in FMD in a ligand-independent manner.

***For correspondence:**
daniel.henrion@univ-angers.fr

[†]These authors contributed equally to this work

Competing interest: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 21

Received: 23 March 2021

Accepted: 26 November 2021

Published: 29 November 2021

Reviewing Editor: Noriaki Emoto, Kobe Pharmaceutical University, Japan

© Copyright Favre et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Editor's evaluation

Using multiple genetically modified mouse models, the authors have demonstrated a novel role of membrane associated estrogen receptor alpha (ER α) signaling to modulate flow-mediated dilation (FMD) in a ligand-independent manner. Specifically, the results indicate that non-nuclear actions of membrane estrogen receptor α in endothelial cells support flow-mediated vasodilatation in animals of both sexes via mechanisms that are independent of estrogenic ligands, involving NO production and an attenuation of the NO-inactivating effects of reactive oxygen species. These findings highlight a novel role of ligand-independent activation of membrane estrogen receptor α in regulation of vascular physiology and possibly in disease, adding to the recently introduced paradigm shift in the understanding of estrogen and estrogen receptor function.

Introduction

Resistance arteries are the small blood vessels located upstream of capillaries. Alteration of their structures or functions can raise capillary pressure, which exacerbates organ damage due to cardio- and cerebro-vascular risk factors and associated organ disorders. The basal tone of resistance arteries allows for tight control of local blood flow. This tone results from the interaction between pressure-induced smooth muscle contraction and flow-mediated dilation (FMD) due to the activation of endothelial cells by shear stress. FMD measured in the human forearm depends mainly on the acute production of NO by endothelial cells in response to an acute increase in shear stress (Joannides et al., 1995; Green et al., 2014; Zhou et al., 2014) and reduced FMD is a hallmark of endothelium dysfunction (Zhou et al., 2014; Rizzoni and Agabiti Rosei, 2006; Stoner and Sabatier, 2012).

Epidemiological investigations have shown that, prior to menopause, women are less affected by cardiovascular disorders than men (Simoncini, 2009; Arnal et al., 2017). Estrogens protect against atherosclerosis (Billon-Galés et al., 2009) and neointimal proliferation (Smirnova et al., 2015), and accelerate re-endothelialization of injured arteries (Brouchet et al., 2001). Numerous actions of 17-beta-estradiol (E2) are mediated by estrogen receptor alpha (ER α), which acts in the nucleus as a transcription factor. E2 is strongly involved in the outward remodelling of the uterine blood vessels during pregnancy (Mandala and Osol, 2012). Indeed, we have previously shown that E2 and ER α , and more precisely its nuclear activating function AF2, are both essential for the arterial outward remodeling induced by a chronic rise in blood flow in vivo (Tarhouni et al., 2013; Tarhouni et al., 2014a; Tarhouni et al., 2014b).

However, a subpopulation of ER α is also associated with the plasma membrane and activates non-nuclear signaling (Arnal et al., 2017; Banerjee et al., 2014; Lu et al., 2017). The acute effect initially described in 1967 was a rapid increase in AMPc production in the rat uterus in response to E2 (Szego and Davis, 1967). E2 binding to the plasma membrane was subsequently reported in endometrial cells and hepatocytes (Pietras and Szego, 1977), suggesting that a fraction of ER α could be located to the membrane and contributes to the rapid effects of E2, possibly through the rapid activation of G proteins and kinases such as ERK1-2, PI3K, or P21ras (Arnal et al., 2017). In ovine fetal pulmonary artery endothelial cells, E2 stimulates eNOS activity through activation of ER α leading to increased intracellular Ca²⁺ within minutes (Lantin-Hermoso et al., 1997). By contrast, in HUVECs, E2 induces a rapid production of NO and cGMP independent of an increase in intracellular Ca²⁺ (Caulin-Glaser et al., 1997). This rapid nongenomic activation of eNOS involves Akt/PKB (Florian et al., 2004) and MAP kinase-dependent mechanisms (Chen et al., 1999). Estradiol-induced endothelium-independent dilation was also described in canine coronary arteries (Sudhir et al., 1995) and in rat cerebral microvessels (Florian et al., 2004). This dilation is also mediated by ER α located at the level of the plasma membrane. Using a mouse model lacking membrane-associated ER α , we demonstrated that the acute vasodilator effect of E2 and its accelerative effect on re-endothelialization are mediated by membrane-associated ER α (Adlanmerini et al., 2014; Zahreddine et al., 2021). On the other hand, E2 exerts protective effects against atheroma, angiotensin 2-induced hypertension, and neointimal hyperplasia through its nuclear effects (Guivarc'h et al., 2018).

The 7-transmembrane G-protein-coupled estrogen receptor (GPER, formerly known as GPR30) is another receptor located not only at the plasma membrane but also on the membrane of the endoplasmic reticulum that can be activated by E2. It was found in both human and animal arteries (Prossnitz and Barton, 2011; Barton et al., 2018). The combination of GPER-selective agonists and antagonists with the use of GPER-knock-out mice allowed to elucidate more specifically its biological effects arteries (Prossnitz and Barton, 2011; Barton et al., 2018). In the rat, GPER activation by its agonist G-1 reduces uterine vascular tone during pregnancy through activation of endothelium-dependent NO production (Tropea et al., 2015). Likewise, the G-1-induced relaxation of the mesenteric resistance arteries in both male and female rats is mainly mediated by the PI3K-Akt-eNOS pathway (Peixoto et al., 2017). Noteworthy, GPER partly contributes to E2-dependent vasodilation of mouse aortae (Fredette et al., 2018). Thus, both ER α and GPER could contribute to the rapid actions of E2, although their respective roles according to vessel type, species and pathophysiological context remain to be established.

The risk of cardiovascular diseases differs between men and women, and the protection of women is progressively lost after menopause. For instance, endothelium-dependent dilation of subcutaneous arteries is reduced in post-menopausal women compared to pre-menopausal women (Kublickiene

et al., 2005; Kublickiene et al., 2008). This protection involves NO production in response to estrogens. Similarly, diet phytoestrogens could have protective actions in postmenopausal women suffering coronary artery disease (*Cruz et al., 2008*) and selective estrogen receptor modulators (SERMs) such as raloxifene exert protective actions in female rats through eNOS activation (*Chan et al., 2010*). Besides the activation of eNOS, hormonal replacement therapy also activates endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated vasodilation as shown in rat mesenteric and uterine arteries (*Burger et al., 2009*) as well as in the rat gracilis muscle artery with increased Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) production involved in E2-mediated increase in FMD in hypertensive or old rats (*Huang et al., 2001; Sun et al., 2004*). Furthermore, estrogen therapy reduces pressure (myogenic) (*Kublickiene et al., 2005; Kublickiene et al., 2008*) and adrenergic-dependent contraction (*Meyer et al., 1997*). FMD is also improved by E2 in rat gracilis muscle arteries (*Huang et al., 1998*). Although there is an increase in the amplitude of FMD in women among the menstrual cycle with a greater dilation during the luteal or follicular phase (*Hashimoto et al., 1995*), FMD is similar in healthy young men and women (*Sullivan et al., 2015*). Importantly, the first disruptive mutation in the gene encoding ER α , reported in 1994 in a man who was only 30 years old (*Smith et al., 1994*), was found to be associated with a total absence of FMD (*Sudhir et al., 1997*). This single yet major clinical observation suggests that ER α -dependent signal transduction could play a role in FMD in males. Of note, conversion of testosterone into estradiol by aromatase which is expressed in the arterial wall has been shown to reduce early atherogenesis in male mice (*Nathan et al., 2001*).

In the present study, we investigated the role of ER α and its different subfunctions on FMD in isolated mouse resistance arteries. To this aim, we used different mouse models that were: (i) fully deficient in ER α (*Esr1*^{-/-} mice), (ii) deleted in seven amino acid in the helix 12 and thus deficient in activation function (AF)-2 necessary for the nuclear transcriptional activity of ER α (AF2⁰ER α mice), and (iii) invalidated for plasma membrane-associated signaling. To explore the role of membrane ER α , we used: (1) mice that carry a mutation of the codon encoding the cysteine (Cys) 451 palmitoylation site of ER α to alanine (C451A-ER α mice) so that the anchoring of the receptor to the plasma membrane is impossible (*Adlanmerini et al., 2014*) and (2) a knock-in mouse model of ER α mutated for the arginine 264 (R264A-ER α mice) so that the interaction of the membrane-located ER α with G α i involved in rapid NO production is suppressed (*Adlanmerini et al., 2020*). Moreover, because the absence of membrane-associated ER α strongly reduced FMD, additional experiments were conducted to investigate: (i) the involved mechanisms, (ii) its counterpart in female mice, and (iii) the potential role of ER α activation by its ligands.

Results

FMD is reduced in mice lacking ER α but unaffected by exogenous estrogens

In mice lacking ER α (see the scheme in **Figure 1A**), FMD was significantly reduced in resistance arteries isolated from male *Esr1*^{-/-} mice compared to littermate *Esr1*^{+/+} mice (**Figure 1B**). Precontraction prior to FMD (**Figure 1C**) and arterial diameter (**Figure 1D**) were not significantly affected by the absence of ER α . Agonist-mediated endothelium-dependent (acetylcholine and insulin) and endothelium-independent (SNP) dilation were not significantly affected by the absence of ER α (**Figure 1E–G**).

To directly investigate the influence of estrogens on FMD, mesenteric resistance arteries isolated from male WT mice were incubated (20 min) with E2, which activates both membrane-associated and nuclear ER α , or with another natural estrogen, estetrol (E4), which activates only nuclear ER α (*Abot et al., 2014*). These exogenous estrogens did not affect FMD (**Figure 1H**). Furthermore, the estrogen receptor downregulator and GPER agonist fulvestrant (ICI-182780) (*Meyer et al., 2010; Jacenik et al., 2016*) did not alter FMD after 20 min of incubation with isolated arteries (**Figure 1H**). Similarly, the GPER antagonist G-36 did not alter FMD (**Figure 1I**) although G-36 inhibited the dilation induced by both E2 and the GPER agonist G-1 (**Figure 1J**).

We also found that FMD in mesenteric resistance arteries was similarly reduced in both intact (**Figure 1K**) and ovariectomized female *Esr1*^{-/-} mice (**Figure 1L**) compared to their respective *Esr1*^{+/+} littermate controls. The similar levels of FMD in intact and ovariectomized female WT mice, as well as in male mice, suggest that circulating endogenous estrogens do not influence FMD in young healthy

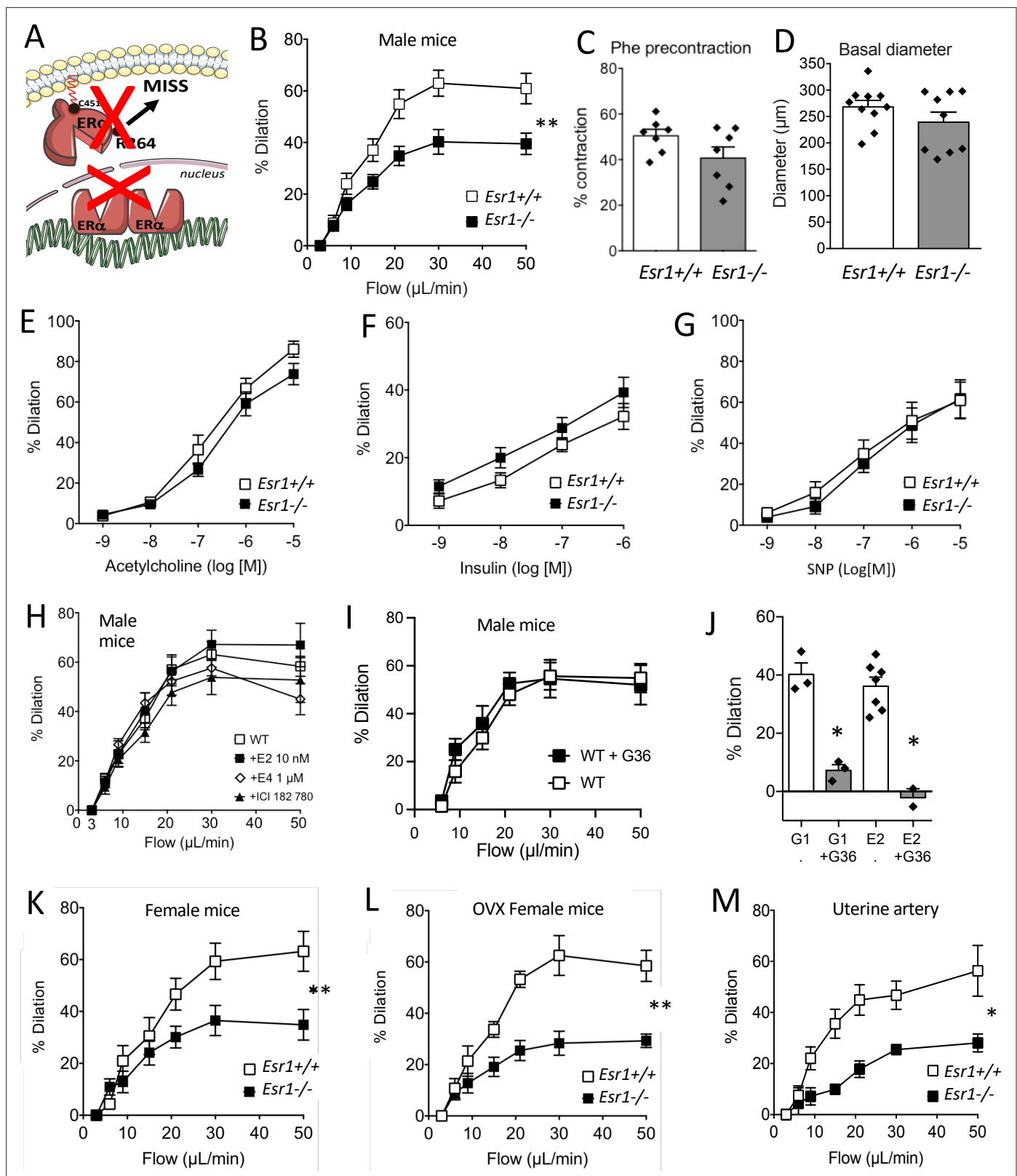


Figure 1. Involvement of ERα in flow-mediated dilation (FMD). FMD was measured in mesenteric resistance arteries isolated from male mice lacking ERα (*Esr1^{-/-}*) and male wild-type littermates (*Esr1^{+/+}*) (A). (B) FMD was determined in response to stepwise increases in luminal flow in male *Esr1^{-/-}* and *Esr1^{+/+}* mice. (C) Precontraction with phenylephrine (Phe) before measurement of FMD. (D) Basal diameter of the arteries used for FMD measurement. Besides FMD, acetylcholine- (E), insulin- (F), and sodium nitroprusside- (SNP, G) mediated dilation was measured in mesenteric resistance arteries

Figure 1 continued on next page

Figure 1 continued

isolated from male *Esr1^{-/-}* and *Esr1^{+/+}* mice. FMD was also measured in wild-type (WT) mice in the presence (20 min incubation) or absence of 17- β -estradiol (E2, 0.01 μ mol/L, **H**), estetrol (E4, 1 μ mol/L, **H**), ICI 182 780 (1 μ mol/L, **H**) and the GPER antagonist G-36 (10 μ M, **I**). **(I)** G-1 (10 μ M)- and E2 (0.01 μ M)-mediated dilation in the presence or absence of G-36 (1 μ M). FMD was then measured in mesenteric arteries isolated from intact (**K**) and ovariectomized (OVX, **L**) female *Esr1^{-/-}* and *Esr1^{+/+}* mice as well as in uterine arteries from *Esr1^{-/-}* and *Esr1^{+/+}* mice (**M**). Flow rate rate was 3, 6, 9, 12, 15, 30, and 50 μ L/min corresponding to 0.8, 1.2, 2, 2.8, 4, 8, and 12 dyn/cm². Means $\pm$ the SEM are shown ($n = 7$ –18 mice per group). Two-way ANOVA for repeated measurements: $p = 0.0072$ (interaction: $p < 0.0001$, **B**), $p = 0.0087$ (interaction: $p < 0.0001$, **K**), $p = 0.0030$ (interaction: $p < 0.0001$, **L**), $p = 0.0119$ (interaction: 0.0107, **M**). NS: two-way ANOVA for repeated measurements, panel E to I. NS: Two-tailed Mann-Whitney test, panels C and D. See source data in **Figure 1—source data 1**.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 1:

Source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in **Figure 1B–M**.

mice. FMD was also reduced in the uterine artery isolated from female *Esr1^{-/-}* mice in comparison with *Esr1^{+/+}* mice (**Figure 1M**).

FMD was not altered by the inactivation of *Esr2*, encoding ER β in mice (**Figure 2A**). Similarly, arterial precontraction, basal diameter and acetylcholine-mediated dilation were not significantly affected by the absence of ER β (**Figure 2B–D**).

As FMD depends on the response of the endothelium to shear stress, we next investigated FMD in mice lacking ER α in endothelial cells (*Tek^{Cre/+}; Esr1^{fl/fl}* mice). FMD was reduced in arteries isolated from these mice compared to littermate WT mice (**Figure 2E**). Arterial precontraction, basal diameter

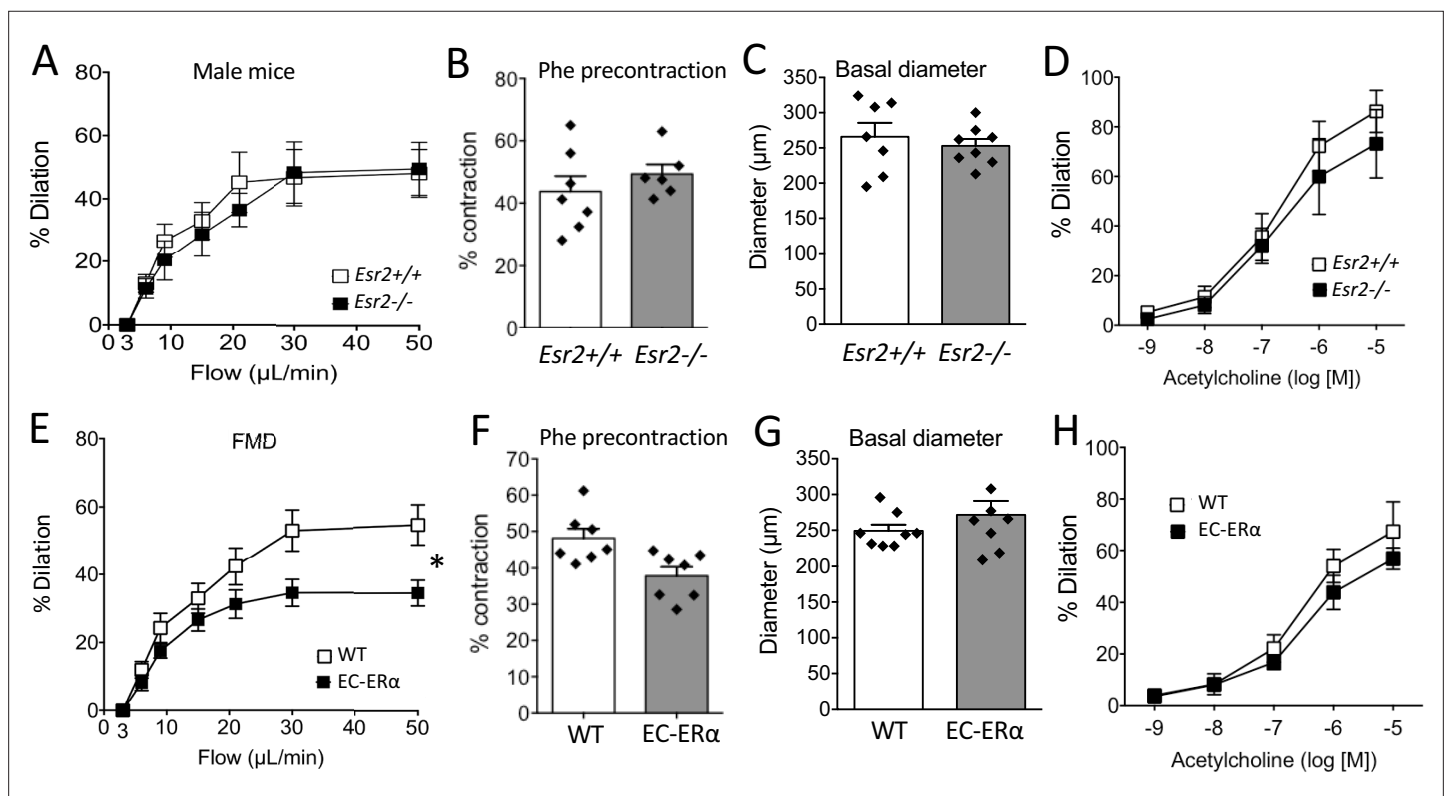


Figure 2. Involvement of ER β and endothelial ER α in flow-mediated dilation (FMD). (**A** to **D**) FMD, precontraction, basal diameter and acetylcholine-mediated dilation measured in male mice lacking ER β (*Esr2^{-/-}*) and their littermate control (*Esr2^{+/+}*). (**E** to **H**) FMD, precontraction, basal diameter and acetylcholine-mediated dilation measured in *Tek^{Cre/+}; Esr1^{fl/fl}* male mice lacking endothelial ER α (EC-ER α) and *Tek^{Cre/+}; Esr1^{lox/lox}* their littermate controls (WT). Flow rate rate was 3, 6, 9, 12, 15, 30, and 50 μ L/min corresponding to 0.8, 1.2, 2, 2.8, 4, 8, and 12 dyn/cm².+ source data 2. Means $\pm$ the SEM are shown ($n = 6$ or 7 mice per group). Two-way ANOVA for repeated measurements: $p = 0.0273$ (interaction: $p = 0.0069^{**}$, **E**). NS: two-way ANOVA for repeated measurements, panel A, D, and H. NS: two-tailed Mann-Whitney test, B, C, F, and G. Data and analysis in **Figure 2—source data 1**.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 2:

Source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in **Figure 2A–H**.

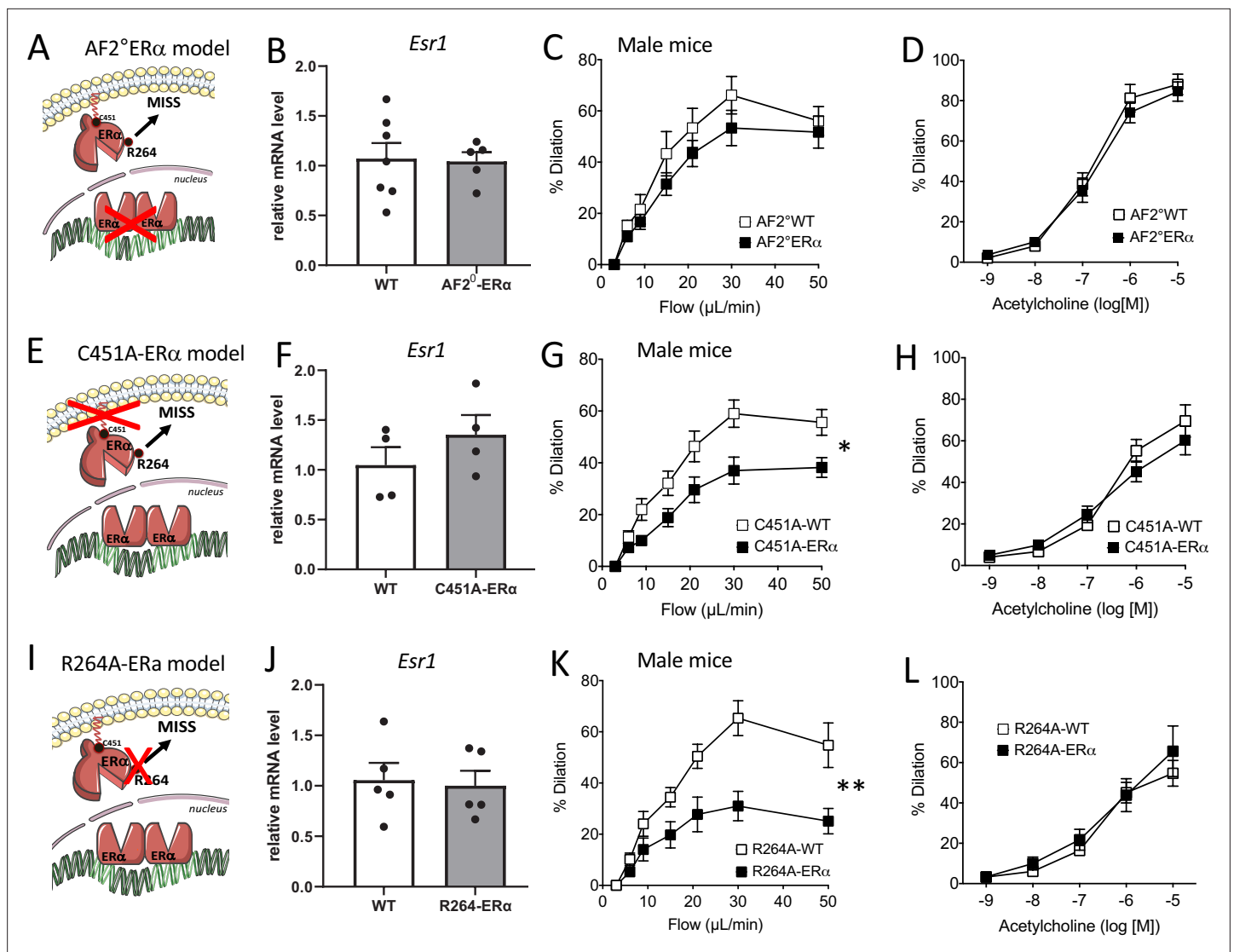


Figure 3. Flow-mediated dilation in mice lacking nuclear or membrane-associated ER α . *Esr1* expression level in aortic endothelial cells (expression relative to the housekeeping genes *Gapdh*, *Hprt* and *Gusb*), flow-mediated dilation (FMD) acetylcholine-mediated dilation were measured in mesenteric resistance arteries isolated from AF2°-WT and AF2°ER α male mice (A to D), C451A-WT and C451A-ER α male mice (E to H) and R264A-WT and R264A-ER α male mice (I to L). Means $\pm$ the SEM is shown ($n = 13$ AF2°ER α , $n = 5$ AF2°-WT mice, $n = 8$ C451A-ER α , $n = 6$ C451A-WT mice, $n = 9$ R264A-WT and $n = 10$ R264A-ER α mice). Flow rate rate was 3, 6, 9, 12, 15, 30, and 50 μ L/min corresponding to 0.8, 1.2, 2, 2.8, 4, 8, and 12 dyn/cm ^{2} . Two-way ANOVA for repeated measurements: panel C, $p = 0.2681$ (interaction: $p = 0.7302$), panel G, $p = 0.0114$ (interaction: $p = 0.002$), panel K, $p = 0.0015$ (interaction: $p = 0.0002$). Panels D, H, and L: NS. NS, two-tailed Mann-Whitney test (panels B, F and J).

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 3:

Figure supplement 1. Markers of endothelial and smooth muscle cells in mouse aortic endothelial cells.

Figure supplement 1—source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in **Figure 3B–D, F–H, and J–L** and for **Figure 3—figure supplement 1A–F**.

and acetylcholine-mediated dilation were not significantly affected by the absence of endothelial ER α (**Figure 2F–H**).

Altogether, these results demonstrate a crucial role of ER α in FMD in both males and females and probably in a ligand independent manner. We, therefore, decided to use male mice for the remainder of the study.

FMD in mice lacking the nuclear activation function 2 (AF2) of ER α

As the AF2 nuclear function mediates several protective effects of ER α on the vasculature (Guivarc'h *et al.*, 2018), we first investigated FMD in AF2⁰ER α mice (Figure 3A). The gene expression level of *Esr1* (encoding ER α) in endothelial cells was not affected by invalidation of the AF2 function of ER α (Figure 3B). Quality of mRNA endothelial enrichment was attested using analysis of *Tek* expression as a marker of endothelial cells and *Cnn1* expression as a marker of smooth muscle cells (Figure 3—figure supplement 1).

We observed that FMD was not significantly reduced in mesenteric resistance arteries isolated from AF2⁰ER α male mice compared to littermate AF2⁰WT animals (Figure 3C). Acetylcholine-mediated dilation (Figure 3D) was not altered by loss of the nuclear AF2 function of ER α . Thus, we demonstrated that FMD was preserved despite the loss of AF2 nuclear function of ER α .

FMD in mice lacking membrane-located ER α effects

We thus evaluated the role of the membrane ER α in FMD, thanks to two complementary models, C451A-ER α mice^[24] and R264A-ER α mice (Adlanmerini *et al.*, 2020), that allowed us to previously investigate the ER α membrane-initiated steroid signaling (MISS) pathway in the accelerative effect of E2 on re-endothelialization following arterial injury and in the acute dilation induced by E2 through rapid eNOS activation.

First, we investigated FMD in C451A-ER α male mice that lack the capacity to anchor ER α to the plasma membrane through palmitoylation (Adlanmerini *et al.*, 2014; Figure 3E). The gene expression level of *Esr1* was not significantly altered in aortic endothelial cells isolated from C451A-ER α mice compared to wild-type mice (Figure 3F). FMD was significantly reduced compared to WT littermate animals (Figure 3G) while acetylcholine-mediated dilation was not significantly affected by the absence of membrane-associated ER α (Figure 3H).

We then investigated FMD in R264A-ER α male mice that lack the capacity to activate the G α_i involved in acute NO production upon membrane-ER α activation (Figure 3I; Adlanmerini *et al.*, 2020). The gene expression level of *Esr1* was not significantly altered in aortic endothelial cells isolated from R264A-ER α mice compared to wild-type mice (Figure 3J). We found that FMD was significantly reduced in R264A-ER α male mice compared to WT littermate controls (Figure 3K). On the other hand, acetylcholine-mediated dilation was not significantly affected by the absence of membrane-associated ER α effects in R264A-ER α male mice (Figure 3L).

Thus, we demonstrated that FMD was altered as a consequence of either the inactivation of palmitoylation site of ER α (C451A-ER α mice) or the impairment of the activation of the G α_i protein by ER α (R264A-ER α mice), thus preventing membrane-associated ER α activation of FMD in male mice.

Role of ER α in the activation of the NO pathway in FMD

As NO produced by endothelial NOS plays a key role in endothelium-dependent dilation and thus in FMD, we investigated the effect of the inhibition of NO synthesis by L-NNA on FMD and acetylcholine-mediated dilation. FMD was significantly reduced by L-NNA in mesenteric resistance arteries of the four groups of littermate WT mice (Figure 4A–D), whereas L-NNA had no significant effect on FMD in *Esr1*^{−/−} (Figure 4A), C451A-ER α (Figure 4B), and R264A-ER α mice (Figure 4C). In contrast, FMD was reduced to a similar extent by L-NNA in AF2⁰ER α and WT mice (Figure 4D).

L-NNA strongly and similarly reduced acetylcholine-mediated relaxation in *Esr1*^{−/−} (Figure 4E), C451A-ER α (Figure 4F), R264A-ER α (Figure 4G), AF2⁰ER α (Figure 4H) and the corresponding littermate WT mice (Figure 4E–H), thus showing that the alteration of membrane ER α activation affected selectively the flow-mediated NO-dependent dilation, but not the acetylcholine-mediated NO-dependent dilation. The addition of either the inhibitor of cyclooxygenase indomethacin (Figure 4A–H) or the inhibitor epoxyeicosatrienoic acids (EETs) synthesis MSPPOH (Figure 4—figure supplement 1A–F) did not further reduced FMD or acetylcholine-mediated relaxation in all the groups.

Western-blot analysis of eNOS and phosphorylated eNOS was then performed on isolated resistance arteries that had been mounted in an arteriograph and then submitted or not to flow during 2 min (Figure 5). This flow rate is equivalent to the maximal response to flow observed in arteriography. In WT mice, the phosphorylation of eNOS at Ser1177 by flow (shear stress) was greater in arteries submitted to flow than in control (no flow) arteries as evidenced by a greater ratio of phosphorylated eNOS/total eNOS (Figure 5A). This ratio was not significantly greater in arteries submitted

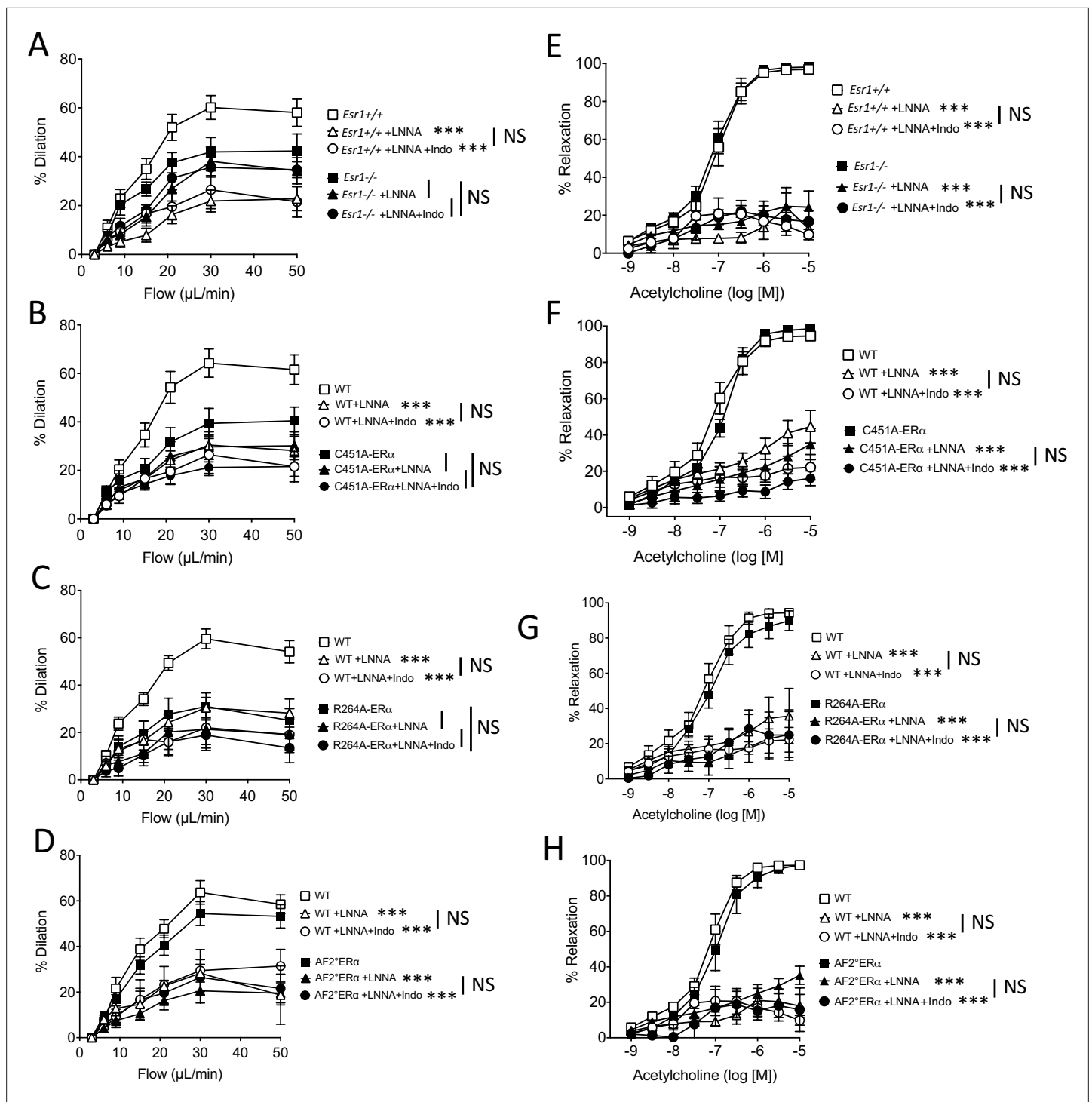


Figure 4. with one supplement: Effect of the blockade of NO synthesis and cyclooxygenase on flow-mediated dilation. Flow-mediated dilation (FMD) was determined in pressurized mesenteric resistance arteries isolated from male *Esr1*^{+/+} and *Esr1*^{-/-} (A), C451A-WT and C451A-ERα (B), R264A-WT and R264A-ERα (C), AF2⁰WT and AF2⁰ERα mice (D), before and after addition of the NO synthesis blocker L-NNA (100 μM, 30 min) and then of the combination of L-NNA plus indomethacin (indo, 10 μM, 30 min). Acetylcholine-mediated relaxation was measured in the same groups in the presence and in the absence of L-NNA and of L-NNA plus indomethacin (E to H). Flow rate rate was 3, 6, 9, 12, 15, 30, and 50 μL/min corresponding to 0.8, 1.2, 2, 2.8, 4, 8, and 12 dyn/cm². Means ± the SEM are shown (n = 6–8 per group). ***p < 0.001, two-way ANOVA for repeated measurements, L-NNA or L-NNA+ indo versus untreated arteries within each group. Data and analysis in **Figure 4—source data 1**.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 4:

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

Source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in **Figure 4A–H**.

Figure supplement 1. Effect of the blockade of NO synthesis (L-NNA), cyclooxygenase (indomethacin) and EETs production (MSPPOH) on flow-mediated dilation.

Figure supplement 1—source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in **Figure 4—figure supplement 1A–G**.

to flow than in unstimulated arteries in C451A-ER α mice (**Figure 5A**). The expression level of total eNOS was similar in C451A-ER α and in WT mice (**Figure 5B**). A similar pattern was observed in R264A-ER α mice (**Figure 5D and E**). By contrast, the ratio of phosphorylated eNOS/total eNOS was similarly increased by flow in WT and AF2-ER α mice without any change in total eNOS level between the two strains (**Figure 5G and H**).

Western-blot analysis of Akt and phosphorylated Akt was then performed on the same samples and a similar pattern was observed (**Figure 5C,F,I**). All the blots are shown in **Figure 5—source data 2**.

These results show that the absence of membrane-associated ER α affects flow-mediated eNOS activation pathway, at least in part, by preventing the activation of its upstream activator Akt/PKB.

Flow-mediated dilation and NO₂/NO₃ production in the isolated perfused kidney

As the kidney is a well-known autoregulated organ with a dense microvascular network, we investigated flow-mediated responsiveness in perfused kidneys isolated from C451A-ER α and WT mice (**Figure 6A**). First, the flow-pressure relationship was shifted leftward in C451A-ER α mice compared to WT mice (**Figure 6B**), suggesting reduced endothelial responsiveness to flow. Acetylcholine-mediated dilation in perfused kidneys was equivalent in C451A-ER α and WT mice (**Figure 6C**), suggesting that the response to flow was probably selectively reduced in perfused kidney of C451A-ER α mice, as shown above for the mesenteric artery. Similarly, phenylephrine-mediated contraction was not affected by the absence of membrane-ER α (51.1 ± 2.9 vs $57.4\% \pm 5.7\%$ contraction, C451A-ER α and WT mice, $n = 5$ per group, $p > 0.9999$, Mann-Whitney test).

Then, we measured nitrate and nitrite concentration in the kidney perfusate and found that it was reduced in C451A-ER α compared to WT mice (**Figure 6D**). Interestingly, ATP production measured in the kidney perfusate was also reduced in C451A-ER α mice (**Figure 6E**) whereas H₂O₂ production was higher in C451A-ER α than in WT mice (**Figure 6F**).

Thus, these results suggest that FMD reduction due to the absence of membrane-ER α also affects the capacity of the renal vasculature to produce NO and ATP, whereas the increased H₂O₂ production suggests an excessive oxidative stress in response to flow in C451A-ER α mice.

Loss of membrane-associated ER α did not affect gene expression

Finally, we analyzed in mesenteric resistance arteries the expression of 44 genes that may be involved in the rapid endothelial response to acute changes in flow (FMD). No significant difference was observed between C451A-ER α and WT mice (**Figure 7—figure supplements 1 and 2**), in line with the prominent or even exclusive role of rapid, non genomic, membrane-ER α .

Acute pharmacological ROS reduction restored FMD in C451A-ER α mice

As the production of H₂O₂ in the kidneys from C451A-ER α mice was higher than in WT mice, we measured FMD in arteries from C451A-ER α and WT mice after pretreatment with various antioxidants. First, the addition of PEG-SOD plus catalase to the bath containing mesenteric resistance arteries isolated from WT mice did not alter FMD (**Figure 7A**). By contrast, PEG-SOD plus catalase enhanced FMD in arteries from C451A-ER α mice (**Figure 7B**).

Catalase alone did not alter FMD in arteries from WT mice (**Figure 7C**), whereas it reduced FMD in arteries from C451A-ER α mice (**Figure 7D**).

Inhibition of mitochondrial ROS production by Mito-Tempo did not affect FMD in arteries from WT mice (**Figure 7E**), while it enhanced FMD in arteries isolated from C451A-ER α mice (**Figure 7F**).

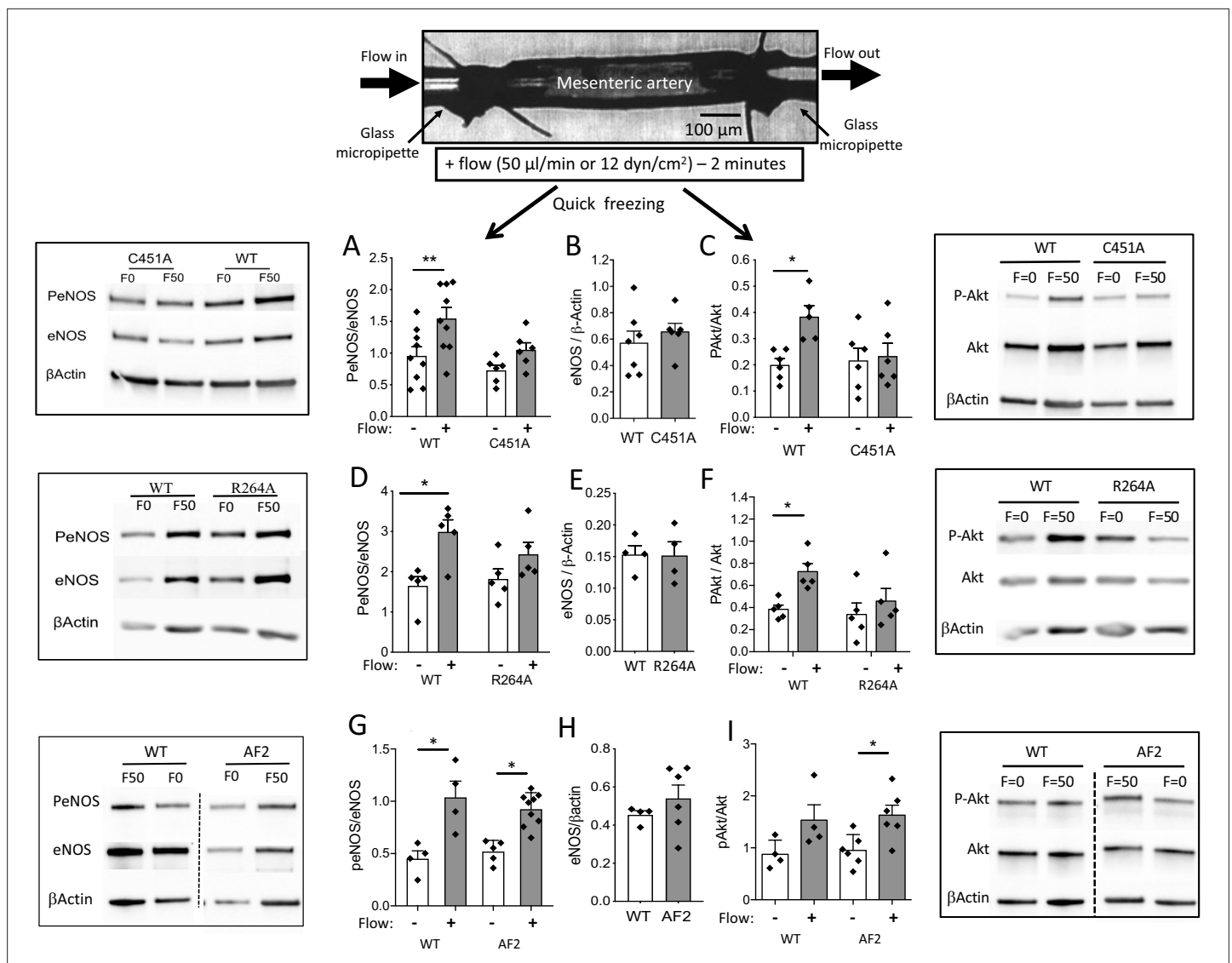


Figure 5. eNOS and Akt phosphorylation in response to flow in perfused isolated mesenteric resistance arteries. As illustrated on the top of the figure, mesenteric resistance arteries were cannulated in vitro on glass micropipettes and perfused with physiological salt solution. Flow (50 $\mu\text{l}/\text{min}$ or 12 dyn/cm^2) was applied for 2 min before quick freezing of the artery. In control experiments no flow was applied. Western-blot analysis of eNOS, phospho (Ser1177)-eNOS (P-eNOS), Akt, phospho-Akt and β -actin in mesenteric arteries isolated from male C451A-ER α mice (C451A, **A to C**), R264A-ER α (R264A, **D to F**), AF2⁰ER α (AF2, **G to I**) and their littermate control (WT) was then performed. The ratio of P-eNOS / eNOS is shown in **A**, **D** and **G**. The expression level of eNOS/ β -actin in unstimulated arteries is shown in **B**, **E** and **H**. The ratio of P-Akt / Akt is shown in **C**, **F** and **I**. Means $\pm$ the SEM are shown (n = 6 C451A-WT, n = 9 C451A-ER α , n = 5 R264A-ER α , n = 5 R264A-WT, n = 6 AF2⁰ER α and n = 4 AF2-WT mice). *p < 0.05 (panel **C**: p = 0.0374, panel **D**: p = 0.015, panel **F**: p = 0.0177, panel **G**: WT, p = 0.0234, AF2, p = 0.0465, panel **I**: p = 0.0152) and **p < 0.01 (panel **A**: p = 0.0045), two-tailed Mann-Whitney test. Data and analysis in **Figure 5—source data 1**.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 5:

Source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in **Figure 5A–I**.

Source data 2. All the blots for **Figure 5**.

The acute response to ATP and to the Piezo1 agonist YODA-1 were not affected by the absence of membrane ER α (C451A-ER α mice). In addition, the mechanosensitive channel blocker GsMTx4 similarly affected FMD in C451A-ER α and WT mice, suggesting that the defect in FMD is located downstream flow sensing (**Figure 7—figure supplement 3**).

This pharmacological approach suggests that reactive oxygen species could reduce FMD in arteries from C451A-ER α , while H₂O₂ could maintain in part the dilatory response induced by flow in the absence of membrane ER α .

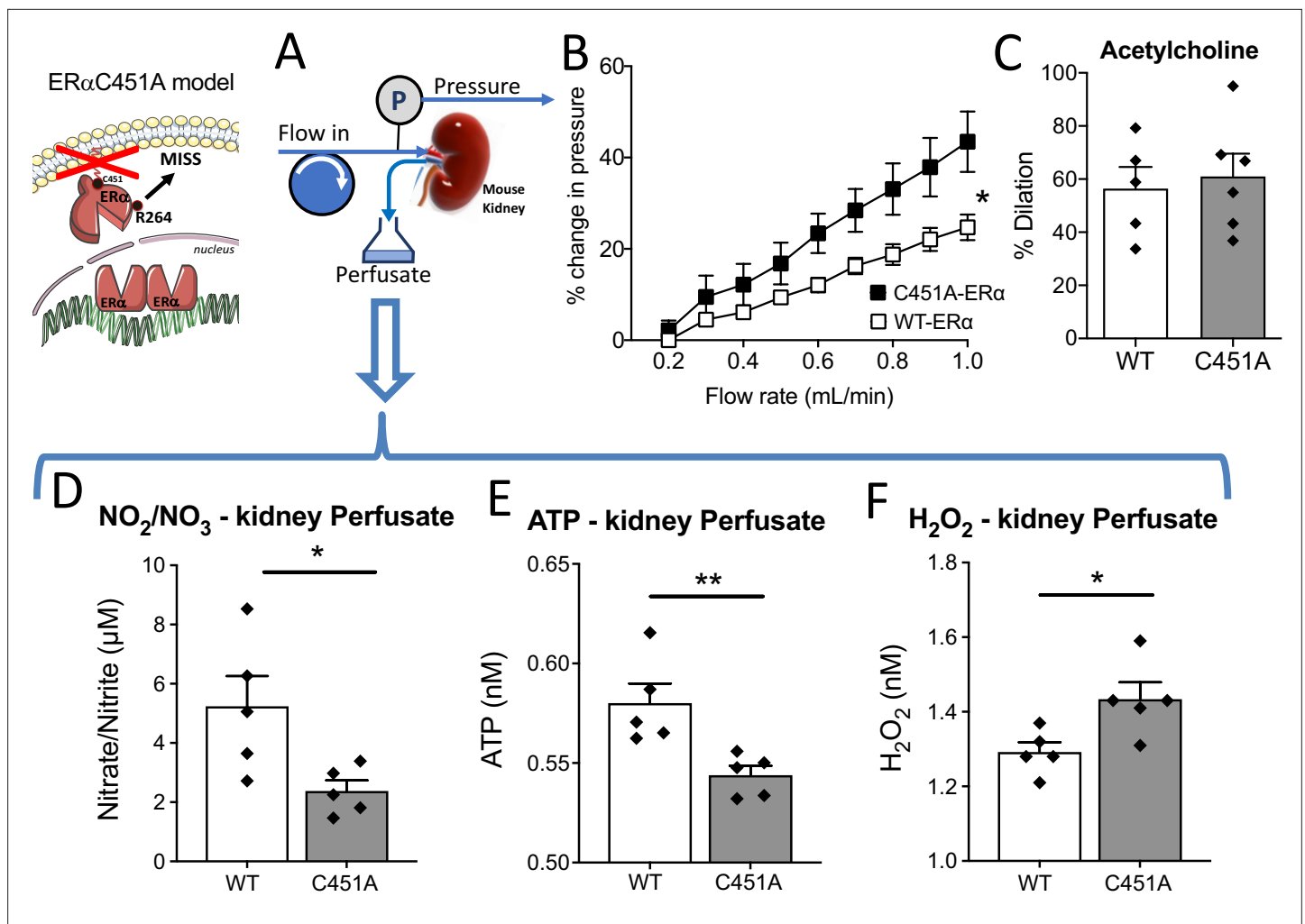


Figure 6. Isolated and perfused kidney from C451A-ER α mice. In the isolated and perfused kidney (A), the flow-pressure relationship was determined in C451A-ER α and WT mice (B). (C) Acetylcholine (1 μ M)-mediated relaxation. The levels of nitrate-nitrite (D), ATP (E) and H₂O₂ (F) level were quantified in the perfusate collected from the kidney. Means $\pm$ the SEM are shown (n = 5 C451A-WT and 7 C451A-ER α mice). *p < 0.05, two-way ANOVA for repeated measurements (panel B, C451 vs WT: p = 0.0308 Interaction: p = 0.0008). Two-tailed Mann-Whitney tests (panels C to F: p > 0.999, p = 0.0317, p = 0.0079 and p = 0.0317, respectively). Data and analysis in [Figure 6—source data 1](#).

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 6:

Source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in [Figure 6B–F](#).

In vivo pharmacological ROS reduction restored FMD in C451A-ER α mice

As acute antioxidant drugs restored FMD in mesenteric arteries isolated from C451A-ER α mice, we further explored the involvement of oxidative stress in the alteration of FMD by the use of two different antioxidant treatments in vivo.

After 2 weeks of treatment with the antioxidant TEMPOL, there was no longer a discernible difference between the response of WT and C451A-ER α mice to flow ([Figure 8A](#)). Mice body weight, arterial diameter, phenylephrine-, and KCl-mediated contraction as well as acetylcholine-mediated dilation were not different between TEMPOL-treated WT and C451A-ER α mice ([Figure 8B–F](#)).

A similar pattern was observed in mice treated for 4 weeks with vitamin E and vitamin C with no difference in FMD between WT and C451A-ER α mice ([Figure 8G to L](#)).

Thus, antioxidant treatment normalized FMD in C451A-ER α mice to the level of FMD in WT mice. Altogether, these data suggest that the absence of membrane-associated ER α increases oxidative stress, which in turn could be responsible for a large part of the alteration of NO-dependent FMD.

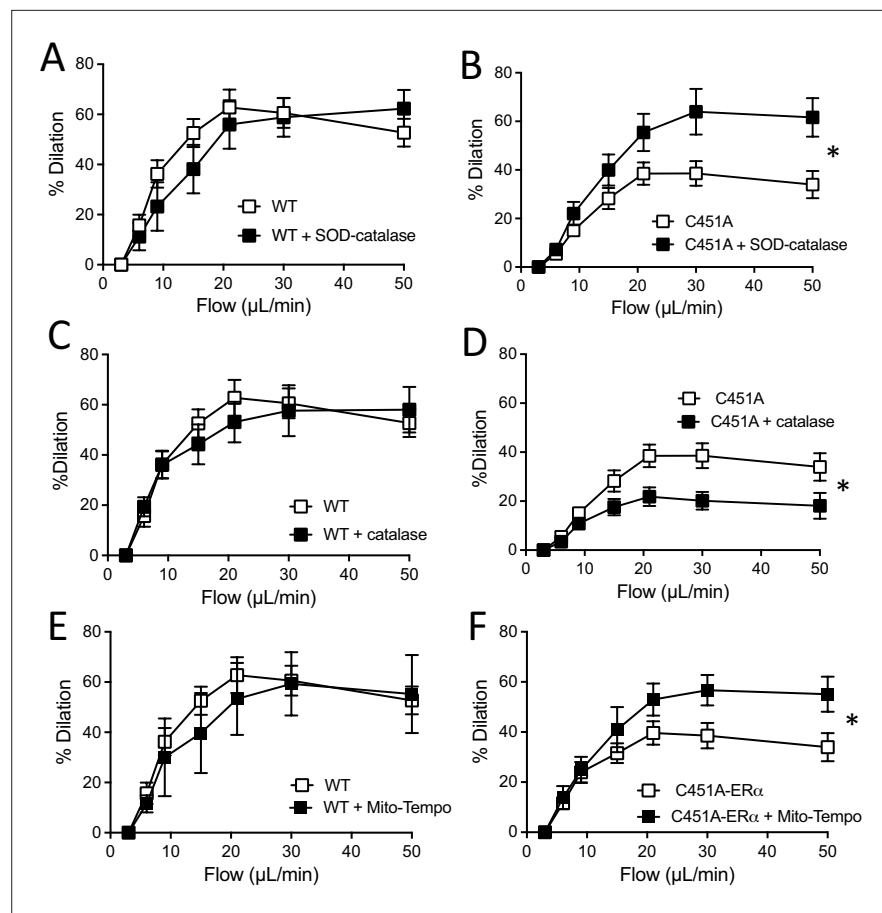


Figure 7. Flow-mediated dilation and oxidative stress. Flow-mediated dilation was determined in mesenteric resistance arteries isolated from male WT and C451A-ERα mice before and after addition of PEG-SOD and catalase (SOD-catalase, **A and B**), catalase (**C and D**) or Mito-Tempo (**E and F**). Flow rate was 3, 6, 9, 12, 15, 30, and 50 μL/min corresponding to 0.8, 1.2, 2, 2.8, 4, 8, and 12 dyn/cm². Means ± the SEM are shown (n = 3–9 mice per group, see details in **Figure 7—source data 1**). *p < 0.05, two-way ANOVA for repeated measurements (panel **A** to **F**: p = 0.5887, p = 0.0321, p = 0.7170, p = 0.0311, p = 0.7641 and p0.0354, respectively).

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 7:

Source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in **Figure 7A–L**.

Figure supplement 1. Gene expression profile in the mesenteric isolated from mice lacking membrane-ERα.

Figure supplement 1—source data 1. Data from experiments plotted in **Figure 7—figure supplement 1A–X** and in **Figure 7—figure supplement 2A–T**.

Figure supplement 2. Gene expression profile in the mesenteric isolated from mice lacking membrane-ERα.

Figure supplement 3. Mechanosensitive channels and ATP in FMD.

Figure supplement 3—source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in **Figure 7—figure supplement 3A–C**.

Discussion

We report here that endothelial membrane-associated ERα contributed to optimize flow (shear stress)-mediated dilation in young healthy mouse resistance arteries in a ligand-independent manner.

Previous experimental studies have reported the vascular benefit of estrogens on blood flow homeostasis, and E2 improves endothelium-dependent relaxation when it is reduced in diseased conditions. (Huang et al., 2001; Al-Khalili et al., 1998; Huang et al., 2000; Svedas et al., 2002; LeBlanc et al., 2009). Nevertheless, no difference in FMD has been observed between healthy men and women (Sullivan et al., 2015). In agreement, our results show that acute (20 min) incubation with

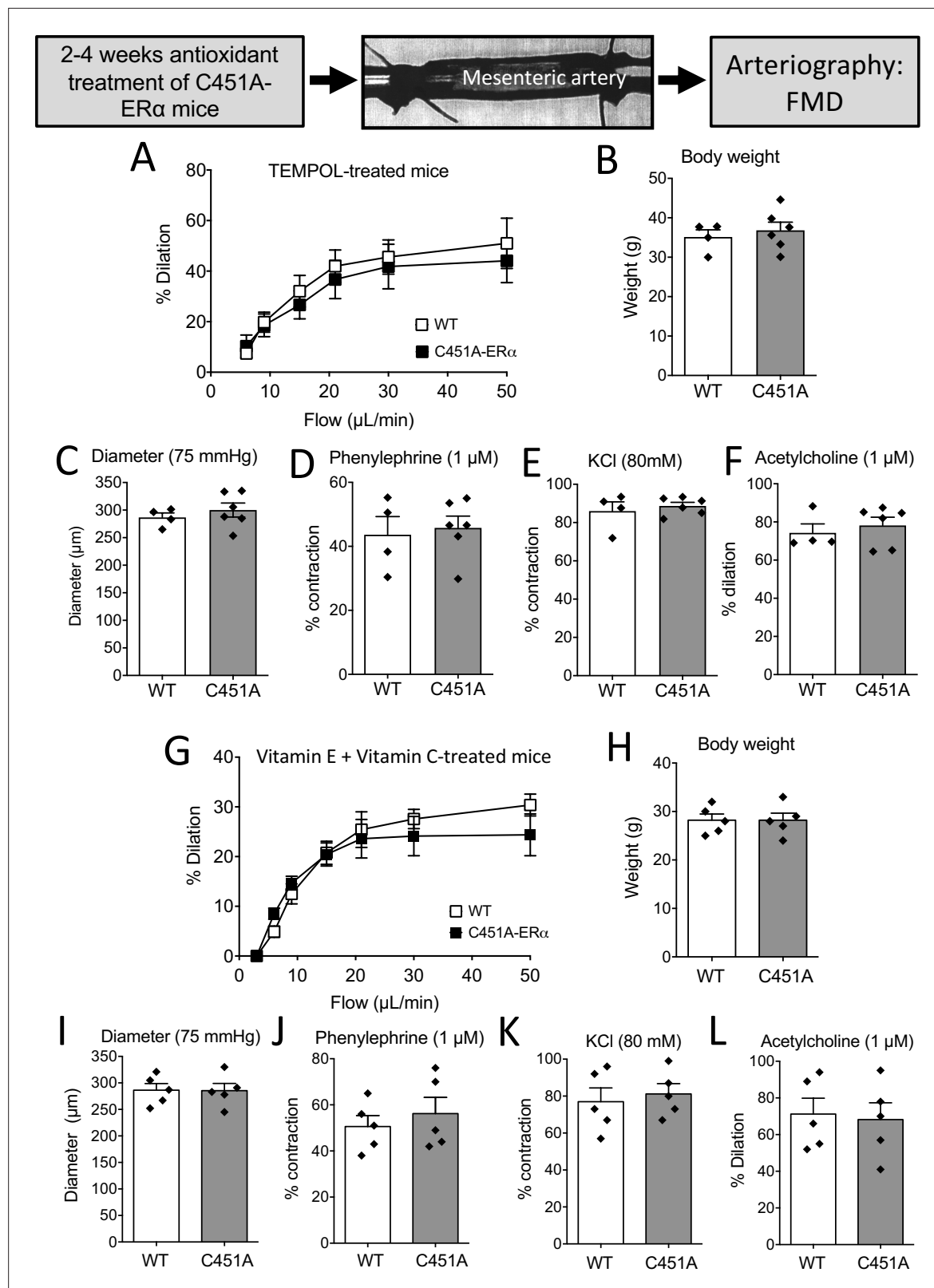


Figure 8. FMD after antioxidant treatments in mice lacking membrane-ER α . FMD was determined in mesenteric resistance arteries isolated from male WT and C451A-ER α mice treated for 2 weeks with the anti-oxidant TEMPOL (**A to F**) or with a combination of vitamin E and vitamin C for 4 weeks (**G to L**). At the end of the treatments arteries were collected and mounted in an arteriograph for the measurement of FMD (**A and G**), body weight (**B and H**), arterial diameter (**C and I**), phenylephrine (1 μ M, **D and J**)- and KCl (80 mM, **E and K**)-mediated contraction and acetylcholine (1 μ M)-mediated

Figure 8 continued on next page

Figure 8 continued

dilation (**F and L**). Flow rate was 3, 6, 9, 12, 15, 30, and 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ corresponding to 0.8, 1.2, 2, 2.8, 4, 8, and 12 dyn/cm^2 . Means $\pm$ the SEM are shown ($n = 4$ C451A-WT and 6 C451A-ER α mice treated with TEMPOL and $n = 5$ mice per group treated with vitamin E and vitamin C). NS, two-way ANOVA for repeated measurements (panel **A**: $p = 0.6345$ and **G**: $p = 0.6482$). NS, Two-tailed Mann-Whitney tests (panels **B to F** and **H to L**). Data and analysis in **Figure 8—source data 1**.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 8:

Source data 1. Data and statistical analysis from experiments plotted in **Figure 8A–L**.

exogenous E2, E4, or ICI-182780 did not affect FMD. Similarly, incubation with the GPER antagonist G-36 did not affect FMD, excluding ligand-activated GPER actions in FMD. In addition, endogenous estrogens in female WT mice had no impact on FMD as it was equivalent in male, female and ovariectomized female mice. These data suggest that FMD involves unliganded ER α activation in response to shear stress. In agreement, a recent study has reported another action of unliganded ER α , namely its inhibitory action on endothelial cell proliferation and migration ([Lu et al., 2017](#)).

Although FMD was reduced in *Esr1*^{-/-} mice, agonist-mediated endothelium dependent (acetylcholine and insulin) and independent (SNP) dilation was not affected suggesting a selective reduction in flow (shear stress)-dependent signaling without a change in receptor-dependent dilation in the endothelium and in the smooth muscle.

The present study also showed that FMD involves membrane-associated ER α . FMD was similarly reduced in *Esr1*^{-/-} mice and in both C451A-ER α and R264A-ER α mice. Although acute response (FMD and agonist-dependent dilation) can only be attributed to membrane-associated events, the expression level of the enzymes involved in the process could be modulated by the nuclear effects of ER α . Thus, endothelium-dependent dilation was investigated in mice lacking either the nuclear activating function AF2 of ER α or membrane-dependent action of ER α . Membrane-ER α is located at the level of the caveolae through either a binding to caveolin-1 or to striatin, thus creating a link with the G α i and G $\beta\gamma$ proteins ([Arnal et al., 2017](#)). In order to abrogate the membrane effects of ER α , we used two different models. First, we used C451A-ER α mice that lack the palmitoylation site (cysteine at position 451) of the receptor so that the anchorage of ER α to the plasma membrane and the link to caveolin-1 is prevented ([Adlanmerini et al., 2014](#)). We also used a knock-in mouse model of ER α mutated for the arginine 264 (R264A-ER α mice) suppressing its interaction with G α i involved in rapid eNOS activation ([Adlanmerini et al., 2020](#)). The fact that FMD was similarly reduced in *Esr1*^{-/-}, C451A-ER α , and R264A-ER α mice without change in receptor-dependent dilation, strongly supports that membrane-associated ER α is involved in FMD. This is further supported by the absence of reduction in FMD observed in AF2-ER α mice which only lack the AF2 nuclear function of ER α . AF2 is also involved in the vascular response to a chronic increase in flow (flow-mediated remodeling) which is absent in AF2⁰-ER α mice but fully present in C451A-ER α and R264A-ER α mice ([Guivarc'h et al., 2018](#)). This remodeling is a chronic adaptation of the vascular wall associated with changes in arterial diameter and wall mass within 2 weeks after a chronic rise in blood flow in vivo ([Chehaitly et al., 2021](#)). A chronic increase in blood supply, such as that needed for collateral growth in ischemic disorders, induces an increase in diameter together with wall thickening so that both shear and tensile stress are normalized within 1 week following the flow increase ([Silvestre et al., 2001](#)). This remodeling involves an early inflammatory phase allowing cell growth and reorganization in the arterial wall ([Caillon et al., 2016](#)) and a dilatory phase involving NO, prostaglandins and CO production ([Dumont et al., 2007](#); [Belin de Chantemèle et al., 2010](#); [Freidja et al., 2011](#)). Noteworthy, flow-mediated remodeling is absent in ovariectomized rats and mice and in *Esr1*^{-/-} mice ([Tarhouni et al., 2013](#)) whereas this remodeling is preserved in ovariectomized rats treated with E2 ([Tarhouni et al., 2014b](#)) or resveratrol ([Petit et al., 2016](#)). More recently, we have shown that this remodeling requires activation of AF2 and is independent on membrane-located ER α ([Guivarc'h et al., 2018](#)).

Another membrane receptor for E2 located at the plasma membrane is GPER ([Prossnitz and Barton, 2011](#)). Both ligand-dependent and ligand-independent activation of GPER have been reported ([Meyer et al., 2016](#)). GPER is involved in regulation of reproductive functions, endocrine regulation and metabolism, cardiovascular, kidney, neuroendocrine and cerebral functions function as well as immune cell function. Furthermore, previous studies suggest a role for GPER in hypertension, kidney diseases, diabetes, and immune diseases. Consequently, GPER is a potential therapeutic target for the treatment of these diseases ([Prossnitz and Barton, 2011](#)). In the present study,

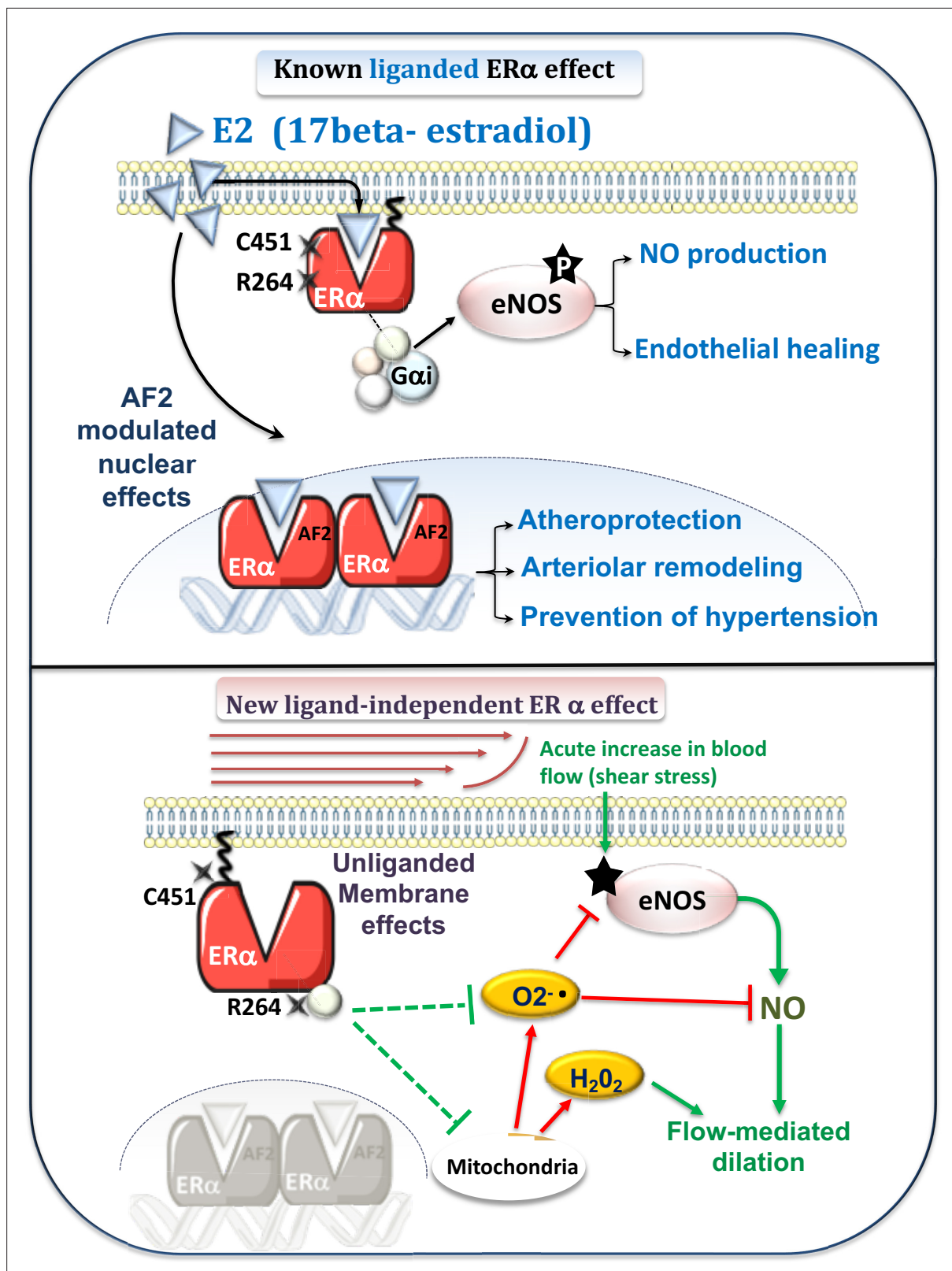


Figure 9. Schematic representation of the known E2-mediated ER α -dependent protective effects (upper panel) and of the new pathways described in the present study (lower panel). Previous works (upper panel) have demonstrated the role of E2 and the nuclear activating function AF2 of ER α against atherosclerosis and hypertension (Guivarc'h et al., 2018) as well as in flow-mediated outward remodeling (Tarhouni et al., 2013; Guivarc'h et al., 2018). E2-stimulated membrane-located ER α is involved in E2-dependent NO production and in endothelial healing (Adlanmerini et al., 2014). New

Figure 9 continued on next page

Figure 9 continued

pathway described in the present work (lower panel): Flow, by stimulation of the surface of the endothelial cell by shear stress, activates the NO pathway (e.g. phosphorylation of eNOS: P-eNOS). This results in the production of NO, which in turn induces relaxation of the smooth muscle and thus dilation. In parallel, flow activates membrane-associated ER α , which reduces oxidative stress (O_2^- and H_2O_2) due to NADPH-oxidase activity or of mitochondrial origin. This results in enhanced NO bioavailability. The absence of membrane-associated ER α could lead to the production of O_2^- , which attenuates NO-dependent dilation despite a remaining dilation due to a rise in H_2O_2 production.

incubation with the GPER antagonist G-36 did not affect FMD, ruling out the role of ligand-activated GPER in FMD. However, a possible role of unliganded GPER activation cannot be excluded in case of a crosstalk between membrane-dependent ER α and GPER activation.

To characterize the effect of membrane-ER α on the NO pathway which is involved in FMD, we investigated the effect of L-NNA-mediated inhibition of NO-synthesis on FMD. L-NNA inhibited FMD in arteries from WT and AF2⁰ER α , but not arteries from *Esr1*^{-/-}, C451A-ER α and R264A-ER α mice, suggesting that membrane-associated ER α is involved in NO-dependent FMD. This is in agreement with a previous study that used the ER α Neo-KO model with incomplete deletion, thereby showing that the NO pathway (dilation sensitive to L-NAME) was reduced in response to flow in the gracilis artery of male mice (Sun et al., 2007). In contrast to FMD, L-NNA strongly reduced acetylcholine-mediated dilation in WT, *Esr1*^{-/-}, AF2⁰ER α , C451A-ER α and R264A-ER α mice. Thus, the NO-pathway can be activated in response to receptor stimulation in C451A-ER α and R264A-ER α mice, whereas only its activation by flow was reduced in these mice lacking only membrane-ER α signaling. FMD can involve prostaglandins and EDHF such as EETs (Sun et al., 2007) and EDHF was shown to mediate estrogen-mediated dilation of the uterine arteries (Burger et al., 2009). Nevertheless, in the present study, cyclooxygenase inhibition with indomethacin and EETs production inhibition with MSPPOH did not affect FMD in both WT and *Esr1*^{-/-}, AF2⁰ER α , C451A-ER α and R264A-ER α mice, suggesting a limited role of the pathway in mesenteric arteries of male mice. Consequently, the remaining FMD following the addition of L-NNA, indomethacin and MSPPOH relies probably on other hyperpolarizing agents. Indeed, endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) has a major role in resistance arteries homeostasis (Brandes et al., 2000; Garland and Dora, 2017) and COX-derivatives can also induce EDH in resistance arteries and in the carotid when submitted to flow (Ohlmann et al., 2005; Bergaya et al., 2001). In humans, FMD measured in the brachial artery relies mainly on the production of NO (Alexander et al., 2021). Furthermore, changes in FMD in the brachial artery predict well the endothelial dysfunction in human resistance arteries (Park et al., 2001). Nevertheless, the difference in the nature of the agents involved in FMD besides NO between humans and mice could be a limitation of the present study. As stated above, the involvement of EDH in FMD is greater in mouse resistance arteries than in humans when measured at the level of the brachial artery.

As FMD has a key role in blood flow delivery to organs (Hill et al., 2010), we investigated the flow-pressure relationship in the mouse kidney. In agreement with the reduction in FMD observed in resistance arteries, we found a leftward shift of the flow-pressure relationship in C451A-ER α mice further confirming the decreased sensitivity to flow of the resistance vasculature. Recent studies have shown that flow activates Piezo1-dependent release of ATP through pannexin hemi-channel followed by P2Y2 activation and NO production by endothelial cells (Wang et al., 2015; Wang et al., 2016). We found that both nitrate-nitrite and ATP productions were lower in the kidney perfusate from C451A-ER α than in WT mice, in agreement with the reduced NO-dependent FMD (sensitive to L-NNA) observed in isolated arteries. As in mesenteric arteries, we have previously shown that eNOS expression level in the kidney is not altered by the absence of membrane ER α in C451A-ER α (Guivarc'h et al., 2020). Although NO and ATP production were reduced in kidneys from C451A-ER α , the acute response to ATP and to the Piezo1 agonist YODA-1 was not affected by the absence of membrane ER α . In addition, the mechanosensitive channel blocker GsMTx4 similarly affected FMD in C451A-ER α and WT mice, suggesting that the defect in FMD associated with the absence of membrane ER α is probably located downstream flow sensing.

The reduction in NO-dependent FMD found in arteries from mice lacking membrane-ER α could be due to an excessive ROS production as the chronic treatment of C451A-ER α mice with an antioxidant treatment restored FMD to control level. In agreement, we found that H_2O_2 production by the kidney was higher in C451A-ER α than in WT mice. This observation is in agreement with a previous work that has shown that E2 increases the release of bioactive NO by inhibition of superoxide anion production

in bovine endothelial cells (Arnal et al., 1996). Accordingly, we found that reducing total ROS or mitochondrial ROS production improved FMD in C451A-ER α mice. By contrast, catalase which eliminates H₂O₂ reduced FMD in C451A-ER α mice suggesting that an excessive ROS production due to the absence of membrane-associated ER α had a dual effect with (1) a reduction of NO bioavailability and (2) an increase in H₂O₂ production contributing to some vasodilating effect. Noteworthy, kidney perfusates showed higher levels of H₂O₂ in C451A-ER α mice. An excessive ROS production could also alter eNOS activation as previously shown through increased phosphatase activation (Ding et al., 2020). Previous studies have also shown that shear stress induces a more quiescent and less oxidative phenotype in endothelial cells (Doddaballapur et al., 2015; Wu et al., 2018), thus reducing the oxidative products of mitochondrial origin. Nevertheless, in a context of known dysfunctional FMD, a previous work has shown that H₂O₂ could mediate FMD in human coronary arteries from patients suffering coronary artery disease although H₂O₂ remains deleterious (Freed et al., 2014).

Conclusion

To conclude, these data demonstrate for the first time a major role of ER α , and more precisely of non liganded endothelial membrane-located ER α for optimal FMD and thereby a potential role in local blood flow homeostasis. The mechanism appears to involve an optimization of NO activation and/or a decrease in ROS production as depicted in Figure 9. The functional consequences in terms of arteriolar and tissue protection should now be investigated.

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Strain, strain background (Mus musculus, males and females)	<i>Esr1</i> ^{-/-} C57BL/6 J (Symbol: <i>Esr1</i> ^{tm1.1Mma} , Synonyme: ERalpha Knockout)	Mouse Clinical Inst., Strasbourg, France, Dupont et al., 2000		MGI:2386760
Strain, strain background (Mus musculus, males)	AF2 ^o ER α , C57BL/6 J (Symbol: <i>Esr1</i> ^{tm1.10hl} Synonym: ERalpha-AF2 ^o)	Mouse Clinical Inst., Strasbourg, France, Billon-Galés et al., 2009		MGI:4950046
Strain, strain background (Mus musculus, males)	C451A-ER α , C57BL/6 N (Symbol: <i>Esr1</i> ^{tm1.1ls} Synonyme: C451A-ERalpha knock-in)	Mouse Clinical Inst., Strasbourg, France, Adlanmerini et al., 2014		MGI:5574591
Strain, strain background (Mus musculus, males)	<i>Tek</i> ^{Cre/+} : <i>Esr1</i> ^{if} , C57BL/6 (B6.Cg-Tg(Tek-cre)12Flv/J backcrossed with <i>Esr1</i> ^{tm1.2Mma} Synonym: <i>Tie2</i> ^{Cre} ER α ^{lox/lox})	<i>Esr1</i> ^{lox/lox} : Mouse Clinical Institut, Strasbourg, France. <i>Tek</i> ^{Cre} : Jackson Lab (Bar Harbor, Me), Billon-Galés et al., 2009 <i>Koni et al., 2001</i> <i>Esr1</i> ^{lox/lox} : Dupont et al., 2000	<i>Tek</i> ^{Cre} : <i>Esr1</i> ^{lox/lox} :	MGI:3775510
Strain, strain background (Mus musculus, males)	<i>Esr2</i> ^{-/-} , C57BL/6 J (Symbol: <i>Esr2</i> ^{tm1Mma} Synonym: ERbeta)	Mouse Clinical Inst., Strasbourg, France, Dupont et al., 2000		MGI:2386761
Strain, strain background (Mus musculus, males)	R264A-ER α , C57BL/6 N	Mouse Clinical Inst., Strasbourg, France, Adlanmerini et al., 2020		No MGI ID yet
Antibody	Anti-eNOS, (mouse monoclonal, clone3)	BD Biosciences	Cat# 610297, RRID:AB_397691	WB (1:1000)
Antibody	Anti-phospho-eNOS, pS1177 (Mouse monoclonal, Clone 19/eNOS/S1177)	BD Biosciences	Cat# 612392, RRID:AB_399750	WB (1:1000)
Antibody	Anti-beta-actin, (Mouse monoclonal, clone AC-74)	Sigma-Aldrich	Cat#: 5316; RRID:AB_476743	WB (1:5000)

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Anti-Akt Pan, (rabbit monoclonal, clone C67E7)	Cell signalling technology Ozyme	Cat#: 4691; RRID:AB_915783	WB (1:1000)
Antibody	Anti-phospho-Akt, S473, (rabbit monoclonal, clone D9E)	Cell signalling technology Ozyme	Cat#: 4060; RRID:AB_2315049	WB (1:2000)
Antibody	Anti-mouse IgG (H + L) Secondary antibody HRP (Goat polyclonal)	Thermo scientific	Cat#: 31430; RRID:AB_228307	WB (1:5000)
Antibody	Anti-rabbit IgG(H + L) Secondary antibody HRP (Goat polyclonal)	Thermo scientific	Cat#: 31460; RRID:AB_228341	WB (1:10000)
Chemical compound, drug	vitamin C	Sigma Aldrich Merck, Favre et al., 2011	A5960	
Chemical compound, drug	vitamin E	Sigma Aldrich Merck, Favre et al., 2011	T3251	
Chemical compound, drug	Mito-tempo	Sigma Aldrich Merck, Freed et al., 2014	SML0737	
Chemical compound, drug	catalase	Sigma Aldrich Merck, Bouvet et al., 2007	C3155	
Chemical compound, drug	PEG-superoxide dismutase (SOD)	Sigma Aldrich Merck, Bouvet et al., 2007	S9549	
Chemical compound, drug	Estetrol (E4)	Sigma Aldrich Merck, Abot et al., 2014	SML1523	
Chemical compound, drug	ICI 182 780	Tocris Biotechnne, Meyer et al., 2010	1047	
Chemical compound, drug	G-1 ((±)-1-[(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3 a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl)]- ethanone	Cayman chemical Bertin Bioreagent, Meyer et al., 2010	10008933	
chemical compound, drug	G-36 ((±)-(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3 a,4,5,9b-tetrahydro-8-(1-methylethyl))-3H-cyclopenta[c]quinoline	Cayman chemical Bertin Bioreagent, Meyer et al., 2016	14,397	
Sequence-based reagent	N-(methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamide (MSPPOH)	Cayman chemical Bertin Bioreagent, Dietrich et al., 2009	75,770	
Chemical compound, drug	Grammostola spatulata mechanotoxin 4 (GsMTx4)	Alomone Labs, John et al., 2018	STG-100	
Chemical compound, drug	YODA1	Bertin Bioreagent, Lhomme et al., 2019	SML1558	
Chemical compound, drug	ATPyS	Tocris Biotechnne, Kukulski et al., 2009	4080	
Chemical compound, drug	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMPOL)	Sigma Aldrich Merck, Freidja et al., 2014	176,141	
commercial assay or kit	Nitric oxide metabolite detection kit	Cayman Chemical	780,051	
commercial assay or kit	Hydrogen peroxide assay kit	Abcam	Ab102500	
commercial assay or kit	ATP determination kit	Invitrogen Molecular Probes	A22066	

Animal protocol

We used 5–6 month-old male mice lacking the gene encoding ER α (*Esr1*^{-/-}) (**Antal et al., 2008**) or ER β (*Esr2*^{-/-}) (**Antal et al., 2008**), mice lacking ER α selectively targeted to the endothelium (Tek^{Cre/+}:ER^{fl/fl}) (**Toutain et al., 2009**), mice lacking the nuclear activation function AF2 (AF2⁰ER α mice) (**Billon-Galés et al., 2011**), mice in which the codon for the cysteine (Cys451) palmitoylation site of ER α had been mutated to alanine (C451A-ER α mice) (**Adlanmerini et al., 2014**) and mice mutated for the arginine

264 of ER α (R264A-ER α mice) (Adlanmerini et al., 2020). Littermate +/+ mice were used as controls (designated wild-type, WT, or +/+) in each group.

In a separate series of experiments, 5–6 month-old female *Esr1*^{-/-} and *Esr1*^{+/-} mice were used for FMD measurements. The mice had been ovariectomized or left intact (with only a sham surgery), as previously described (Toutain et al., 2009).

In another series of experiments, 5–6 month-old male C451A-ER α and C451A-WT mice were treated with the antioxidant 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMPO, 10 mg/kg per day, 2 weeks in drinking water) (Belin de Chantemèle et al., 2009) or with the antioxidants vitamin E (1 % in chow) and vitamin C (0.05 % in water) for 4 weeks. (Favre et al., 2011; Contreras-Duarte et al., 2018).

The mice were anesthetized with isoflurane (2.5%) and euthanized with CO₂. The mesentery and the uterus were quickly removed and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS) (Tarhouni et al., 2013). Several segments of second-order arteries were collected for the functional study and for biochemical studies.

The experiments complied with the European Community standards for the care and use of laboratory animals and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised in 1996). The protocol was approved by the regional ethics committee (permits #14335, #16740, and #16108).

Flow-mediated dilation in mesenteric arteries in vitro

Arterial segments, with internal diameters of approximately 200 μ m, were cannulated at both ends on glass micro-cannulas and mounted in a video-monitored perfusion system (Living System, LSI, Burlington, VT, USA) (Iglarz et al., 1998; Bolla et al., 2002). Individual artery segments were bathed in a 5 ml organ bath containing PSS (pH: 7.4, pO₂: 160 mmHg, and pCO₂: 37 mmHg) and perfusion of the artery was carried out with two peristaltic pumps, one controlling the flow rate and the other under the control of a pressure-servo control system. The pressure was set at 75 mmHg and flow (3–50 μ l per min) was generated through the distal pipette with a peristaltic pump. Flow steps were 3, 6, 9, 12, 15, 30 and 50 μ l/min which correspond to 0.8, 1.2, 2, 2.8, 4, 8 and 12 dyn/cm².

FMD was determined before and after pretreatment with N(omega)-nitro-L-arginine (L-NNA, 100 μ M, 30 min), L-NNA plus indomethacin and then with L-NNA plus indomethacin (10 μ mol/L) plus N-(methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamide (MSPPOH, 10 μ mol/L).

In a separate series of experiments, the effect the mechanosensitive ionic channels blocker Grammostola spatulata mechanotoxin 4 (GsMTx4) (5 μ mol/L, delivered intraluminally and incubated for 45 min) (John et al., 2018).

The impact of ex vivo modulation of ER α on FMD was evaluated after 20 minutes of incubation with the ER α agonists E2 (10 nM) or E4 (1 μ mol/L), the GPER agonist G-1 (1 μ mol/L) (Meyer et al., 2010), the GPER antagonist G-36 (1 μ mol/L) (Yu et al., 2018) or the estrogen receptor downregulator and GPER agonist ICI 182 780 (0.1 μ mol/L) (Meyer et al., 2010).

In another series of experiments, FMD was measured before and after incubation (20 min) of the arteries with PEG-superoxide dismutase (SOD, 120 U/mL) plus catalase (80 U/mL) (Bouvet et al., 2007), catalase (80 U/mL), or Mito-Tempo (1 μ mol/L) (Freed et al., 2014).

Pharmacological profile of isolated mesenteric arteries

Segments of mesenteric arteries were mounted in a wire-myograph (Danish Myo Technology, Denmark) as previously described (Loufrani et al., 2002) in order to obtain cumulative concentration-response curves (CRCs) to acetylcholine (ACh) before and after pretreatment with L-NNA (10 μ mol/L) and then with L-NNA (100 μ mol/L) plus indomethacin (10 μ mol/L).

In a separate series of experiments, CRCs to YODA1, ATP γ S (ATP) were performed.

Prior to each CRC, the arteries were submitted to phenylephrine to obtain approximately 50 % of the maximal contractile response of the vessel assessed by KCl (80 mM)-mediated contraction at the beginning of the experiment.

Western-blot analysis

Arterial segments were cannulated under pressure (75 mmHg), and flow (50 μ l/min) was applied after precontraction with phenylephrine (1 μ M). After 2 minutes, the arteries were quick-frozen. Due to the limited size of the resistance arteries segments were pooled before analysis. Protein expression (eNOS, phospho-eNOS, Akt and phospho-Akt) was then determined using Western blot (Bouvet *et al.*, 2007).

Perfused isolated mouse kidney

In a separated series of experiments, the right renal artery was cannulated in anesthetized mice and the kidney was excised and perfused at 37 °C with PSS as previously described (Begorre *et al.*, 2017). The right renal artery was cannulated in anesthetized mice (as described above) with a polyethylene catheter (PE-10, 0.28 mm internal diameter, 0.61 mm external diameter, Intramedic, Evry, France). The kidney was then excised and perfused without interruption of kidney flow at 37 °C with PSS. The perfusion solution was dialyzed and the pH was adjusted to 7.4. Perfusion rate was 600 μ l/min and perfusion pressure was measured continuously (PT-F pressure transducer, Living System, Burlington, VT). Endothelium-mediated dilation was tested using ACh (1 μ mol/L) after precontraction with Phe (1 μ mol/L). Flow-pressure relationship was assessed through an stepwise increase in perfusion flow associated with the continuous measurement of the perfusion pressure.

The PSS perfusing the kidney (perfusate in the scheme shown in Figure 6) was collected in baseline conditions (flow = 600 μ l/min) and immediately frozen in liquid N₂ and then stored at –80 °C.

Determination of nitrate and nitrite, ATP and H₂O₂ levels in the kidney perfusate

To determine flow-induced nitrate-nitrite, ATP or H₂O₂ release from the perfused mouse kidney, 500 μ l of perfusate was collected. The perfusate was then centrifuged 10 min at 14 000 rpm and the supernatant added into a spin column with 10 kDa molecular weight cut-off filter for ultrafiltration (10KD Spin Column Abcam ab93349) and centrifuged at 10 000 rpm for 10 min. The centrifuged solutions was then used for nitrate-nitrite, ATP and H₂O₂ measurement.

Nitrate and nitrite levels in kidney perfusate were determined using a nitrate/nitrite fluorometric assay kit from Cayman Chemical (Nitric Oxide Metabolite Detection Kit Nb°780051) according to the manufacturer's instructions.

Hydrogen peroxyde (H₂O₂) level was determined using the fluorimetric method of a hydrogen peroxide assay kit from Abcam (Hydrogen Peroxide Assay Kit Colorimetric/Fluorometric NbAb102500) according to the manufacturer's instructions.

ATP level was measured using ATP determination kit from Invitrogen Molecular Probes (ATP Determination Kit Nb A22066) according to the manufacturer's instructions.

Preparation of endothelial cells enriched fraction for transcriptional analysis

Endothelial cells enriched fractions were obtained as previously described (Briot *et al.*, 2014). Briefly, 5-week-old female mice were perfused with PBS. The descending thoracic aorta was dissected and perfused with RLT buffer (Qiagen, Valencia, CA) containing 1 % beta-mercaptoethanol. Endothelial cells enrichment was confirmed by the increased endothelial marker *Tek* expression level and the absence of smooth muscle cell marker *Cnn1* (Kalluri *et al.*, 2019) compared to the total aorta.

Evaluation of gene expression by quantitative real-time PCR in mesenteric arteries

Gene expression was investigated using quantitative polymerase chain reaction after reverse transcription of total RNA (RT-qPCR). Mesenteric arteries were stored at –20 °C in RNeasy Stabilization Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA) until use. RNA was extracted using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following manufacturer instructions. RNA extracted (300 ng) was used to synthesize cDNA using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). RT-qPCR was performed with Sybr Select Master Mix (Applied Biosystems Inc, Lincoln, CA, USA) reagent using a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Branchburg, NJ, USA). Primer sequences are shown in the **Supplementary file 1**. *Gapdh*, *Hprt* and *Gusb* were used as housekeeping genes. Analysis was not performed when Ct values exceeded 35. Results were expressed as: $2^{-(Ct \text{ target}-Ct \text{ housekeeping gene})}$.

Statistical analysis

The results are expressed as means $\pm$ the SEM. The significance of the differences between groups was determined by analysis of variance (two-way ANOVA for consecutive measurements) followed by Bonferroni's test for the FMD and the agonist-mediated concentration-response curves. A two-tailed Mann-Whitney test (when comparing two groups) or a Kruskal-Wallis test (more than two groups) was used for the other comparisons as indicated in the figure legends. Probability values less than 0.05 were considered significant.

Acknowledgements

Esr2^{-/-}, *Esr1^{-/-}* and AF2⁰ER α mice and the corresponding littermate WT mice were kindly provided by Prof. P Chambon and Dr. A Krust (Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology, Strasbourg, France). We thank J.M. Foidart and Mithra Pharma for providing Estetrol (E4). This work was supported in part by the foundation for Medical Research (*Fondation pour la Recherche Médicale*, Mitoshear project, contract FRM - DPC20171138957), the National Agency for Research (*Agence Nationale de la Recherche*, Estroshear project, contract # ANR-18-CE14-0016-01), INSERM, University of Toulouse III, the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20160334924), the Fondation de France (contract 00086486), the Région Occitanie, and the Institut Universitaire de France in Toulouse. JF was supported by the Lefoulon-Delalande Foundation. ChF and JR were supported by the National Agency for Research (*Agence Nationale de la Recherche*, Estroshear project, contract # ANR-18-CE14-0016-01).

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Fondation pour la Recherche Médicale	FRM - DPC20171138957	Daniel Henrion
Fondation pour la Recherche Médicale	Equipe FRM DEQ20160334924	Jean-François Arnal
Agence Nationale de la Recherche	ANR-18-CE14-0016-01	Chanaelle Fébrissy Jordan Rivron
Fondation Lefoulon Delalande		Julie Favre
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale		Daniel Henrion Jean-François Arnal
Université de Toulouse		Jean-François Arnal
Fondation de France	00086486	Jean-François Arnal
Région Occitanie Pyrénées-Méditerranée		Jean-François Arnal
Institut Universitaire de France		Jean-François Arnal

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Julie Favre, Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Resources, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing; Emilie Vessieres, Data curation, Formal analysis, Methodology; Anne-Laure Guihot, Coraline Proux, Investigation, Methodology; Linda Grimaud, Data curation, Methodology, Resources; Jordan Rivron, Investigation, Methodology, Validation;

Manuela CL Garcia, Investigation, Validation; Léa Réthoré, Investigation; Rana Zahreddine, Investigation, Validation, Writing – original draft; Morgane Davezac, Data curation, Methodology, Performed experiments requested for the revised manuscript; Chanaelle Fébrissy, Investigation, Validation, Visualization; Marine Adlanmerini, Conceptualization, Investigation, Validation; Laurent Loufrani, Formal analysis, Investigation, Supervision, Validation, Writing – original draft; Vincent Procaccio, Methodology, Project administration, Validation; Jean-Michel Foidart, Methodology, Resources; Gilles Flouriot, Conceptualization, Methodology, Validation; Françoise Lenfant, Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing; Coralie Fontaine, Methodology, Validation, Writing – original draft; Jean-François Arnal, Conceptualization, Funding acquisition, Writing – original draft; Daniel Henrion, Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Validation, Writing – original draft

Author ORCIDs

Laurent Loufrani  <http://orcid.org/0000-0003-3397-2335>

Daniel Henrion  <http://orcid.org/0000-0003-1094-0285>

Ethics

The investigation was conducted in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament for the protection of animals used for scientific purposes (authorization of the laboratory: # 00577). The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC): Committee on the Ethics of Animal Experiments (CEAA) of "Pays de la Loire" (permits #14335, #16740, and #16108). The mice were anesthetized with isoflurane (2.5%) and euthanized using a CO2 chamber and every effort was made to minimize suffering.

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.68695.sa1>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.68695.sa2>

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. Primer sequences used for the RT-qPCR.
- Transparent reporting form

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting files. Source data files are provided for each figure and supplement.

References

- Abot A**, Fontaine C, Buscato M, Solinhac R, Flouriot G, Fabre A, Drougard A, Rajan S, Laine M, Milon A, Muller I, Henrion D, Adlanmerini M, Valéra M-C, Gompel A, Gerard C, Péqueux C, Mestdagt M, Raymond-Letron I, Knauf C, et al. 2014. The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor α modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Molecular Medicine* 6:1328–1346. DOI: <https://doi.org/10.15252/emmm.201404112>, PMID: 25214462
- Adlanmerini M**, Solinhac R, Abot A, Fabre A, Raymond-Letron I, Guihot A-L, Boudou F, Sautier L, Vessières E, Kim SH, Lière P, Fontaine C, Krust A, Chambon P, Katzenellenbogen JA, Gourdy P, Shaul PW, Henrion D, Arnal J-F, Lenfant F. 2014. Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor α in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *PNAS* 111:E283–E290. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1322057111>, PMID: 24371309
- Adlanmerini M**, Fébrissy C, Zahreddine R, Vessières E, Buscato M, Solinhac R, Favre J, Anquetil T, Guihot A-L, Boudou F, Raymond-Letron I, Chambon P, Gourdy P, Ohlsson C, Laurell H, Fontaine C, Metivier R, Le Romancer M, Henrion D, Arnal J-F, et al. 2020. Mutation of Arginine 264 on ER α (Estrogen Receptor Alpha) Selectively Abrogates the Rapid Signaling of Estradiol in the Endothelium Without Altering Fertility. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40:2143–2158. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314159>, PMID: 32640903
- Al-Khalili F**, Eriksson M, Landgren BM, Schenck-Gustafsson K. 1998. Effect of conjugated estrogen on peripheral flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *The American Journal of Cardiology* 82:215–218. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(98\)00314-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(98)00314-2), PMID: 9678294

- Alexander Y**, Osto E, Schmidt-Trucksäss A, Shechter M, Trifunovic D, Duncker DJ, Aboyans V, Bäck M, Badimon L, Cosentino F, De Carlo M, Dorobantu M, Harrison DG, Guzik TJ, Hoefer I, Morris PD, Norata GD, Suades R, Taddei S, Vilahur G, et al. 2021. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovascular Research* **117**:29–42. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa085>, PMID: 32282914
- Antal MC**, Krust A, Chambon P, Mark M. 2008. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *PNAS* **105**:2433–2438. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0712029105>, PMID: 18268329
- Arnal JF**, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C, Girolami JP, Salvayre R, Bayard F. 1996. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *PNAS* **93**:4108–4113. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4108>, PMID: 8633024
- Arnal JF**, Lenfant F, Metivier R, Flouriot G, Henrion D, Adlanmerini M, Fontaine C, Gourdy P, Chambon P, Katzenellenbogen B, Katzenellenbogen J. 2017. Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiological Reviews* **97**:1045–1087. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2016>, PMID: 28539435
- Banerjee S**, Chambliss KL, Mineo C, Shaul PW. 2014. Recent insights into non-nuclear actions of estrogen receptor alpha. *Steroids* **81**:64–69. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.11.002>, PMID: 24252382
- Barton M**, Filardo EJ, Lolait SJ, Thomas P, Maggiolini M, Prossnitz ER. 2018. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **176**:4–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.021>, PMID: 28347854
- Begorre MA**, Dib A, Habchi K, Guihot AL, Bourreau J, Vessieres E, Blondeau B, Loufrani L, Chabbert M, Henrion D, Fassot C. 2017. Microvascular vasodilator properties of the angiotensin II type 2 receptor in a mouse model of type 1 diabetes. *Scientific Reports* **7**:45625. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep45625>, PMID: 28361992
- Belin de Chantemèle EJ**, Vessièrès E, Dumont O, Guihot A-L, Toutain B, Loufrani L, Henrion D. 2009. Reactive oxygen species are necessary for high flow (shear stress)-induced diameter enlargement of rat resistance arteries. *Microcirculation* **16**:391–402. DOI: <https://doi.org/10.1080/10739680902816301>, PMID: 19353375
- Belin de Chantemèle EJ**, Vessièrès E, Guihot A-L, Toutain B, Loufrani L, Henrion D. 2010. Cyclooxygenase-2 preserves flow-mediated remodelling in old obese Zucker rat mesenteric arteries. *Cardiovascular Research* **86**:516–525. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp411>
- Bergaya S**, Meneton P, Bloch-Faure M, Mathieu E, Alhenc-Gelas F, Lévy BI, Boulanger CM. 2001. Decreased flow-dependent dilation in carotid arteries of tissue kallikrein-knockout mice. *Circulation Research* **88**:593–599. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.res.88.6.593>, PMID: 11282893
- Billon-Galés A**, Fontaine C, Douin-Echinard V, Delpy L, Berges H, Calippe B, Lenfant F, Laurell H, Guéry J-C, Gourdy P, Arnal J-F. 2009. Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* **120**:2567–2576. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.898445>, PMID: 19996016
- Billon-Galés A**, Krust A, Fontaine C, Abot A, Flouriot G, Toutain C, Berges H, Gadeau A-P, Lenfant F, Gourdy P, Chambon P, Arnal J-F. 2011. Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor-alpha is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *PNAS* **108**:13311–13316. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1105632108>, PMID: 21788522
- Bolla M**, Matrougui K, Loufrani L, Maclouf J, Levy B, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D. 2002. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane- induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Journal of Vascular Research* **39**:353–360. DOI: <https://doi.org/10.1159/000065547>, PMID: 12187125
- Bouvet C**, Belin de Chantemèle E, Guihot A-L, Vessièrès E, Bocquet A, Dumont O, Jardel A, Loufrani L, Moreau P, Henrion D. 2007. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension* **50**:248–254. DOI: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.088716>, PMID: 17515452
- Brandes RP**, Schmitz-Winnenthal FH, Félétou M, Gödecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. 2000. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *PNAS* **97**:9747–9752. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.17.9747>, PMID: 10944233
- Briot A**, Jaroszewicz A, Warren CM, Lu J, Touma M, Rudat C, Hofmann JJ, Airik R, Weinmaster G, Lyons K, Wang Y, Kispert A, Pellegrini M, Iruela-Arispe ML. 2014. Repression of Sox9 by Jag1 is continuously required to suppress the default chondrogenic fate of vascular smooth muscle cells. *Developmental Cell* **31**:707–721. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.023>, PMID: 25535917
- Brouchet L**, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. 2001. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation* **103**:423–428. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.3.423>, PMID: 11157695
- Burger NZ**, Kuzina OY, Osol G, Gokina NI. 2009. Estrogen replacement enhances EDHF-mediated vasodilation of mesenteric and uterine resistance arteries: role of endothelial cell Ca2+. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **296**:E503–E512. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90517.2008>, PMID: 19126786

- Caillon A**, Grenier C, Grimaud L, Vessieres E, Guihot AL, Blanchard S, Lelievre E, Chabbert M, Foucher ED, Jeannin P, Beauvillain C, Abraham P, Loufrani L, Delneste Y, Henrion D. 2016. The angiotensin II type 2 receptor activates flow-mediated outward remodelling through T cells-dependent interleukin-17 production. *Cardiovascular Research* **112**:515–525. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw172>, PMID: 27328880
- Caulin-Glaser T**, García-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 1997. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circulation Research* **81**:885–892. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.res.81.5.885>, PMID: 9351464
- Chan YC**, Leung FP, Wong WT, Tian XY, Yung LM, Lau CW, Tsang SY, Yao X, Chen ZY, Huang Y. 2010. Therapeutically relevant concentrations of raloxifene dilate pressurized rat resistance arteries via calcium-dependent endothelial nitric oxide synthase activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **30**:992–999. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.203935>, PMID: 20185791
- Chehaitly A**, Vessieres E, Guihot AL, Henrion D. 2021. Flow-mediated outward arterial remodeling in aging. *Mechanisms of Ageing and Development* **194**:111416. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111416>, PMID: 33333130
- Chen Z**, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. 1999. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *The Journal of Clinical Investigation* **103**:401–406. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI5347>, PMID: 9927501
- Contreras-Duarte S**, Chen P, Andía M, Uribe S, Irrarrázaval P, Kopp S, Kern S, Marsche G, Busso D, Wadsack C, Rigotti A. 2018. Attenuation of atherogenic apo B-48-dependent hyperlipidemia and high density lipoprotein remodeling induced by vitamin C and E combination and their beneficial effect on lethal ischemic heart disease in mice. *Biological Research* **51**:34. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0183-6>, PMID: 30219096
- Cruz MN**, Agewall S, Schenck-Gustafsson K, Kublickiene K. 2008. Acute dilatation to phytoestrogens and estrogen receptor subtypes expression in small arteries from women with coronary heart disease. *Atherosclerosis* **196**:49–58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.01.038>, PMID: 17367797
- Dietrich HH**, Horiuchi T, Xiang C, Hongo K, Falck JR, Dacey RG. 2009. Mechanism of ATP-induced local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral penetrating arterioles. *Journal of Vascular Research* **46**:253–264. DOI: <https://doi.org/10.1159/000167273>, PMID: 18984964
- Ding J**, Yu M, Jiang J, Luo Y, Zhang Q, Wang S, Yang F, Wang A, Wang L, Zhuang M, Wu S, Zhang Q, Xia Y, Lu D. 2020. Angiotensin II Decreases Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation via AT1R Nox/ROS/PP2A Pathway. *Frontiers in Physiology* **11**:566410. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.566410>, PMID: 33162896
- Doddaballapur A**, Michalik KM, Manavski Y, Lucas T, Houtkooper RH, You X, Chen W, Zeiher AM, Potente M, Dimmeler S, Boon RA. 2015. Laminar shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **35**:137–145. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304277>, PMID: 25359860
- Dumont O**, Loufrani L, Henrion D. 2007. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**:317–324. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000254684.80662.44>, PMID: 17158349
- Dupont S**, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* **127**:4277–4291. PMID: 10976058.
- Favre J**, Gao J, Zhang AD, Remy-Jouet I, Ouvrard-Pascaud A, Dautreux B, Escoubet B, Thuillez C, Jaisser F, Richard V. 2011. Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **300**:H2035–H2043. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00552.2010>, PMID: 21441311
- Florian M**, Lu Y, Angle M, Magder S. 2004. Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. *Steroids* **69**:637–645. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2004.05.016>, PMID: 15465108
- Fredette NC**, Meyer MR, Prossnitz ER. 2018. Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **176**:65–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.05.006>, PMID: 28529128
- Freed JK**, Beyer AM, LoGiudice JA, Hockenberry JC, Gutterman DD. 2014. Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation. *Circulation Research* **115**:525–532. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303881>, PMID: 24920698
- Freidja M. L**, Vessieres E, Clere N, Desquiere V, Guihot AL, Toutain B, Loufrani L, Jardel A, Procaccio V, Faure S, Henrion D. 2011. Heme oxygenase-1 induction restores high-blood-flow-dependent remodeling and endothelial function in mesenteric arteries of old rats. *Journal of Hypertension* **29**:102–112. DOI: <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833db36e>, PMID: 20935577
- Freidja ML**, Vessières E, Toutain B, Guihot A-L, Custaud M-A, Loufrani L, Fassot C, Henrion D. 2014. AGEs breaking and antioxidant treatment improves endothelium-dependent dilation without effect on flow-mediated remodeling of resistance arteries in old Zucker diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* **13**:55. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-55>, PMID: 24581152
- Garland CJ**, Dora KA. 2017. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiologica* **219**:152–161. DOI: <https://doi.org/10.1111/apha.12649>
- Green DJ**, Dawson EA, Groenewoud HMM, Jones H, Thijssen DHJ. 2014. Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: A meta-analysis. *Hypertension* **63**:376–382. DOI: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02044>, PMID: 24277765

- Guivarc'h E**, Buscato M, Guihot A, Favre J, Vessi res E, Grimaud L, Wakim J, Melhem N, Zahreddine R, Adlanmerini M, Loufrani L, Knauf C, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Foidart J, Gourdy P, Lenfant F, Arnal J, Henrion D, Fontaine C. 2018. Predominant Role of Nuclear Versus Membrane Estrogen Receptor α in Arterial Protection: Implications for Estrogen Receptor α Modulation in Cardiovascular Prevention/Safety. *Journal of the American Heart Association* **7**:13. DOI: <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.008950>
- Guivarc'h E**, Favre J, Guihot A-L, Vessi res E, Grimaud L, Proux C, Rivron J, Barbelivien A, Fassot C, Briet M, Lenfant F, Fontaine C, Loufrani L, Arnal J-F, Henrion D. 2020. Nuclear Activation Function 2 Estrogen Receptor α Attenuates Arterial and Renal Alterations Due to Aging and Hypertension in Female Mice. *Journal of the American Heart Association* **9**:e013895. DOI: <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013895>, PMID: 32102616
- Hashimoto M**, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. 1995. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* **92**:3431–3435. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.12.3431>, PMID: 8521564
- Hill JV**, Findon G, Appelhoff RJ, Endre ZH. 2010. Renal autoregulation and passive pressure-flow relationships in diabetes and hypertension. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* **299**:F837–F844. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00727.2009>, PMID: 20660017
- Huang A**, Sun D, Koller A, Kaley G. 1998. Gender difference in flow-induced dilation and regulation of shear stress: role of estrogen and nitric oxide. *The American Journal of Physiology* **275**:R1571–R1477. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.5.R1571>, PMID: 9791075
- Huang A**, Sun D, Koller A, Kaley G. 2000. 17 β -estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. *Circulation* **101**:94–100. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.1.94>, PMID: 10618310
- Huang A**, Wu Y, Sun D, Koller A, Kaley G. 2001. Effect of estrogen on flow-induced dilation in NO deficiency: role of prostaglandins and EDHF. *Journal of Applied Physiology* **91**:2561–2566. DOI: <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.6.2561>
- Iglarz M**, Matrougui K, L vy BI, Henrion D. 1998. Chronic blockade of endothelin ETA receptors improves flow dependent dilation in resistance arteries of hypertensive rats. *Cardiovascular Research* **39**:657–664. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00151-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00151-5), PMID: 9861309
- Jacenic D**, Cygankiewicz AI, Krajewska WM. 2016. The G protein-coupled estrogen receptor as a modulator of neoplastic transformation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **429**:10–18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.04.011>, PMID: 27107933
- Joannides R**, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, L scher TF. 1995. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* **91**:1314–1319. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.5.1314>, PMID: 7867167
- John L**, Ko NL, Gokin A, Gokina N, Mandal  M, Osol G. 2018. The Piezo1 cation channel mediates uterine artery shear stress mechanotransduction and vasodilation during rat pregnancy. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **315**:H1019–H1026. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00103.2018>, PMID: 30004235
- Kalluri AS**, Vellarikkal SK, Edelman ER, Nguyen L, Subramanian A, Ellinor PT, Regev A, Kathiresan S, Gupta RM. 2019. Single-Cell Analysis of the Normal Mouse Aorta Reveals Functionally Distinct Endothelial Cell Populations. *Circulation* **140**:147–163. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038362>, PMID: 31146585
- Koni PA**, Joshi SK, Temann UA, Olson D, Burkly L, Flavell RA. 2001. Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* **193**:741–754. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.193.6.741>, PMID: 11257140
- Kublickiene K**, Svedas E, Landgren BM, Crisby M, Nahar N, Nisell H, Poston L. 2005. Small artery endothelial dysfunction in postmenopausal women: in vitro function, morphology, and modification by estrogen and selective estrogen receptor modulators. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**:6113–6122. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0419>, PMID: 16131583
- Kublickiene K**, Fu XD, Svedas E, Landgren BM, Genazzani AR, Simoncini T. 2008. Effects in postmenopausal women of estradiol and medroxyprogesterone alone and combined on resistance artery function and endothelial morphology and movement. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**:1874–1883. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2651>, PMID: 18319309
- Kukulski F**, Ben Yebdri F, Lecka J, Kauffenstein G, L vesque SA, Mart n-Satu  M, S vigny J. 2009. Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. *Cytokine* **46**:166–170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.02.011>, PMID: 19303321
- Lant n-Hermoso RL**, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW. 1997. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *The American Journal of Physiology* **273**:L119–L126. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.273.1.L119>, PMID: 9252548
- LeBlanc AJ**, Reyes R, Kang LS, Dailey RA, Stallone JN, Moninka NC, Muller-Delp JM. 2009. Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **297**:R1713–R1723. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00178.2009>, PMID: 19812360
- Lhomme A**, Gilbert G, Pele T, Deweirdt J, Henrion D, Baudrimont I, Campagnac M, Marthan R, Guibert C, Ducret T, Savineau JP, Quignard JF. 2019. Stretch-activated Piezo1 Channel in Endothelial Cells Relaxes Mouse

- Intrapulmonary Arteries. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **60**:650–658. DOI: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0197OC>, PMID: 30562052
- Loufrani L, Matrougui K, Li Z, Levy BI, Lacolley P, Paulin D, Henrion D. 2002. Selective microvascular dysfunction in mice lacking the gene encoding for desmin. *FASEB Journal* **16**:117–119. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.01-0505fje>, PMID: 11729100
- Lu Q, Schnitzler GR, Vallaster CS, Ueda K, Erdkamp S, Briggs CE, Iyer LK, Jaffe IZ, Karas RH. 2017. Unliganded estrogen receptor alpha regulates vascular cell function and gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* **442**:12–23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.019>, PMID: 27888004
- Mandala M, Osol G. 2012. Physiological remodelling of the maternal uterine circulation during pregnancy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **110**:12–18. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00793.x>, PMID: 21902814
- Meyer MC, Cummings K, Osol G. 1997. Estrogen replacement attenuates resistance artery adrenergic sensitivity via endothelial vasodilators. *The American Journal of Physiology* **272**:H2264–H2270. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.5.H2264>, PMID: 9176294
- Meyer MR, Baretella O, Prossnitz ER, Barton M. 2010. Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. *Pharmacology* **86**:58–64. DOI: <https://doi.org/10.1159/000315497>, PMID: 20639684
- Meyer MR, Fredette NC, Daniel C, Sharma G, Amann K, Arterburn JB, Barton M, Prossnitz ER. 2016. Obligatory role for GPER in cardiovascular aging and disease. *Science Signaling* **9**:ra105. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag0240>, PMID: 27803283
- Nathan L, Shi W, Dinh H, Mukherjee TK, Wang X, Lusis AJ, Chaudhuri G. 2001. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. *PNAS* **98**:3589–3593. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.051003698>, PMID: 11248122
- Ohlmann P, Tesse A, Loichot C, Ralay Ranaivo H, Roul G, Philippe C, Watterson DM, Haiech J, Andriantsitohaina R. 2005. Deletion of MLCK210 induces subtle changes in vascular reactivity but does not affect cardiac function. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **289**:H2342–H2349. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00511.2004>, PMID: 16055522
- Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. 2001. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *Journal of Hypertension* **19**:415–420. DOI: <https://doi.org/10.1097/00004872-200103000-00009>, PMID: 11288811
- Peixoto P, Aires RD, Lemos VS, Bissoli NS, Santos RLD. 2017. GPER agonist dilates mesenteric arteries via PI3K-Akt-eNOS and potassium channels in both sexes. *Life Sciences* **183**:21–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.06.020>, PMID: 28645860
- Petit M, Guihot A-L, Grimaud L, Vessieres E, Toutain B, Menet M-C, Nivet-Antoine V, Arnal J-F, Loufrani L, Procaccio V, Henrion D, Huang Y. 2016. Resveratrol Improved Flow-Mediated Outward Arterial Remodeling in Ovariectomized Rats with Hypertrophic Effect at High Dose. *PLOS ONE* **11**:e0146148. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146148>
- Pietras RJ, Szego CM. 1977. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* **265**:69–72. DOI: <https://doi.org/10.1038/265069a0>, PMID: 834244
- Prossnitz ER, Barton M. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews. Endocrinology* **7**:715–726. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>, PMID: 21844907
- Rizzoni D, Agabiti Rosei E. 2006. Small artery remodeling in hypertension and diabetes. *Current Hypertension Reports* **8**:90–95. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11906-006-0046-3>, PMID: 16600165
- Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. 2001. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circulation Research* **89**:678–683. DOI: <https://doi.org/10.1161/hh2001.097691>, PMID: 11597990
- Simoncini T. 2009. Mechanisms of action of estrogen receptors in vascular cells: relevance for menopause and aging. *Climacteric* **12 Suppl 1**:6–11. DOI: <https://doi.org/10.1080/13697130902986385>, PMID: 19811233
- Smirnova NF, Fontaine C, Buscato M, Lupieri A, Vinel A, Valera MC, Guillaume M, Malet N, Foidart JM, Raymond-Letron I, Lenfant F, Gourdy P, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Laffargue M, Arnal JF. 2015. The Activation Function-1 of Estrogen Receptor Alpha Prevents Arterial Neointima Development Through a Direct Effect on Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* **117**:770–778. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306416>, PMID: 26316608
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *The New England Journal of Medicine* **331**:1056–1061. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM199410203311604>, PMID: 8090165
- Stoner L, Sabatier MJ. 2012. Use of ultrasound for non-invasive assessment of flow-mediated dilation. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **19**:407–421. DOI: <https://doi.org/10.5551/jat.11395>, PMID: 22659525
- Sudhir K, Chou TM, Mullen WL, Hausmann D, Collins P, Yock PG, Chatterjee K. 1995. Mechanisms of estrogen-induced vasodilation: in vivo studies in canine coronary conductance and resistance arteries. *Journal of the American College of Cardiology* **26**:807–814. DOI: [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(95\)00248-3](https://doi.org/10.1016/0735-1097(95)00248-3), PMID: 7642876
- Sudhir K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K, Rubanyi GM. 1997. Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *Lancet* **349**:1146–1147. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)63022-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)63022-X), PMID: 9113019

- Sullivan JC**, Rodriguez-Miguel P, Zimmerman MA, Harris RA. 2015. Differences in angiotensin (1-7) between men and women. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **308**:H1171-H1176. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00897.2014>, PMID: 25659489
- Sun D**, Huang A, Yan EH, Wu Z, Yan C, Kaminski PM, Oury TD, Wolin MS, Kaley G. 2004. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **286**:H2249-H2256. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00854.2003>, PMID: 14751861
- Sun D**, Yan C, Jacobson A, Jiang H, Carroll MA, Huang A. 2007. Contribution of epoxyeicosatrienoic acids to flow-induced dilation in arteries of male ERalpha knockout mice: role of aromatase. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **293**:R1239-R1246. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00185.2007>, PMID: 17634204
- Svedas E**, Nisell H, Vanwijk MJ, Nikas Y, Kublickiene KR. 2002. Endothelial dysfunction in uterine circulation in preeclampsia: can estrogens improve it? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **187**:1608-1616. DOI: <https://doi.org/10.1067/mob.2002.127378>, PMID: 12501072
- Szego CM**, Davis JS. 1967. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *PNAS* **58**:1711-1718. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.58.4.1711>, PMID: 4295833
- Tarhouni K**, Guihot AL, Freidja ML, Toutain B, Henrion B, Baufreton C, Pinaud F, Procaccio V, Grimaud L, Ayer A, Loufrani L, Lenfant F, Arnal JF, Henrion D. 2013. Key role of estrogens and endothelial estrogen receptor α in blood flow-mediated remodeling of resistance arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **33**:605-611. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300334>, PMID: 23288162
- Tarhouni K**, Freidja ML, Guihot AL, Vessieres E, Grimaud L, Toutain B, Lenfant F, Arnal JF, Loufrani L, Henrion D. 2014a. Role of estrogens and age in flow-mediated outward remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **307**:H504-H514. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00986.2013>, PMID: 24929854
- Tarhouni K**, Guihot A-L, Vessières E, Toutain B, Procaccio V, Grimaud L, Loufrani L, Lenfant F, Arnal J-F, Henrion D. 2014b. Determinants of flow-mediated outward remodeling in female rodents: respective roles of age, estrogens, and timing. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **34**:1281-1289. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303404>, PMID: 24700123
- Toutain CE**, Brouchet L, Raymond-Letron I, Vicendo P, Bergès H, Favre J, Fouque M-J, Krust A, Schmitt A-M, Chambon P, Gourdy P, Arnal J-F, Lenfant F. 2009. Prevention of skin flap necrosis by estradiol involves reperfusion of a protected vascular network. *Circulation Research* **104**:245-254. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182410>, PMID: 19059842
- Tropea T**, De Francesco EM, Rigracchio D, Maggiolini M, Wareing M, Osol G, Mandalà M. 2015. Pregnancy Augments G Protein Estrogen Receptor (GPER) Induced Vasodilation in Rat Uterine Arteries via the Nitric Oxide - cGMP Signaling Pathway. *PLOS ONE* **10**:e0141997. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141997>, PMID: 26536245
- Wang SP**, Iring A, Strlic B, Albarrán Juárez J, Kaur H, Troidl K, Tonack S, Burbiel JC, Müller CE, Fleming I, Lundberg JO, Wettschureck N, Offermanns S. 2015. P2Y₂ and Gq/G₁₁ control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. *The Journal of Clinical Investigation* **125**:3077-3086. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI81067>, PMID: 26168216
- 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. *The Journal of Clinical Investigation* **126**:4527-4536. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI87343>, PMID: 27797339
- Wu LH**, Chang HC, Ting PC, Wang DL. 2018. Laminar shear stress promotes mitochondrial homeostasis in endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* **233**:5058-5069. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.26375>, PMID: 29219180

- Yu X**, Stallone JN, Heaps CL, Han G, Migliaccio A. 2018. The activation of G protein-coupled estrogen receptor induces relaxation via cAMP as well as potentiates contraction via EGFR transactivation in porcine coronary arteries. *PLOS ONE* **13**:e0191418. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191418>
- Zahreddine R**, Davezac M, Buscato M, Smirnova N, Laffargue M, Henrion D, Adlanmerini M, Lenfant F, Arnal JF, Fontaine C. 2021. A historical view of estrogen effect on arterial endothelial healing: From animal models to medical implication. *Atherosclerosis* **338**:30–38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.10.013>, PMID: 34785429
- Zhou J**, Li YS, Chien S. 2014. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **34**:2191–2198. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303422>, PMID: 24876354

Titre : Mécanotransduction endothéliale *in vitro* : Recherche de signatures protéiques en condition de flux physiologique et pathologique et mise en évidence de l'implication de la sous-unité Navβ3

Mots clés : cellule endothéliale, shear stress, mécanotransduction, Navβ3

Résumé : Les cellules endothéliales (CE) sont le chef d'orchestre de l'homéostasie vasculaire et la dysfonction endothéliale est responsable du développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires dont l'athérosclérose. Le stimulus clé pour la fonction endothéliale est la contrainte de cisaillement engendrée par le flux sanguin.

Une partie de mon travail de thèse a consisté à identifier de nouvelles protéines signatures d'un flux physiologique athéroprotecteur ou d'un flux pathologique athéropromoteur, par une analyse du protéome total de CE exposées à un shear stress laminaire physiologique ou à un shear stress oscillatoire pathologique. Nous avons ainsi identifié deux nouvelles protéines : l'éphrine B1 et la pentraxine 3 dont les expressions sont respectivement régulées positivement et négativement par le flux physiologique mais dont les rôles dans la mécanotransduction restent à être explorés.

Mon travail de thèse a également permis de mettre

en évidence l'implication de la sous-unité Navβ3, sous-unité auxiliaire des canaux Na⁺ dépendants du potentiel, dans les CE en réponse à un shear stress. Après avoir montré que son expression est régulée positivement par un flux laminaire physiologique uniquement, nous avons montré que Navβ3 a un rôle dans l'alignement des CE au flux. Nous avons identifié un nouveau partenaire de Navβ3, mTOR, qui suggère un rôle de Navβ3 dans l'autophagie endothéliale en réponse à un flux laminaire, mécanisme clé de la fonction endothéliale physiologique. Ces résultats identifient donc Navβ3 comme nouvel acteur athéroprotecteur de la mécanotransduction endothéliale *in vitro*.

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de positionner la sous-unité Navβ3 comme nouvel acteur dans la mécanotransduction de la CE, et de révéler de nouvelles protéines caractéristiques d'un flux physiologique ou pathologique dans l'optique d'une meilleure compréhension des mécanismes athérogéniques.

Title: Endothelial mechanotransduction *in vitro*: looking for new signature proteins under physiological and pathological flow conditions and involvement of Navβ3 subunit

Keywords: endothelial cells, shear stress, mechanotransduction, Navβ3

Abstract: Endothelial cells (EC) are the central actor of vascular homeostasis and endothelial dysfunction is responsible for the development of many cardiovascular pathologies including atherosclerosis. The key stimulus for endothelial function is shear stress generated by blood flow.

Part of my thesis work consisted of identify new proteins as signatures of an atheroprotective physiological flow or an atheroprone pathological flow, through an analysis of the total proteome of EC exposed to a physiological laminar shear stress or to a pathological oscillatory shear stress. We identified two new proteins: ephrin B1 and pentraxin 3, whose expressions are positively and negatively regulated by physiological flow, respectively, but whose roles in mechanotransduction remain to be elucidated.

My thesis work also showed the involvement of the

Navβ3 subunit, an auxiliary subunit of the voltage-gated Na⁺ channels, in EC in response to shear stress. After showing that its expression was upregulated by physiological laminar flow only, we demonstrated that Navβ3 has a role in the EC alignment to flow. We identified a novel partner of Navβ3, mTOR, which suggests a role for Navβ3 in endothelial autophagy in response to laminar flow, a key mechanism of physiological endothelial function. These results thus identify Navβ3 as a new atheroprotective actor of endothelial mechanotransduction *in vitro*.

Taken together, this thesis work has positioned the Navβ3 subunit as a novel actor in EC mechanotransduction, and identified new proteins potentially involved in physiological or pathological flow responses in order to better understand atherogenic mechanisms.