Université Paris Cité

École doctorale Hématologie Oncogenèse et Biothérapies n°561

UMR_S1134 Biologie Intégrée du Globule Rouge

Rôle de la stomatine dans la modulation de canaux ioniques mécanosensibles : impact sur les défauts d'hydratation du globule rouge

Par Sarah ROUGE

Thèse de doctorat d'Hématologie

Dirigée par Isabelle MOURO-CHANTELOUP

Présentée et soutenue publiquement le 05 décembre 2022

Devant un jury composé de :

Hélène GUIZOUARN, DR CNRS, Université de Nice Sophia Antipolis	Rapportrice
Loïc GARCON, PU-PH, Université Jules Verne Picardie,	Rapporteur
Laura BACIOU, DR CNRS, Université Paris Saclay,	Examinatrice
Mariano OSTUNI, PU, Université Paris Cité,	Examinateur
Isabelle Mouro-Chanteloup, CRHC INSERM, Université Paris Cité	Directrice de thèse

Rôle de la stomatine dans la modulation de canaux ioniques mécanosensibles : impact sur les défauts d'hydratation du globule rouge

Résumé :

Le globule rouge (GR) humain possède une grande capacité à se déformer, pour s'adapter à divers stress, en particulier un stress mécanique, lors de son passage dans les capillaires et un stress osmotique, pour résister à la tonicité du milieu. Les canaux ioniques mécanosensibles à la membrane du GR constituent des acteurs majeurs de cette régulation par modulation indirecte de son contenu en eau. C'est le cas de Piezo1 et la Pannexine1 (PANX1) : le premier canal, quand il est stimulé, laisse entrer le calcium entrainant une perte d'eau par efflux de potassium via l'activation du canal potassique calcium-dépendant Gardos ; et le second canal, une fois activé, laisse sortir l'Adénosine TriPhosphate (ATP), permettant un gain d'eau par influx de sodium via l'activation du récepteur purinergique ATP-dépendant.

Dans les neurones, une régulation des canaux mécanosensibles fait intervenir des protéines de la famille des stomatines. Or, la stomatine érythrocytaire, fortement exprimée dans des microdomaines membranaires riches en cholesterol, est absente des GRs de rares patients atteints de stomatocytose héréditaire à hématies hyperhydratées (OHSt).

Bénéficiant de prélèvements sanguins de témoins et de 3 de ces patients, les travaux de cette thèse ont pour objectif l'étude des flux ioniques en présence et en absence de la stomatine, après stimulations de PANX1 et de Piezo1. Une invalidation par CRISPR Cas9 de l'expression de la stomatine à la membrane de cellules de la lignée érythroleucémique K-562 a également permis de confirmer les résultats obtenus sur GRs.

Après vérification de la proximité de la stomatine avec la PANX1 et avec Piezo1 par Proximity Ligation Assay (PLA) *in situ* sur GRs, stromas et cellules K-562, nous avons démontré que 1) l'activation de PANX1 par élévation du potassium extracellulaire induit l'influx de la 5(6)-carboxyfluoresceine augmenté de 34% dans les GRs témoins (stom+) et de seulement 11% dans les GRs OHSt (stom-); dans les cellules K-562 stom+, l'influx de TO-PRO-3 est augmenté de 35.72% et de seulement 18.46% dans les cellules stom-, après stimulation mécanique de PANX1 ; 2) l'activation de Piezo1 avec son agoniste Yoda1 dans les GRs entraine dans les GRs OHSt une diminution de 57.38% de l'influx calcique par rapport aux GRs témoins.

Cette diminution de l'activité des canaux ioniques PANX1 et Piezo1 serait donc corrélée à une perte de mécanosensibilité en absence de stomatine, celle-ci entrainant une déstabilisation des radeaux lipidiques et provoquant la perte partielle de rigidité de la membrane.

Mots clefs : globule rouge, canaux ioniques, Pannexine1, Piezo1, mécanosensible, Stomatine

Role of stomatin in modulating mechanosensitive ion channels: impact on red blood cell hydration defects

Abstract

The human red blood cell (RBC) has a great capacity to deform, to adapt to various stresses, in particular mechanical stress, during its passage through capillaries and osmotic stress, to resist the tonicity of the environment. Mechanosensitive ion channels at the RBC membrane are major players in this regulation by indirect modulation of its water content. This is the case of Piezo1 and Pannexin1 (PANX1): the first channel, when stimulated, allows calcium influx leading to a loss of water by potassium efflux via the activation of the calcium-dependent potassium channel Gardos; and the second channel, when activated, allows the efflux of Adenosine TriPhosphate (ATP), leading to a gain of water by sodium influx via the activation of the ATP-dependent purinergic receptor

In neurons, a regulation of mechanosensitive channels involves proteins of the stomatin family. However, erythroid stomatin, highly expressed in cholesterol-rich microdomains of the membrane, is absent from the RBCs of rare patients with Overhydrated Hereditary stomatocytosis (OHSt).

Using blood samples from controls and 3 of these patients, the aim of this thesis is to study the ionic fluxes in the presence and absence of stomatin, after PANX1 and Piezo1 stimulation. A CRISPR Cas9 invalidation of stomatin expression on the membrane of the erythroleukemia cell line K-562 also confirmed the results obtained on GRs.

After verification of the proximity of stomatin to PANX1 and Piezo1 by *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) in GRs, stromas and K-562 cells, we demonstrated that 1) PANX1 activation by elevation of extracellular potassium induced the influx of 5(6)-carboxyfluorescein increased by 34% in control RBCs (stom+) and by only 11% in OHSt RBCs (stom-) and, in K-562 stom+ cells, TO-PRO-3 influx is increased by 35.72% and only 18.46% in stom- cells, after mechanical stimulation of PANX1; 2) activation of Piezo1 with its agonist Yoda1 in OHSt RBCs results in a 57.38% decrease in calcium influx compared to control RBCs.

This decrease of PANX1 and Piezo1 ion channels activity would be correlated to a loss of mechanosensitivity in the absence of stomatin, which leads to a destabilization of lipid rafts and to a partial loss of membrane rigidity.

Key words: red blood cell, ion channels, Pannexin1, Piezo1, mechanosensitivity, Stomatin

Remerciements

Ces quatre années de thèse ont été tellement riches en rencontres en changements dans ma vie, j'espère n'oublier personne.

Je remercie avant tout ma directrice de thèse Isabelle Mouro-Chanteloup, de m'avoir donné toutes les opportunités de découvrir le monde scientifique durant cette thèse. Merci du fond du cœur pour ta bienveillance tout au long de mon parcours au sein de cette unité Inserm. Merci pour ta confiance et ton implication.

Je remercie Sandrine Genetet, Jean-Philippe Semblat et Alexandra Desrames pour leurs expertises techniques et sans qui cette thèse n'aurait pas aussi bien avancé.

Je remercie également Mariano A. Ostuni et Sophie Lefèvre, pour toute leur bienveillance et leur soutien.

Je remercie mes camarades anciennes et nouvelles doctorantes/post-doctorantes de l'unité : Margaux, Charlotte, Marion, Alice T., Alice D., Clara-Eva, Sandy, Auria, Alissa, Farah, Yann, Asrar, Carine…. Merci à tous les membres du WnC.

Je remercie également les autres membres du laboratoire : Mélanie, Alioune, Slim, Abdellah, Emmanuelle, Mickael, Laetitia, Pascal, Patricia, Arnaud, Romain, Benoit, Gabriel, Claude, Cécile, Valentine.

Je remercie Yves Colin-Aronovicz et Caroline le Van Kim de m'avoir accueillie au sein de l'unité et de l'équipe 1, et la Collectivité Territoriale de Martinique pour le financement de ces 3 années de thèse.

Je remercie également mes collaborateurs extérieurs qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires respectifs, Michael Dussiot à IMAGINE, Hélène Guizouarn et Benoit Allegrini au Centre de Biologie de Valrose, Lars Kaestner à l'université de Saarlandes, Phillipe Lory et Amaël Davakan à l'institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier.

Enfin, je vous remercie, Dr Hélène Guizouarn et Pr Loïc Garçon, rapporteurs de cette thèse pour toute l'attention que vous porterez à mes travaux et à mon manuscrit.

Je remercie toute ma famille, mon frère et ma grand-mère.

Et je remercie tous ceux qui liront ce manuscrit, qui referont vivre mes travaux pour quelques lignes ou quelques chapitres. Bonne lecture.

Liste des principales abréviations

ADN Acide DésoxyriboNucléique

AE1 Anion Exchanger 1

APC AlloPhycoCyanine

ASICs Acido-Sensing Ion Channels

ATP Adénosine Triphosphate

ATPe ATP extracellulaire

BSA Bovine Serum Albumin

CBX Carbenoxolone

CCMH Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CRAC Cholesterol Recognition /interaction Amino acid Consensus

CRISPR Clustered Regulary Interspace Palindromic Repeats

Cryo-EM Cryo Microscopie Electronique

CTB Sous-unité B de la Cholera Toxine

CF Carboxyfluoresceine

DMSO DiMéthylSulfOxyde

DiBAC$_4$(3) Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol,

ECL Enhanced Chemiluminescence

EDTA ÉthylèneDiamineTétraAcétique

FACS Fluorescence Activated Cytometry Sorting

FITC Fluorescein IsoThioCyanate

Gd3+ Gadolinium oxide III, Inhibiteur de canaux ioniques mécanosensibles

GFP Green Fluorescent Protein

GOF (mutation) Gain de Fonction

GR Globule Rouge

HDR Homology Directed Repair

HEPES acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HRP horseradish peroxidase

ID Index de Déformabilité

IE Index d'Elongation

KO Knock Out

LOF (mutation) Perte de Fonction

LRRC8a Leucine Rich Repeat containing protein 8a

MFQ Méfloquine

MsC -L -S MechanoSensitive Channel Large/Small conductance

MOPS acide 3-morpholino-1-propanesulfonique

NP40 Nonidet P40

OHSt Stomatocytose héréditaire à globule rouge hyperhydraté

PAGE PolyAcrylamid Gel Electrophoresis

PANX1 Pannexine1

PBC Probenecid

PBS Phosphate Buffer Saline

PLA Proximity Ligation Assay

PS Phosphatidyl Serine

PVDF PolyFluorure de VinyliDène

PVP PolyVinylPyrrolidone

RR Ruthenium Red

RFP Red Fluorescent Protein

SDS Sodium DodécylSulfate

SLP-3/STOML3 Stomatin Like Protein 3

SMA Styrene Maleic Acid

SMALPs Styrene Maleic Acid LipoParticles

STM Segment TransMembranaire

Stom stomatine/band7.2b

TBS Tris Buffer Saline

TRP Transient Receptor Potential

VGM Volume Globulaire Moyen

Sommaire

INTRODUCTION 5

CHAPITRE 1 : LE GLOBULE ROUGE HUMAIN 6

CHAPITRE 2 : LES CANAUX IONIQUES 20

CHAPITRE 3 : LA MECANOSENSIBILITE 25

CHAPITRE 4 : ACTEURS DE LA MECANOSENSIBILITE DANS LE GR 31

OBJECTIFS DE LA THESE 39

PATIENTS ET METHODES 42

1. MODELES CELLULAIRES 43

2. STRUCTURE MOLECULAIRE 51

3. MESURE D'ACTIVITE DES CANAUX IONIQUES 61

RESULTATS 66

AXE I : L'ACTIVITE MECANOSENSIBLE DE LA PANNEXINE1 EST MODULEE PAR LA STOMATINE DANS LE GLOBULE ROUGE HUMAIN 68

1. INTRODUCTION DE L'AXE I 69

2. ARTICLE PUBLIE 71

3. FIGURES SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE 90

4. TRAVAUX ET FIGURES SUPPLEMENTAIRES NON PUBLIES 93

5. CONCLUSION ET DISCUSSION DU CHAPITRE 1 97

AXE II : MODIFICATION DE L'ACTIVITE MECANOSENSIBLE DE PIEZO1 IMPLIQUANT UNE INTERACTION DU CANAL AVEC LA STOMATINE 104

1. INTRODUCTION A L'AXE II 105

2. RESULTATS DE L'AXE II 107

3. DISCUSSION DE L'AXE II 129

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 137

1. EXPRESSION DE LA STOMATINE DANS UN CONTEXTE ERYTHROÏDE 138

2. COMPLEXE PROTEIQUE D'INTERACTION DE LA STOMATINE AVEC PANNEXINE1 (PANX1) OU PIEZO1 140

3. REGULATION DE L'ACTIVITE DES CANAUX IONIQUES MECANOSENSIBLES PAR LA STOMATINE DANS UN CONTEXTE ERYTHROÏDE 142

4. IMPLICATION DES LIPIDES DANS LES COMPLEXES STOMATINES-CANAUX IONIQUES MECANOSENSIBLES ET LEUR ACTIVITE 145

5. INTERACTIONS FONCTIONNELLES ENTRE LA PANX1 ET PIEZO1 DANS LE GR ? 146

ANNEXES 149

FICHE PRODUIT REJUVESOL 150

CARACTERISATION CELLULAIRE DES CLONES STOM+ ET STOM- 152

MICRODOMAINES DANS LES CELLULES STOM+ ET STOM- 153

TRANSFECTION DU PLASMIDE PMELUC DANS LES CLONES STOM+ ET STOM- 155

MARQUEURS D'APOPTOSE DES GRS TEMOINS ET OHST 157

CA^{2+} INTRACELLULAIRE A L'ETAT BASAL DE GRS TEMOINS ET OHST AVANT ET APRES REJUVENATION 157

INFLUX DE CA^{2+} APRES STIMULATION HYPOSMOTIQUE DANS LES GRS TEMOINS ET OHST DECONGELES SANS REJUVENATION. 159

MESURE DU SODIUM INTRACELLULAIRE 160

IDENTIFICATIONS DES PROTEINES APRES IMMUNOPRECIPITATION DES SMALPS ENRICHIS EN PIEZO1 163

TEST DE LA TRANSFECTION DE PIEZO1-FLAG PAR ENREGISTREMENT DES COURANTS EN CONFIGURATION « CELLULE-ATTACHEE » APRES STIMULATION PAR PRESSION NEGATIVE. 164

ACTIVATION DE PIEZO1 DANS LES CELLULES SUREXPRIMANT LA STOMATINE (STOM++) 165

EFFET DE L'ACTIVATION DE PIEZO1 SUR LE RELARGAGE D'ATP DANS LES GRS 166

TABLE DES MATIERES 167

TABLE DES ILLUSTRATIONS 171

BIBLIOGRAPHIE 177

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LE GLOBULE ROUGE HUMAIN

Caractéristiques biologiques (cellulaires)

Afin d'obtenir un globule rouge (GR) mature, les cellules souches hématopoïétiques prolifèrent et se différencient lors d'un processus appelé érythropoïèse. Chez l'Homme adulte, il débute dans la moelle osseuse où le progéniteur commun de la lignée myéloïde se différencie successivement en progéniteur mégacaryocyte-érythroïde, puis en proérythroblaste, en érythroblaste basophile, polychromatophile et orthochromatique, principalement sous le contrôle de l'érythropoïétine (Palis 2014) (***Figure 1***). Durant ces différents stades, la chromatine se condense, le noyau rétrécit (Ji, Murata-Hori, et Lodish 2011) et la quantité d'Acide RiboNucléotide messager (ARNm) diminue au bénéfice de ceux codant pour les globines et les protéines membranaires (Wong et al. 2011).

Au cours de l'étape finale de ce processus, l'érythroblaste est délesté de son noyau et de ses autres organelles (Ji, Murata-Hori, et Lodish 2011). La cellule obtenue est alors appelée réticulocyte, et poursuit sa maturation dans les vaisseaux sanguins (aussi appelés circulation périphérique), consistant en la clairance des organelles, et au remodelage de son protéome (Moras, Lefevre, et Ostuni 2017). Cette cellule mature très rapidement en GR de sorte qu'elle est présente en très faible concentration dans la circulation sanguine (entre 0.5 et 1.5% des GRs).

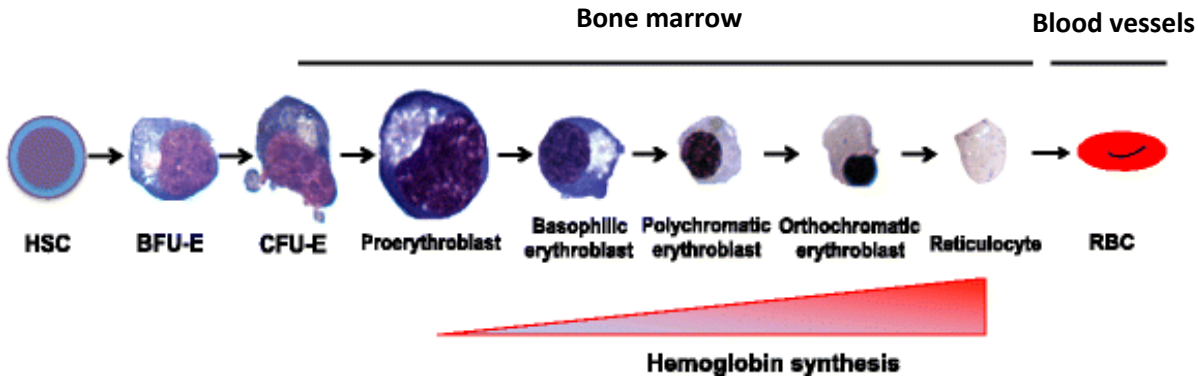


Figure 1 *: Schéma de la différenciation érythroïde dite définitive.*
Adapté de la revue (Zivot et al. 2018)

Le GR mature ne disposant plus de matériel lui permettant de produire de protéines, ni de système de production énergétique mitochondrial (respiration cellulaire), il circule dans les vaisseaux sanguins avec le contenu nécessaire à sa survie pendant environ 120 jours. Il doit donc y avoir un équilibre entre la production de GRs par l'érythropoïèse et leur élimination de la circulation en grande partie par les cellules phagocytaires de la rate et du foie. Cet équilibre permet de conserver une concentration sanguine en hématie entre 4,5 et 6 $x10^9$/L de sang pour un homme.

Le GR mature adopte dans les vaisseaux sanguins une forme caractéristique discoïde biconcave avec une taille de 7-8 μm de largeur et 2 μm d'épaisseur pour un volume globulaire moyen (VGM) de 90 fL et une surface de 140 μm^2. Les GRs gardent cette morphologie quand il est dans une solution dite isotonique comprenant 0,9% de NaCl. Dans une solution plus concentrée en sel, il prend un aspect de sphère avec des spicules appelé échinocytes alors que dans une solution plus diluée en sel, le GR gonfle en prenant une morphologie plus sphérique. Cette capacité à se déformer très rapidement selon la tonicité du milieu définit la grande plasticité morphologique du GR en comparaison avec d'autres cellules (Larkin et Kuchel 2010). Grâce à cette morphologie qui permet un ratio surface/volume élevé, et à sa grande résistance osmotique, le GR très flexible peut circuler dans les vaisseaux sanguins les plus étroits de diamètre de 2 à 3 μm : les capillaires (Evans et Hochmuth 1976) et les cordons spléniques, où les GRs les moins déformables sont éliminés de la circulation (Mebius et Kraal 2005).

Structure moléculaire

Le cytosol du GR est composé d'un soluté de concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) de 34 g/dL, faisant de cette protéine l'une des plus solubles et la plus abondante (98% de la masse) du GR et du tissu sanguin. L'hémoglobine assure l'une des principales fonctions de l'érythrocyte : la délivrance de l'oxygène aux organes. D'ailleurs, la viscosité sanguine, l'une des propriétés majeures

du sang en circulation, dépend en grande partie du taux d'hémoglobine dans le sang qui, en conditions physiologiques est supérieur à 13 g/L pour un homme et à 12 g/L pour une femme.

Étant donné la simplicité du GR qui ne comporte aucun compartiment intracellulaire, sa membrane plasmique appelée aussi plasmalemme a été facilement isolée et étudiée, en éliminant l'hémoglobine (Dodge, Mitchell, et Hanahan 1963). Cette membrane d'une épaisseur de 5 nm, sépare le milieu extracellulaire du milieu intracellulaire par **deux couches de lipides** hétérogènes (appelé feuillet interne et externe) dans lesquelles sont insérés des **complexes protéiques** (Singer et Nicolson 1972).

Les **lipides** constituent 42% de la membrane du GR avec principalement des phospholipides, des sphingolipides et du cholestérol.

Les phospholipides sont composés d'une partie polaire qui fait face au milieu extracellulaire et intracellulaire tandis que les chaines carbonées se font face entre elles (***Figure 2***, schéma de droite). Les lipides s'organisent de manière asymétrique, sur un feuillet ou l'autre, puisque la phosphatidylcholine et la sphingomyéline font face au milieu extracellulaire alors que la phosphatidylsérine (PS) fait face au cytosol (Verkleij et al. 1973) (***Figure 2***, schéma de gauche). Cette organisation lipidique au sein de la membrane est commune aux cellules mammifères. La position de la PS joue un rôle crucial dans la survie du GR : l'exposition extracellulaire de ce lipide est un signe d'apoptose reconnu par les macrophages. Ce dernier élimine le GR de la circulation par érythrophagocytose (Bretscher 1972).

Le cholestérol est une molécule amphipatique qui accroit la rigidité de la membrane. Le cholestérol s'organise de manière non-homogène à la surface de la membrane. Certains domaines appelés microdomaines ou radeaux lipidiques sont enrichis en cholestérol (avec 3 à 5 fois plus que le reste de la membrane) et constituent des ilots stables et compactes dans les membranes plasmiques de cellules mammifères (Schroeder et al. 1996).

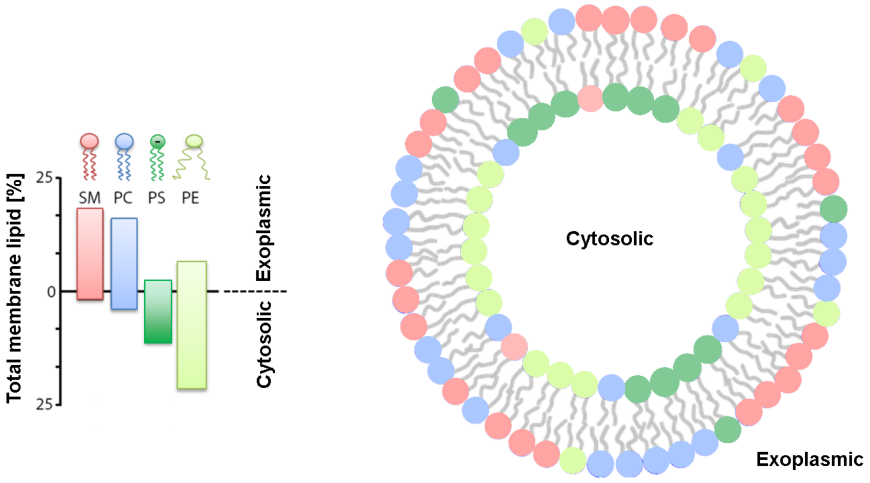


***Figure 2**: Répartition des lipides sur les feuillets interne et externe de la membrane du GR, (Marquardt, Geier, et Pabst 2015)*

Les **protéines** de la membrane érythrocytaire, ont également été identifiées après isolement de stromas (membranes de GRs), séparation par électrophorèse dans un gel de Polyacrylamide-Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE) et coloration du gel au bleu de Coomassie (***Figure 3***). Sept bandes majeures ont été identifiées correspondant à différentes protéines de poids moléculaires apparents distincts (***Tableau 1***) : les spectrines α et β (bande 1 et 2), l'ankyrine (bande 2.1), l'échangeur d'anion, AE1 (bande 3), les protéines 4.1 et 4.2, le transporteur de glucose GLUT1 (bande 4.5), l'actine (bande 5), l'enzyme GlycérAldéhyde-3-Phospho Déshydrogénase (GAPDH) (bande 6) et la stomatine (bande 7.2b) (Fairbanks, Steck, et Wallach 1971).

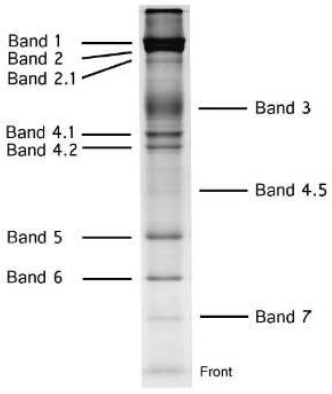


***Figure 3** : Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie après séparation des protéines de la membrane du GR (Aoki 2017)*

Band	Molecular Mass (kDa)	Designation	Function
1	240	spectrin (α chain)	components of cytoskeleton
2	220	spectrin (β chain)	
2.1	210	ankylin	
3	100	band 3 (AE1)	anion transporter
4.1	82	band 4.1	components of cytoskeleton
4.2	76	band 4.2	
4.5	55	band 4.5 (GLUT1)	glucose transporter
5	43	actin	components of cytoskeleton
6	35	glyceraldehyde-3-phoshate dehydrogenase (GAPDH)	glycolytic enzyme
7	31	stomatin	–

***Tableau 1** : Identifications et poids moléculaires apparents (kDa) des protéines de la membrane du GR observées sur gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (figure 3) (Aoki 2017)*

Ces protéines sont soit isolées, soit organisées en complexes multimoléculaires identifiés. Les deux principaux sont le complexe spectrine/ankyrine/bande 3/protéine 4.2 appelé complexe Ankyrine, et le complexe actine/glycophorine C/protéine 4.1/p55 appelé complexe jonctionnel d'actine (***Figure 4***). Ces protéines sont elles-mêmes associées, sur la face cytosolique, à un réseau de protéines constituant le squelette membranaire d'actine et de spectrine (Gratzer 1981).

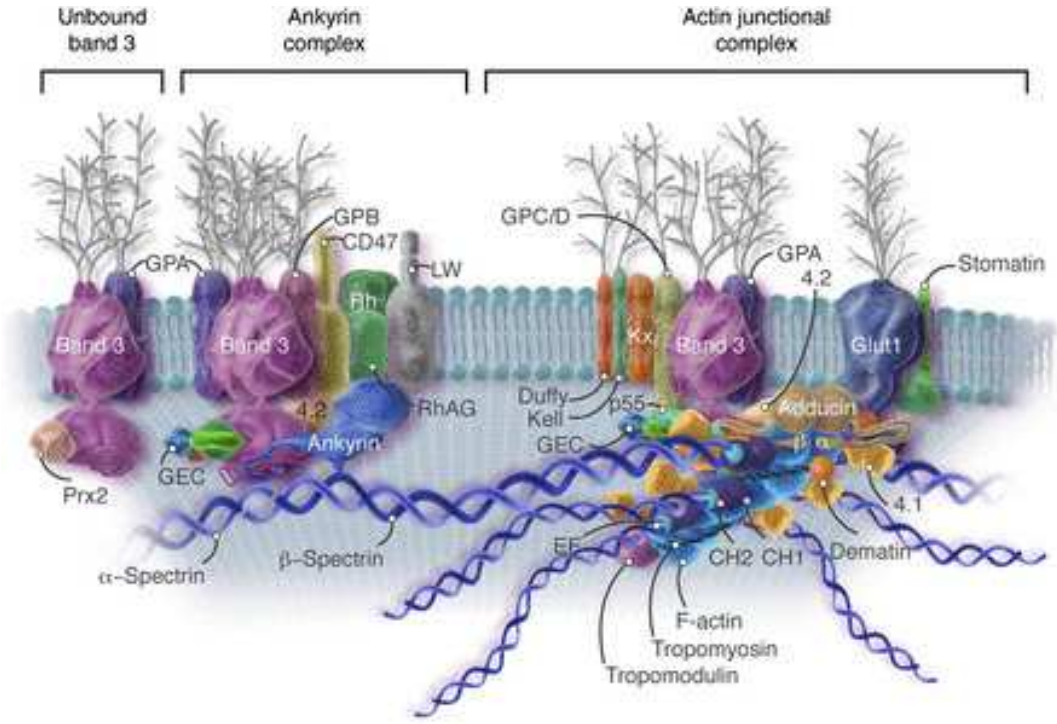


***Figure 4** : Complexes membranaires impliquant les protéines majoritaires du GR (Lux 2016)*

La morphologie du GR est maintenue par 2 types d'interactions entre les protéines au sein des différents complexes membranaires et du cytosquelette (Tse et Lux 1999).

- **Les interactions horizontales** entre les protéines du squelette membranaire comme la spectrine, l'actine et l'adducine ou la protéine 4.1 permettent l'élasticité du GR.
- **Les interactions verticales** entre la spectrine, l'ankyrine, la bande 3 et la protéine 4.2 ou entre la glycophorine C, la protéine p55 et la protéine 4.1 permettent l'ancrage du squelette à la membrane. Ce type d'interaction entre les protéines membranaires comme la bande 3 et la glycophorine A (GPA) permettent l'assemblage des complexes membranaires.

Pathologies érythrocytaires

La conservation de ses interactions est essentielle à l'intégrité et à la stabilité du GR et des défauts pathologiques sont associés à des mutations des protéines impliquées dans ces interactions (Mohandas, Chasis, et Shohet 1983). Ainsi, ces défauts pathologiques sont définis par des anomalies morphologiques du GR qui adoptent des formes caractéristiques de sphérocytes, elliptocytes, ovalocytes ou stomatocytes. Toutes ces pathologies aboutissent au raccourcissement de la durée de vie du GR et sont caractérisées par une hémolyse et ses symptômes sous-jacents (anémie, splénomégalie, jaunisse) (Da Costa et al. 2013).

Parmi ces pathologies, certaines concernent essentiellement des atteintes de la morphologie :

- Les **sphérocytoses héréditaires** aussi connues sous le nom de maladie de Minkowski-Chauffard, sont les plus communes avec une prévalence de 1/2000 personnes atteintes dans les populations caucasiennes d'Europe du Nord. Les HS peuvent être autosomales dominantes (75% des cas) ou non-dominantes (25% des cas) et concernent les protéines impliquées dans les interactions verticales (Perrotta, Gallagher, et Mohandas 2008; S. Eber et Lux 2004). Des GRs de forme sphérique sont alors visibles sur les frottis sanguins de ces patients (***Figure 5* a**). Ils

se caractérisent par une perte de surface, conséquence d'une perte plus ou moins importante de protéines membranaires et une augmentation de la fragilité osmotique. D'un point de vue génétique, les mutations portées par le gène de la spectrine β (*SPTB*) concernent 20% des cas de HS et celles portées par le gène de la spectrine α (*SPTA1*) sont très rares. Elles aboutissent à la diminution significative de l'expression des spectrines visibles en coloration de gel SDS-PAGE au bleu de Coomassie. Les HS peuvent également être associées à des mutations de gènes des protéines associées aux spectrines : la bande 3 (*EPB3*) pour environs 15% des cas, l'ankyrine (*ANK1*) pour 50% des cas (S. W. Eber et al. 1996) ou très rarement la protéine 4.2 (*EPB42*).

- Les **elliptocytoses héréditaires,** autres pathologies très communes du GR, touchent 1/1 000-4 000 personnes et sont caractérisées par des GRs de forme elliptique sur les frottis sanguins (***Figure 5*** **b**), mais la présence d'ovalocytes, stomatocytes, ou cellules fragmentées peut également être observée. Les symptômes sont très hétérogènes, allant de formes asymptomatiques à des anémies sévères dépendantes de transfusions pour les cas de pyropoïkilocytose héréditaire. Les gènes codant pour les protéines impliquées dans les interactions horizontales sont mutés dans cette pathologie incluant : la spectrine α et β (respectivement *SPTA1* et *SPTB*), la protéine 4.1 (*EPB42*) et la glycophorine C (*GYPC*) (Patrick G Gallagher 2004).
- L'**Ovalocytose de l'Asie du Sud-Est** (SAO) ou Ovalocytose héréditaire est une anomalie de membrane des GRs, rare et héréditaire, surtout observées en Malaisie, en Papouasie Nouvelle-Guinée aux Philippines et en Indonésie. Elle est caractérisée par la présence d'érythrocytes de forme ovale (***Figure 5*** **c**). Ce phénotype est lié à une délétion de 9 acides aminés, 400 à 408 à la jonction l'extrémité N-terminale de la bande 3, provoquant un défaut d'interaction entre la bande 3 et l'ankyrine (Tanner et al. 1991). La plupart des cas reportés sont asymptomatiques mais des signes modérés d'hémolyse sont relevés (jaunice intermittente et calculs biliaires). De plus, les GRs présentent une haute résistance à l'infection du parasite *Plasmodium* vecteur du paludisme (Reardon et al. 1993). Mais d'autres études ont démontré que plutôt qu'une protection à l'infection,

cette pathologie protège des atteintes cérébrales du palusdisme chez les enfants en Papouasie Nouvelle Guinée (Allen et al. 1999).

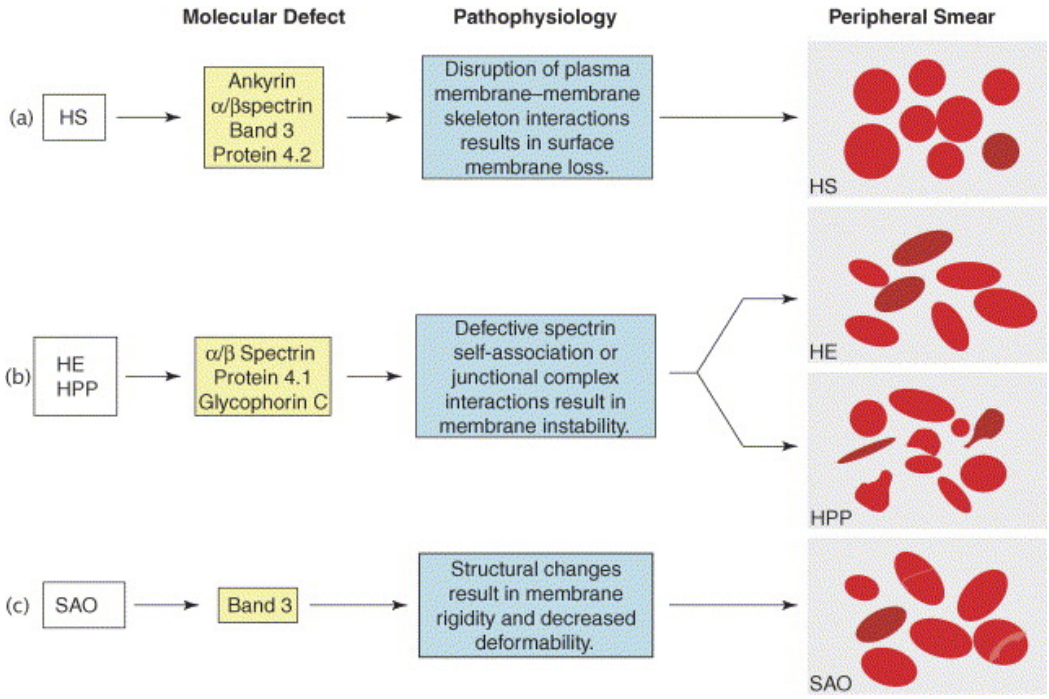


Figure 5 *: Organigramme des pathologies liées à des mutations des protéines membranaires et cytosquelettiques participant à l'architecture du GR : Sphérocytose héréditaire (HS), Elliptocytose héréditaire (HE) pyropoïkilocytose héréditaire (HPP) et Ovalocytose (SAO) avec le défaut moléculaire associé, la pathophysiologie du GR et le schéma des frottis des patients associés.*
Extrait de « Drug Discovery Today: Disease Mechanism » (Liem et Gallagher 2005)

D'autres pathologies, du fait de la présence de mutations dans des protéines qui sont impliquées dans des flux de molécules à travers la bicouche lipidique, concernent des défauts de transports ioniques avec des conséquences sur la morphologie (Caulier et al. 2018; Flatt et Bruce 2018) (***Figure 6***).

- La **CryoHydroCytose** (CHC). Cette pathologie a une prévalence de <1/1 000 000. Le type 1 (CHC 1) est due à une mutation hétérozygote du gène *SLC4A1* codant pour l'AE1 (ou bande 3) (Bruce et al. 2005). Dans ce cas, les patients présentent sur leurs frottis sanguins des stomatocytes et des GRs dits cibles (***Figure 6***) et des symptômes modérés liés à l'hémolyse et une pseudohyperkalémie, conséquence d'une fuite de potassium, particulièrement quand les GRs sont soumis à de basses températures (Bogdanova et al. 2010). Les GRs de patients atteints de SAO sont également caractérisés par une augmentation de la perméabilité de cations

monovalents à basse température, rendant le diagnostic de ces 2 pathologies indiscernable par études électrophysiologiques. Les SAO tout comme les CHC pourraient donc entrer également dans une même catégorie pathologique de stomatocytose héréditaire (Guizouarn et al. 2011). La CHC de type 2 (CHC 2) est due à une mutation hétérozygote portée par le gène *SLC2A1* codant pour le transporteur GLUT1 et aboutit à des défauts de transport de glucose. La stomatine érythrocytaire est également absente de la membrane des GRs de ces patients sans que son gène ne soit muté (Flatt et al. 2011). Les symptômes, en plus de ceux de la CHC 1 sont des atteintes neurologiques sévères (Fricke et al. 2004).

- La **stomatocytose avec hématies hyperhydratées** ou hydrocytose (OHSt). Cette pathologie héréditaire très rare (prévalence de <1/1 000 000) est due à une mutation autosomale dominante sur le gène *RHAG* codant pour la glycoprotéine Rh (transportant l'ammonium), en position Phe65Ser ou en position Ile61Arg (Lock, Smith, et Hardisty 1961; Fricke et al. 2004; Bruce et al. 2009). Une fuite cationique est observée, avec un contenu intracellulaire en sodium 10 fois plus important et un contenu potassique 2 fois moins important par rapport aux GRs d'un donneur sain. Cette fuite a pour conséquence la surhydratation du GR qui est caractérisée par la diminution du CCMH. Les OHSt sont usuellement dépistées en ektacytométrie, technique permettant de mesurer, sur des courbes d'osmocan, l'indice d'élongation (IE) d'une population de GRs dans une solution visqueuse et selon un gradient osmotique. Pour une population de GRs d'un patient atteint de OHSt, la courbe d'osmoscan sera décalée vers la droite par rapport à la courbe d'une population de GRs d'un donneur sain. Enfin, les frottis sanguins des patients présentent des GRs de morphologie stomatocytes (***Figure 6***), et un VGM également augmenté de 30% en moyenne avec une augmentation de la fragilité osmotique. Une étude métabolomique sur quatre patients atteint d'OHSt a établi l'existence d'une suractivation de la voie de glycolyse des GRs (Darghouth et al. 2011). Les symptômes liés à l'hémolyse modérée à sévère, comprennent la jaunice, la splénomégalie et des calculs biliaires. De plus, l'absence à la membrane des GRs matures de la stomatine est également observable sur gel SDS-PAGE

coloré au bleu de Coomassie, sans mutation du gène *EBP72* (Lande, Thiemann, et Mentzer 1982; Fricke et al. 2003).

- La **stomatocytose avec hématies déshydratées** ou xérocytose (XC). Cette anémie hémolytique familiale rare est associée à des mutations sur le gène *FAM38A* codant pour le canal Piezo1 (Zarychanski et al. 2012; Albuisson et al. 2013; Bae et al. 2013) et/ou sur le gène *KCNN4* codant pour le canal Gardos (Raphael Rapetti-Mauss et al. 2015; Andolfo et al. 2015). Le premier canal, Piezo1 est un canal mécanosensible cationique non-sélectif permettant le passage de cations dont le calcium à l'intérieur du GR (Coste et al. 2010). Le second canal, Gardos est un canal potassique calcium-dépendant permettant l'efflux de potassium en présence de calcium. Les mutations sur ces deux canaux sont des mutations gain de fonction (GOF). Pour les XC associées aux mutations GOF de Piezo1, les tests d'activité du canal sur des cellules transfectées avec les mutants ont permis de mettre en évidence un ralentissement de l'ouverture de Piezo1. Alors que les mutations du canal Gardos sont liées soit à une sensibilité accrue au calcium soit à une ouverture prolongée du canal. Les GRs HX sont caractérisés par une diminution du contenu intracellulaire en potassium cause de la déshydratation caractéristique des GRs, l'augmentation du CCMH et un décalage de la courbe d'osmoscan vers la gauche. Les GRs XC présentent donc une diminution de la fragilité osmotique. Sur les frottis sanguins des patients, la présence de GRs dits cibles, de stomatocytes et de poikilocytes est détectable (***Figure 6***) (Picard V. et al., 2019). Pour les patients XC, un traitement ciblant le canal Gardos, le Senicapoc inhibe l'efflux de K^+, prévenant ainsi la déshydratation du GR (Rivera et al. 2017; Raphael Rapetti-Mauss et al. 2016). Cependant, ce traitement n'a pas passé les essais cliniques car il ne diminuait pas les crises vaso-occlusives des patients.

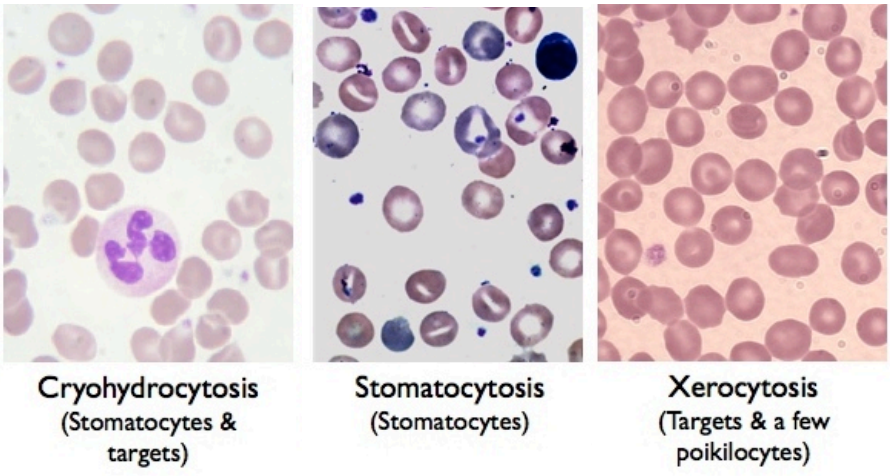


***Figure 6** : Images de microscopie présentant des frottis sanguins de patients présentant des défauts moléculaires sur les transporteurs de la membrane du GR et associé à des pathologies : Cryohydrocytose, Stomatocytose héréditaire à GR hyperhydraté et la Xérocytose héréditaire (Lux 2008)*

Certaines pathologies érythrocytaires, présentent des anomalies morphologiques et fonctionnelles comme conséquence indirecte des mutations génétiques. C'est le cas de la drépanocytose, anémie hémolytique la plus répandue, caractérisée par des GRs en forme de faucille, et dont l'origine génétique est une mutation sur le gène *HBB* codant pour la chaine β de l'hémoglobine (Ingram 1957). Cette mutation est responsable de la formation de grandes fibres de polymères d'hémoglobine qui induisent des agglomérats de la bande 3 entrainant à son tour des défauts d'interaction d'ancrage de la membrane au squelette membranaire (Pawloski, Hess, et Stamler 2005). De plus, une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium est responsable d'une suractivation du canal Ca^{2+} dépendant Gardos à l'origine de l'efflux de potassium et par conséquent d'une déshydratation des GRs (Lew et al. 2005). Le Senicapoc pouvant prévenir l'efflux de K^+ et ainsi la déshydratation des GRs drépanocytaires a également été proposé en thérapie (Ataga et Stocker 2009).

Homéostasie

Le GR est une cellule vivante simple, dépourvue de noyau et d'organite et dont seule la membrane permet des échanges de composés moléculaires et ioniques. Le GR a donc été un très bon modèle afin d'observer la répartition et la perméabilité des ions de part et d'autre de la membrane (Freedman 2001). Dans toutes les cellules, la

composition ionique du cytosol et du milieu est très différente et le maintien d'un déséquilibre ionique est vital pour les cellules.

Chez l'Homme, la concentration en sodium (Na^+) est plus importante dans le plasma que dans le GR ; alors qu'à contrario, la concentration en potassium (K^+) est plus importante dans le GR que dans le plasma. Le chlore (Cl^-) est réparti assez équitablement dans le GR et dans le plasma et enfin la calcium (Ca^{2+}) constitue le plus gros déséquilibre, avec une concentration extracellulaire 1000 fois plus importante dans le plasma que dans le GR (***Tableau 2***). La cellule conserve une charge neutre malgré une répartition déséquilibrée des ions.

	Plasma	**GR**
Na^+	145mM	11mM
K^+	4.5mM	140mM
Cl^-	105mM	80mM
Ca^{2+}	2mM	~0.001mM

***Tableau 2** : Répartitions des principaux ions dans le compartiment intracellulaire du GR humain et dans le plasma*

La capacité d'un ion à traverser passivement la membrane va alors dépendre de son potentiel d'équilibre E_{ion} qui est déterminé par l'équation de Nernst (Prix Nobel de chimie en 1920), ce qui donne les valeurs de l'***Équation 1*** pour les ions principaux présents dans le plasma et le GR :

a) $E_{ion} = \frac{R \times T}{z \times F} \ln \frac{[ion]_{extra}}{[ion]_{intra}}$

b) $E_{Na} = \frac{8{,}31 \times 310}{1 \times 96500} \ln \frac{1{,}45 \times 10^{-1}}{1.1 \times 10^{-2}} = +69mV$

c) $E_K = \frac{8{,}31 \times 310}{1 \times 96500} \ln \frac{4{,}5 \times 10^{-3}}{1{,}4 \times 10^{-1}} = -92mV$

d) $E_{Cl} = \frac{8{,}31 \times 310}{-1 \times 96500} \ln \frac{1{,}05 \times 10^{-1}}{8{,}0 \times 10^{-2}} = -7mV$

e) $E_{Ca} = \frac{8{,}31 \times 310}{2 \times 96500} \ln \frac{2 \times 10^{-3}}{10^{-7}} = +132mV$

où R est la constante des gaz parfaits, T la température en Kelvin, z la valence et F la constante de Faraday.

***Équation 1** : Équation de Nernst et application aux ions répartis entre le plasma et le GR humain*

Plus le potentiel d'équilibre d'un ion donné est proche du potentiel d'équilibre de la membrane, plus cet ion est perméant. L'étude du potentiel d'équilibre de la membrane du GR a alors été longuement abordée par différentes approches théoriques et pratiques (Balach, Casale, et Campetelli 2019). Ainsi au repos, grâce à l'équation de Nernst, on peut déduire le potentiel d'équilibre de la membrane du GR noté Em_{GR} défini par l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (***Équation 2***) :

a) $Em_{GR} = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{P_{Na}\times[Na^+]_{intra} + PK\times[K^+]_{intra} + PCl\times[Cl^-]_{extra}}{P_{Na}\times[Na^+]_{extra} + PK\times[K^+]_{extra} + PCl\times[Cl^-]_{intra}}\right)$

$Em_{GR} = -10$ mV

où R est la constante des gaz parfaits, T la température en Kelvin et F la constante de Faraday.

***Équation 2** : Équation de Goldman-Hodgkin-Katz et application à la membrane du GR humain*

Pour un GR, le potentiel d'équilibre de la membrane au repos est autour de -10 mV. Ces résultats sont cohérents avec les mesures de potentiel membranaire directes par des techniques d'électrophysiologie, lorsque celles-ci ont été réalisées avec une microélectrode montée sur un transducteur piezoélectrique et relié à un amplificateur. Un fois la cellule empalée avec la microélectrode (le terme de patch est apparu des années plus tard), le potentiel membranaire du GR a été mesuré entre -6 et -14 mV (Lassen et Sten-Knudsen 1968). On en déduit que le chlore est l'ion le plus perméant de la membrane du GR.

Il existe d'autre part au sein de la bicouche lipidique des protéines transmembranaires qui vont constituer des pores par lesquels vont circuler des espèces ioniques et permettre à des ions tels que le Na^+, le K^+ ou le Ca^{2+} de passer du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire et inversement.

Pour assurer le maintien ou le changement du potentiel de repos, il existe 2 types de transporteurs d'ions ou canaux.

- Les **transporteurs actifs** tirant directement leur énergie d'activation de l'hydrolyse de l'Adénosine TriPhosphate (ATP), également appelés **pompes** ATPasiques, permettant de maintenir le déséquilibre ionique. On retrouve la

pompe Na^+/K^+ qui permet de maintenir de faible concentration de Na^+ dans la cellule. En effet, elle permet en un même temps, l'entrée dans la cellule de deux ions K^+ contre la sortie de trois ions Na^+. Elle est d'autant plus stimulée quand il y a une fuite ionique. Il a été observé pour les GRs de patients OHSt une suractivation de la voie glycolytique responsable de la production d'ATP. Cependant, cette production ne serait pas suffisante pour alimenter suffisamment la pompe et maintenir une faible concentration de Na^+ intracellulaire (Darghouth et al. 2011). Un autre transport actif majeur est assuré par la pompe à Ca^{2+} permettant de maintenir un faible niveau de Ca^{2+} intracellulaire. En effet cet ion accumulé dans la cellule est toxique car il active des signaux apoptotiques.

- Les **transporteurs passifs** : permettent les échanges à travers la membrane de molécules suivant le gradient électrochimique. On y retrouve les **canaux ioniques** permettant les flux spécifiques ioniques à grande vitesse.

CHAPITRE 2 : LES CANAUX IONIQUES

Structure des canaux ioniques

Les canaux ioniques jouent un rôle dans une multitude de processus cellulaires dont la prolifération, la mort cellulaire, la régulation du volume ou de la balance du contenu sel/eau, la sécrétion d'hormone… On les retrouve en abondance à la membrane des cellules dites excitables, mais également à la membrane de certaines organelles : mitochondries, lysozymes et noyaux.

Les canaux ioniques sont des protéines soit monomériques, soit multimériques qui constituent des pores au sein d'une membrane lipidique au travers desquels circulent à très grande vitesses des ions.

Les mouvements d'ions à travers un canal ionique requièrent une force motrice (FM) qui se définit comme la différence du potentiel de membrane au potentiel d'équilibre de l'ion considéré. On peut alors considérer en suivant la loi d'Ohm, qu'elle est proportionnelle à la résistance membranaire et à la conductance du canal (***Équation 3***).

$$U = RI$$

Équation 3*: loi d'Ohm ou U est la tension en Volts (V), R la résistance en Ohm (Ω) et I le courant en Ampères (A)*

La force motrice nécessaire à un ion pour traverser la membrane au travers d'un canal se définit par la résistance de la membrane qui est constante et la conductance du canal.

Afin de traverser la membrane, les monomères des canaux ioniques sont constitués de plusieurs segments transmembranaires (STM) hydrophobes. La chaine polypeptidique de ces segments d'environ 20 acides aminés s'organisent en hélices α.

Le nombre de monomère, de segments transmembranaires ainsi que les domaines intracellulaires et extracellulaires varient en fonction du type du canal. La structure du canal ionique définit donc trois critères fonctionnels : **la cinétique d'ouverture, la sélectivité et le mode d'activation**.

Cinétique d'ouverture

Un canal ionique a généralement 3 états de conformation selon son activation : ouvert, fermé et désactivé. L'étude de la cinétique d'activation de ces canaux se fait aisément par patch-clamp en configuration cellule-attachée. Cette méthode permet l'enregistrement du courant d'un seul canal dans son environnement natif grâce à une micropipette aspirant la membrane. Cette micropipette remplie d'une solution dans laquelle les ions en solution entrent et sortent, contient une microélectrode qui, reliée à un photomultiplicateur, amplifie le signal en picoampère et le transforme en signal analogique.

Sélectivité

La sélectivité d'un canal ionique est dépendante des acides aminés formant le pore du canal et définit le type d'ion qui chemine par le pore du canal.

Les **canaux potassiques** : Ce sont les canaux les plus répandus et les plus diversifiés. Le nombre de segments transmembranaires (deux, quatre ou six STM), ainsi que l'assemblage des monomères (dimère ou tétramère) est variable d'une famille à l'autre (***Figure 7***). Cependant, dans la ou les boucle(s) intramembranaire(s) de chaque monomère formant le domaine P un motif peptidique Glycine-Tyrosine-Glycine (GTG) est très conservé et forme le filtre de sélectivité du canal.

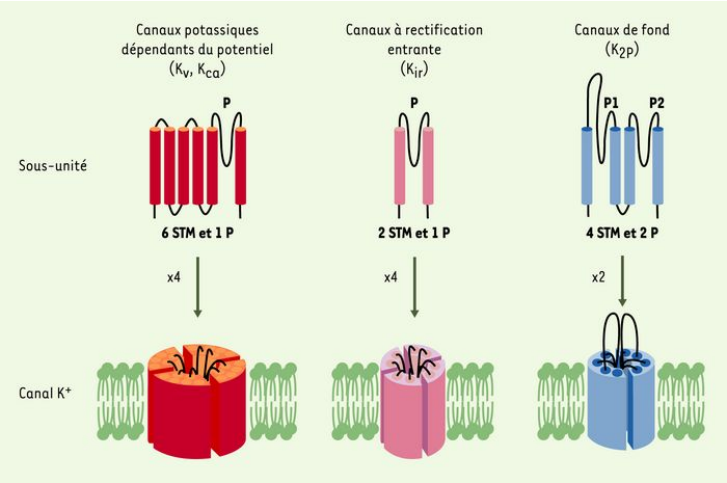


Figure 7 *: Schéma des structures tridimensionnelles des canaux potassiques. Le domaine P signalé par un P. Figure extraite de (Girard et Lesage 2004)*

Les **canaux sodiques** : Parmi eux, on retrouve les canaux dépendants du voltage regroupés dans la famille des Na_v. Ils sont souvent activés quand la cellule est hyperpolarisée et permettent la dépolarisation de la cellule. Ils sont retrouvés en grande abondance dans les cellules du système nerveux et dans les cellules du myocarde. Leur structure tridimensionnelle est très bien conservée avec un monomère formant en une seule chaine polypeptidique 4 domaines. Ces domaines sont constitués chacun de 6 segments transmembranaires. Le pore est formé entre le 5ème et le 6ème STM de chaque domaine par une boucle intramembranaire. Dans cette boucle, on retrouve deux acides aminés chargés négativement, conférant au pore du canal sa sélectivité pour le sodium (Schlief et al. 1996).

Les **canaux calciques** jouent un rôle crucial dans la transduction d'un signal car la concentration intracellulaire en Ca^{2+} est très faible par rapport à la concentration extracellulaire. Le calcium est d'ailleurs considéré comme un neurotransmetteur dans la signalisation du système nerveux. Dans les cellules des muscles lisse et cardiaque, le calcium joue un rôle dans la contraction. Quand la cellule est dépolarisée, un influx du calcium du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire permettra le couplage excitation contraction dans les muscles ou la libération de neurotransmetteur dans les cellules nerveuses (Clapham 2007).

Certains canaux sont dit non-sélectifs et peuvent faire circuler plusieurs types d'ions à la fois : on retrouve les **canaux anioniques** et les **canaux cationiques**.

Parmi les **canaux cationiques** non sélectifs, on retrouve les canaux Transient Receptor Potential (TRP) qui ont la même structure que les canaux potassiques voltage-dépendants (6 STM formant des homo ou hétéro-tétramères) (Venkatachalam et Montell 2007). Ils sont tous cationiques, cependant, selon leur structure, ont une préférence pour le calcium ou le sodium (Owsianik et al. 2006).

Enfin parmi les **canaux anioniques** non-sélectifs, on retrouve un canal anionique de régulation du volume (VRAC) constitué des protéines a, riches en répétition de leucines (LRRC8a) (Z. Qiu et al. 2014). Il fait partie, comme la Pannexine1, des canaux anioniques

à large pore. Ce sont des canaux à 4 STM qui s'oligomérisent en hexamère pour LRRC8a ou en heptamère pour la Pannexine1 (Kasuya et al. 2018; Jin et al. 2020)

Mode d'activation

Enfin, le mode d'activation, lui aussi dépendant de la structure est singulier au canal ionique (***Figure 8***). L'activation du canal va permettre son changement de conformation de fermé à ouvert.

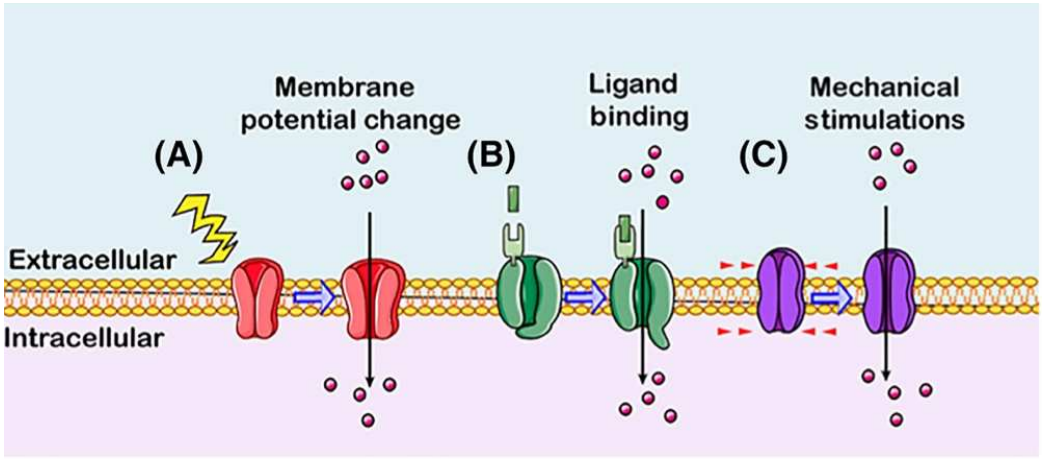


Figure 8 *: Différents types de canaux ioniques par leur mécanisme d'ouverture tiré de Yin S, BJP, 2019*

Parmi les modes d'activation chimiques, on observe des canaux ioniques qui sont :

- **Ligand-dépendants** dont l'activation dépend de la liaison covalente du canal à une autre molécule, soit à l'extérieur de la cellule ou de l'organelle, soit à l'intérieur. L'acetylcholine nicotinique, $GABA_A$, la glycine et le $5\text{-}HT_3$ sont des neurotransmetteurs qui se lient à des canaux ioniques formant la famille des canaux à boucle Cys (Cys loop channel). Leur nom a été donné en raison des 13 acides aminés dans la région N-term extracellulaire flanquée de cystéines (Sine et Engel 2006). Le récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) se lie de manière covalente au NMDA au niveau d'une glycine et d'un glutamate à son interface extracellulaire (Schorge et Colquhoun 2003). Les canaux ioniques sodiques ATP-dépendants (tels que les récepteurs P2X) ou potassique Ca^{2+}-dépendant tels que

le canal KCNN4 s'ouvrent après la liaison intracellulaire du canal à la calmoduline stabilisée par le Ca^{2+} (Xia et al. 1998).

- **pH-dépendants** dont l'activation est réalisée quand le pH extracellulaire diminue. Les canaux ioniques sensibles à l'acidité (Acido Sensing Ionic Channels, ASICs) regroupent une famille dont la structure est homo ou hétéro trimérique, chaque monomère étant constitué de 2 STM reliés par une boucle extracellulaire riche en cystéines. Ils possèdent un domaine de liaison aux protons H^+ permettant leur activation (Krishtal et Pidoplichko 1981).

Parmi les modes d'activation physiques, on observe des canaux ioniques qui sont :

- **Voltage-dépendants** leur ouverture répond à un changement du potentiel membranaire. Selon le voltage imposé à la cellule des flux ioniques spécifiques dans le sens du gradient de concentration se produisent. Ces flux concernent un ion donné selon que son potentiel d'équilibre soit proche de celui du potentiel de membrane. Leur nomenclature est souvent composée comme ci-suit : X_V où X est l'ion sélectifs du canal. Ainsi on distingue les canaux ioniques voltages dépendants Ca_V, K_V et Na_V.
- **Thermo-dépendants** regroupant la famille des Transient Receptor Potential Vanilloidine (TRPV) (Voets, Droogmans, et Wissenbach 2004), ils peuvent donc également être activé par la liaison d'un ligand au canal.
- **Mécanosensibles** dont l'ouverture est provoquée par un stimulus mécanique extérieur tel qu'une tension exercée à la membrane.

CHAPITRE 3 : LA MECANOSENSIBILITE

Notion de mécanosensibilité dans les cellules non-érythroides

Dans des cellules non érythroïdes, tout particulièrement les neurones, les canaux ioniques permettent une réponse cellulaire rapide à une **stimulation mécanique**.

Les stimulations mécaniques peuvent se définir comme toute tension exercée sur la membrane qu'elle soit finement localisée comme la pression négative ou positive exercée à l'aide d'une micropipette ou plus globale telle que le gonflement induit par un milieu hypotonique, la pression d'un flux ou l'étirement de la surface adhérente de la cellule. Des approches méthodologiques ont été développées en utilisant diverses stimulations mécaniques afin d'étudier les canaux mécanosensibles (***Figure 9***).

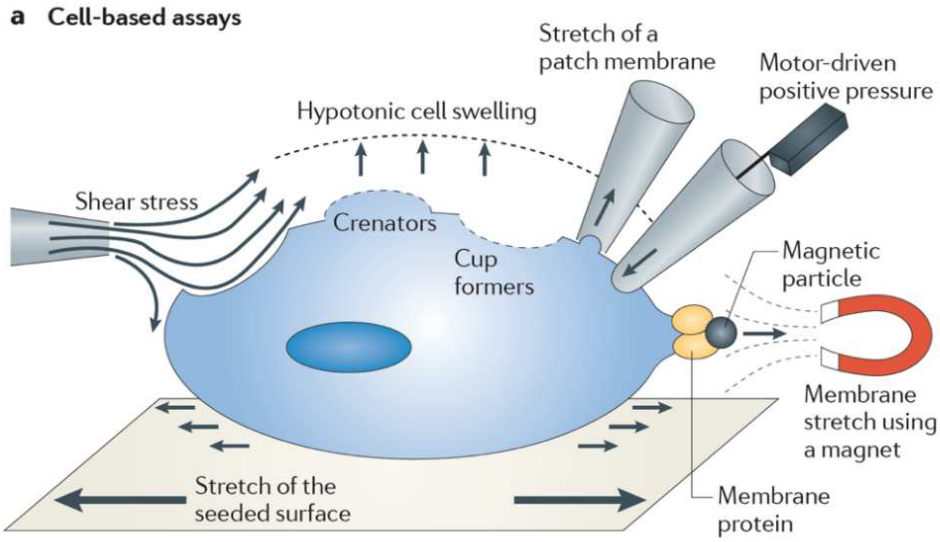


Figure 9 *: Techniques de stimulations mécaniques de la cellule pour la mesure de l'activité d'un canal ionique mécanosensible (Delmas, Hao, et Rodat-Despoix 2011)*

Les canaux ioniques mécanosensibles

Après les premiers enregistrements de flux ioniques engendrés par des changements de potentiel membranaire, les électrophysiologistes ont également enregistré des courants après diverses stimulations mécaniques d'une grande variété de cellules, dans tous les taxons (Arnadottir et Chalfie 2010; B. Martinac 2001). Les

canaux ioniques mécanosensibles ainsi identifiés ont été regroupés à partir de familles diverses (Kefauver, Ward, et Patapoutian 2020) :

- Les canaux mécanosensibles à petite et grande conductance (**M**echano**s**ensitive **c**hannel **L**arge/**S**mall conductance, **Msc-L -S,** : La découverte des canaux ioniques mécanosensibles débute avec des études réalisées chez les procaryotes, où l'équipe de Martinac et al., enregistrait pour la première fois un courant ionique à la suite de la stimulation de la membrane de la bactérie *Escherichia coli*. Ces canaux s'activent en réponse à des chocs osmotiques afin de prévenir la lyse cellulaire (B Martinac et al. 1987).
- Les canaux de la famille **Dég**énérine/ **Deg/ENaC** : sont des canaux ioniques trimériques sélectifs pour le sodium. Ils ont tout d'abord été identifiés dans le vers *Caenorhabditis elegans* où les complexes MEC-4/MEC-10 permettent un flux ionique à travers la bicouche lipidique à la suite d'une stimulation mécanique (Huang et al. 1995). Dans les organismes mammifères les canaux ASICs qui partagent un grand pourcentage de similitudes avec les canaux MEC-4/MEC-10 appartiennent également à cette famille. Cependant leur rôle dans la mécanotransduction est encore questionné.
- Les canaux **TREK-1**, **TREK-2** et **TRAAK** sont des canaux potassiques mécanosensibles à 2 pores (voir structure au chapitre précédent, 0. Sélectivité). Ils peuvent être activés par une variété de stimuli mécaniques mais aussi par la température et divers composés chimiques tels que des lysolipides, des analgésiques et des anti-dépresseurs (Brohawn, Su, et MacKinnon 2014)
- Les canaux Transient Receptor Potential (**TRP)**
- Les canaux **OSCA/TMEM63** constituent une famille de canaux calciques conservés répondant à la stimulation hyperosmolalitique. Ils sont exprimés aussi bien chez les mammifères que chez les plantes (Murthy et al. 2018)
- **Piezo1**, en particulier dans les neurones où l'équipe de Patapoutian A. et al. a enregistré des courants ioniques générés après stimulation des cellules Neuro2A par une seconde micropipette. Après avoir testé près de 70 siRNA sur ces cellules, celui ciblant le gène *Fam38A* a conduit à un enregistrement de flux cationique

significativement diminué dans les cellules transfectées (Coste et al. 2010). Ce gène code pour le canal cationique exprimé ubiquitairement dans les cellules eucaryotes : Piezo1.

Onze années après, Ardem Patapoutian recevait le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine avec Julius en 2021 pour la découverte respectivement des canaux sensibles aux stimuli mécaniques et thermiques.

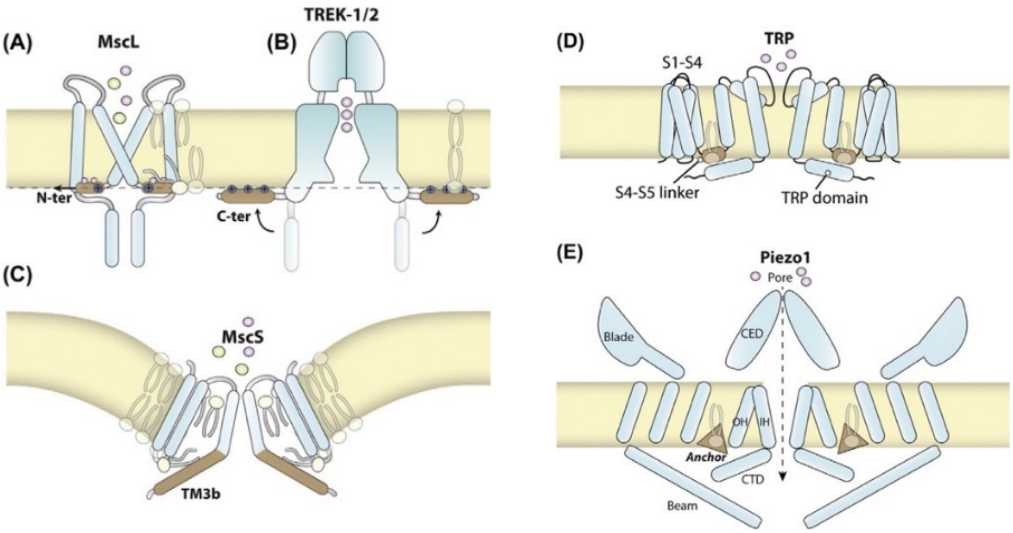


***Figure 10** : Structure/architecture de canaux ioniques mécanosensibles,(Cox, Martinac, et Navis 2017)*

Tous ces canaux mécanosensibles ont des structures très différentes selon l'organisme dans lequel il est présent. Ils sont représentés dans tous les taxons, démontrant la grande adaptabilité de cette catégorie de protéine et donc du système de mécanosensibilité de la cellule. Le point commun de toutes ces protéines est le changement de conformation de ces protéines quand un stimulus mécanique est appliqué à la cellule. Il existe d'autre part deux modèles pour expliquer le mécanisme d'ouverture de ces canaux (Boris Martinac, Adler, et Kung 1990; Arnadottir et Chalfie 2010; Katta, Krieg, et Goodman 2015):

- Le modèle de force appliqué à la **bicouche lipidique** (ou ***force-from-lipids principle***)
- Le modèle de force appliqué aux **protéines du cytosquelette** (ou ***force-from-filaments principle***)

Régulation des canaux ioniques mécanosensibles

La régulation des canaux ioniques peut être dépendante de deux facteurs : la composition de la bicouche membranaire et l'arrangement des protéines du cytosquelette.

Dans les bactéries, l'activité des canaux MscS et MscL dépendrait uniquement de la bicouche lipidique. Les travaux de reconstitution de ces protéines incluses dans des membranes dépourvues d'autres protéines ont permis l'enregistrement de signaux électriques à la suite d'une stimulation mécanique (Boris Martinac, Adler, et Kung 1990). D'autres travaux de reconstitution des canaux ioniques TREK-1 et TRAAK dans des membranes non-natives ont été effectués pour analyser la structure et mesurer les courants à la suite d'une stimulation mécanique (Brohawn, Su, et MacKinnon 2014).

Cependant, ses travaux ont été effectués sur des membranes non-natives et la probabilité d'ouverture des canaux dépourvus de partenaires est plus grande, qu'il y ait ou non un stimulus extérieur (Kung 2005).

Par ailleurs, des canaux ioniques sont souvent régulés par une protéine, cytosolique ou membranaire intégrale. Elle constitue la sous-unité β du complexe du canal, par opposition aux sous-unités α constituées des monomères formant le canal essentiellement pour les canaux voltage-dépendants (Hanlon et Wallace 2002). Le canal en interaction directe avec ses sous-unités, quand il est transfecté dans un organisme hétérologue n'exprimant pas la sous-unité β, le canal ne peut plus être adressé correctement à la membrane. C'est le cas pour la sous-unités β des canaux Ca_V ou K_V (Richards, Butcher, et Dolphin 2004; Hidalgo et Neely 2007).

Les stomatines sont considérées comme l'une de ces sous-unités pour un certain nombre de canaux mécanosensibles. Les stomatines sont regroupées au sein d'une super-famille constituée de 6 protéines : (MEC-2), les stom-like protéines 1, 2 et 3 (SLP-1, SLP-2 et SLP-3), la podocine et la stomatine (***Figure 11*** **A**). Elles présentent de grandes similitudes de structure avec une partie d'ancrage membranaire (hairpin membrane), un domaine stomatine qui va permettre leur oligomérisation, et une région C-terminale intra-cytosolique en interaction avec des canaux ioniques (***Figure***

11 **B**). De plus, les stomatines sont localisées dans les radeaux lipidiques riches en cholestérol et sont en interaction avec les filaments constituant le cytosquelette.

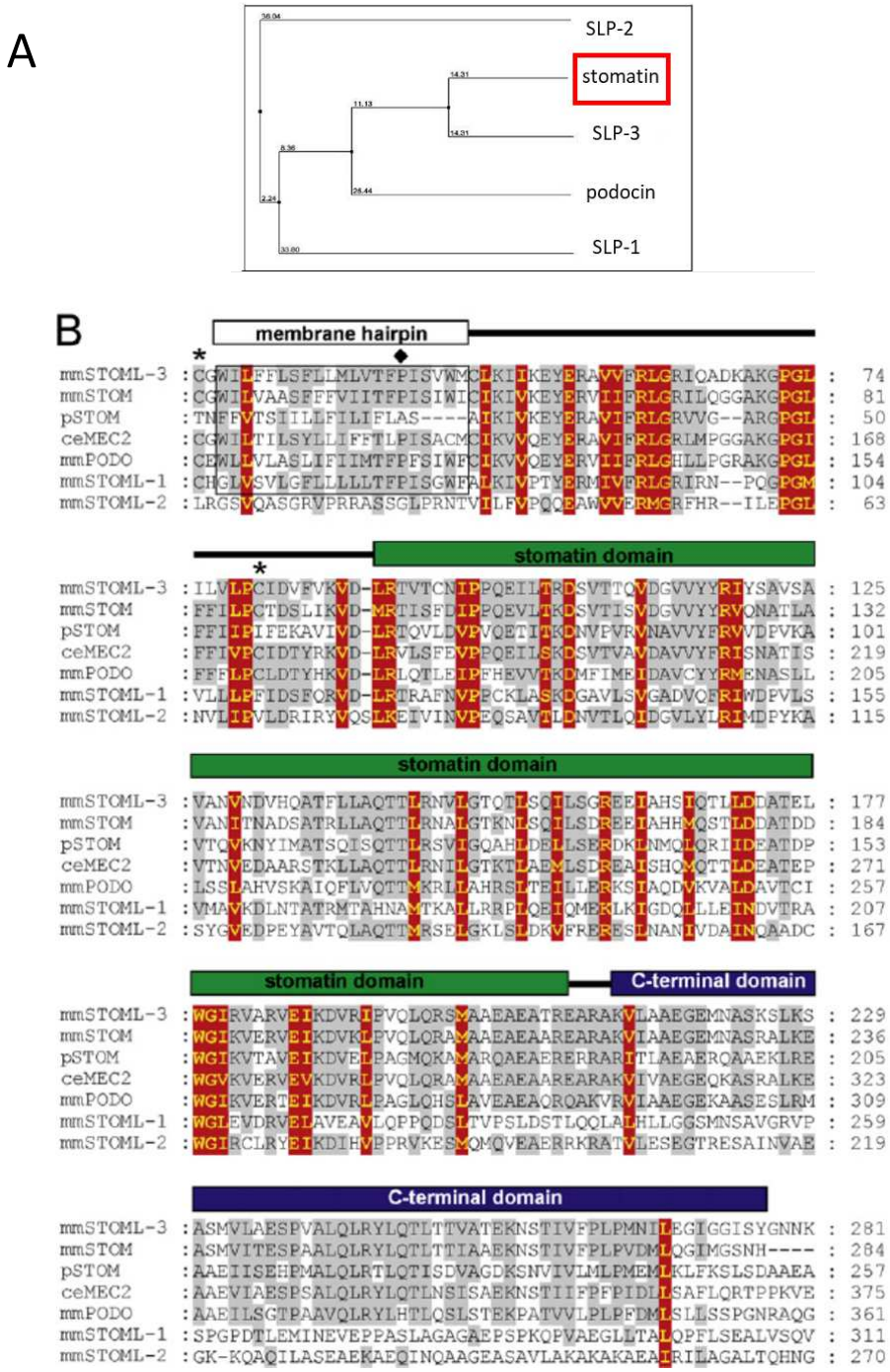


Figure 11 *: Homologie de structure des protéines de la famille des stomatines : stomatine, podocine, stom-like protein 1 (SLP-1), stom-like protein 2 (SLP-2), stom-like protein 3 (SLP-3) et MEC-2. (**A**) Phylogramme des stomatines (**B**) Alignement des séquences d'acides aminés des stomatines et correspondances avec leurs domaines protéiques. Les cystéines (C) marquées par une étoile (*) indiquent le site de palmitoylation et la proline de l'hairpin (P) est indiquée par un losange (♦). Les résidus conservés entre les différentes stomatines sont indiqués en rouge*
(Lapatsina et al. 2012)

- **MEC-2** est une protéine de 375 acides aminés identifiée d'abord chez le vers *Caenorhabditis elegans* et impliquée dans la sensation du toucher (Huang et al. 1995). Dans les ovocytes de Xénope exprimant MEC-2, la transfection de MEC-4/MEC-10 augmente de plus de 40 fois les courants ioniques (Goodman et al. 2002). De plus, les études biochimiques d'immunoprécipitation de MEC-2 ont révélé son interaction avec le canal MEC-4/MEC-10 mais aussi avec MEC-7 et MEC-12 constituant le cytosquelette (Drew et Wood 2005). Enfin, MEC-2 est également retrouvé dans les microdomaines lipidiques (Huber et al. 2006).
- **SLP-3** ou **STOML3** est une protéine de 281 acides aminés exprimée ubiquitairement. Elle est majoritairement présente dans les neurones sensoriels. L'invalidation de l'expression de SLP-3 chez la souris aboutit également à l'absence de réponse électrique dans les fibres neuronales de mécanotransduction. De plus dans les cellules HEK co-transfectées, SLP-3 interagit avec les canaux ASIC2a, ASIC2b et ASIC3 (Wetzel et al. 2007). SLP-3 interagit également avec Piezo1 et Piezo2 (Wetzel et al. 2017). Pour ces travaux, une série de peptides, bloquant divers domaine stomatine et donc l'oligomérisation de SLP-3, provoque l'inhibition de Piezo.
- **Stomatine** est une protéine intégrale ubiquitaire de 281 acides aminés. Elle partage 60% d'homologie de structure avec SLP-3. Ainsi, quand elle a été transfectée avec les canaux ASICs dans les cellules, la stomatine interagit et module l'activité de ces derniers (Price et al. 2004). Dans les cellules de la lignée HEK-293 transfectées, l'extrémité C-terminale de la Pannexine1 recombinante interagit avec la stomatine également recombinante. Cette interaction module les flux ioniques générés par l'activation de la Pannexine1 (Zhan et al. 2012).

CHAPITRE 4 : ACTEURS DE LA MECANOSENSIBILITE DANS LE GR

1. Deux canaux ioniques mécanosensibles du GR

Dans le GR, des canaux ioniques avec des voies d'activation mécaniques ont récemment été décrits. C'est en particulier le cas de Piezo1 (Cahalan et al. 2015) et de la Pannexine1 (Bao, Locovei, et Dahl 2004).

- **Piezo1**

  Piezo1 ou FAM38A est codé par le gène *PIEZO1* porté par le chromosome 16q24.3. A la différence de Piezo2 qui est exprimé exclusivement dans les cellules neuronales, Piezo1 est exprimé dans la majeure partie des cellules mécanosensibles de mammifères, fortement dans les tissus pulmonaires, de la peau et de la vessie chez l'Homme (Coste et al. 2010). Piezo1 est également exprimé dans de nombreux taxons dont les plantes, les protozoaires et les invertébrés.

  Avec 38 segments transmembranaires (STM), cette protéine de 380kDa a une structure homotrimérique unique et complexe (***Figure 12*** **B**) révélée d'abord par cristallographie aux rayons X (Ge et al. 2015), puis en Cryo-EM (Saotome et al. 2018). A partir de l'extrémité C-terminale (CTD), la chaine polypeptidique forme deux premiers STM. La boucle extracellulaire entre ces deux STM forme le bouchon (cap) à l'entrée du pore de Piezo1. Un domaine formant l'ancre (anchor) est déterminant pour le mécanisme d'ouverture du pore, puisqu'il joue le rôle de levier entre le pore et l'hélice du canal. Les STM suivants sont regroupés par quatre, chacun de ses regroupements appelé répétition forment les bras ou hélice traversant la membrane plasmique. Entre les répétitions B et C une longue boucle intracellulaire forme le bouchon (Clasp) puis la poutre (beam) et enfin le loquet (latch) (***Figure 12*** **A**).

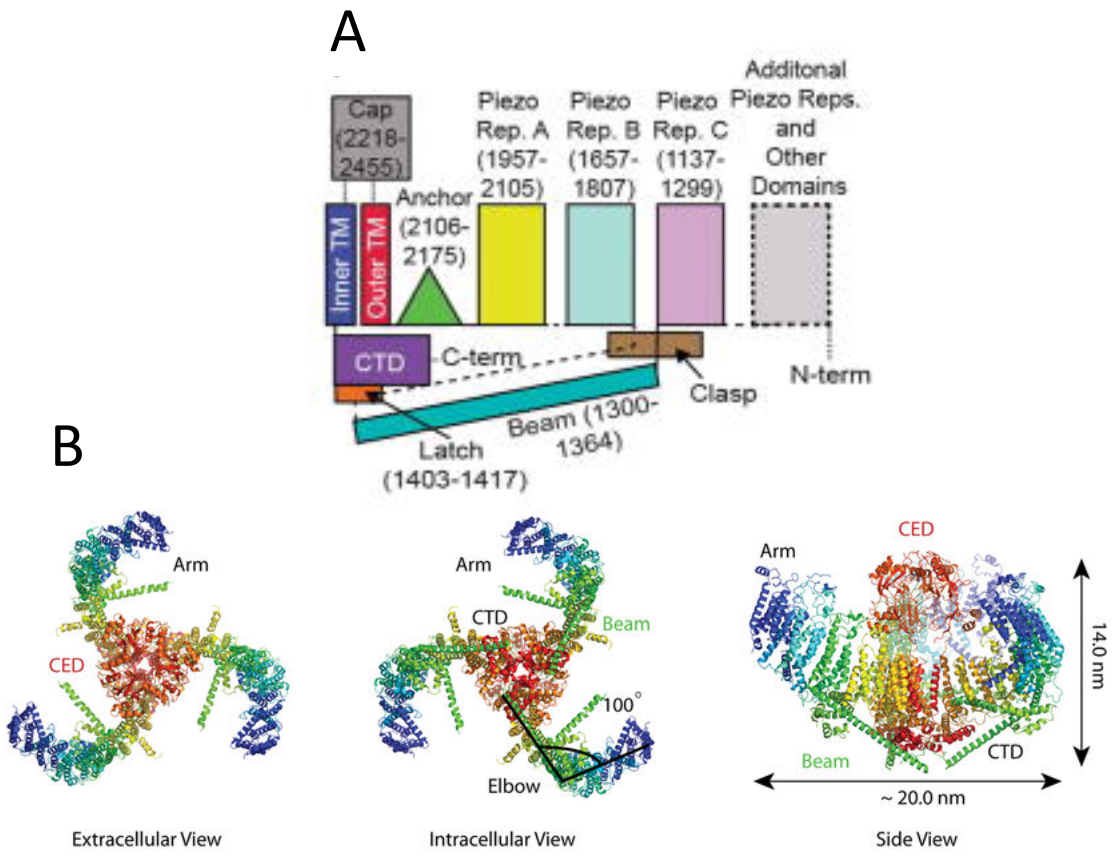


***Figure 12** : Schématisation de Piezo1 (**A**) structure d'un monomère de Piezo1(Saotome et al. 2018) (**B**) structure de l'homotrimère de Piezo1 vue perpendiculaire à la membrane et vue transversale à la membrane (Lin et al. 2019)*

Les monomères de Piezo1 forment à la membrane un grand canal de diamètre de 20 nm faisant passer les cations monovalents (Na^+ et K^+) et divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) ; il est donc cationique non-sélectif (Gnanasambandam et al. 2015).

Piezo1 a une unité de conductance de 25 pSi (Coste et al. 2010).

Dans les cellules transfectées HEK-293T, le canal Piezo1 recombinant génère des courants ioniques transitoires par pression négative en configuration « cellule-attachée » avec un maximum de courant observé à -60mmHg. En configuration « cellule-entière », l'activation par la pression locale d'une seconde micropipette génère des courants ioniques avec un maximum d'avancement de la micropipette à 5 µm (Coste et al. 2010). Piezo1 a la particularité de s'inactiver très rapidement même si le stimuli mécanique est continu, et donc les flux ioniques sont très transitoires en mesure électrophysiologique de « canal unique ». Cette constante d'inactivation peut être

mesurée en faisant une régression de Boltzmann pour la courbe de courant en fonction de la pression. La pente de cette courbe est définie comme étant la constante d'inactivation (Bae et al. 2013).

L'activité de Piezo1 peut être également suivie en microscopie par imagerie calcique, en chargeant préalablement les cellules avec des sondes calciques fluorescentes telles que Fluo4-AM ou Fura-2 (Cahalan et al. 2015)(Danielczok et al. 2017).

Piezo1 peut être aussi activé par des agonistes chimiques : Yoda1 (***Figure 13*** **A**) et Jedi2. Yoda1 interagit de manière spécifique avec Piezo1 en s'insérant entre la première répétition A et le bras (Arm) du canal (***Figure 13*** **B**). Dans les cellules HEK-293 transfectées, les courants ioniques générés par l'activation de Piezo1 par Yoda1 ne sont plus transitoires et la désactivation du canal s'effectue par une série de lavages (Botello-Smith et al. 2019).

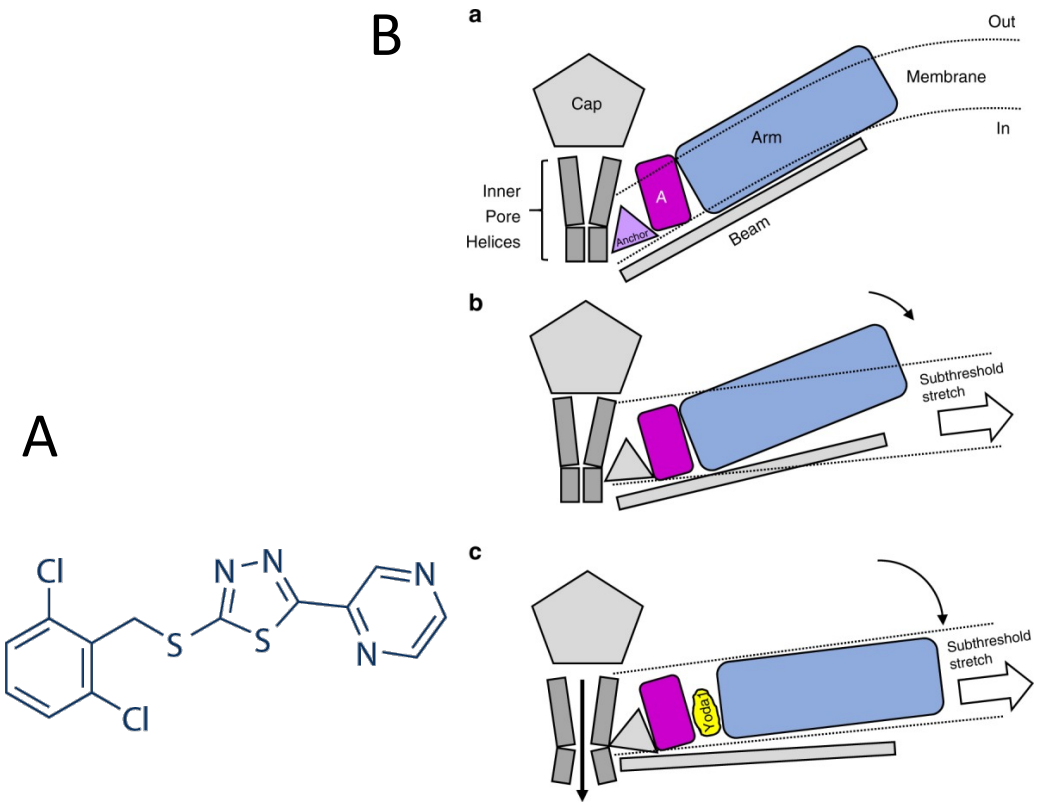


Figure 13 *: Activation de Piezo1 par son agoniste, Yoda1 (**A**) structure moléculaire de Yoda1. (**B**) Mécanisme d'insertion de Yoda1 entre la première répétition (A) et le bras (Arm) de Piezo1 permettant la courbure de la membrane et l'ouverture du pore (Botello-Smith et al, 2019)*

Les courants générés par Piezo1 stimulé peuvent être annulés par des inhibiteurs non-spécifiques de canaux ioniques : le Gadolinium et le rouge de Ruthenium qui interagissent avec les canaux cationiques mécanosensibles (Coste et al. 2010). De plus, Piezo1 est également inhibé de façon non-spécifique par la mégatoxine extraite du venin de tarentule : GsMTx-4. Ce peptide s'insère dans la membrane plasmique et aurait des interactions également avec le canal (Bae, Sachs, et Gottlieb 2011).

Le mécanisme de régulation de l'ouverture de Piezo1 est encore sujet à débat. Il dépendrait :

- De la composition de la bicouche lipidique (force appliquée à la membrane)
- Des tensions appliquées au cytosquelette (force appliquée aux filaments)

Dans le GR, l'activation de Piezo1 conduisant à l'ouverture du canal crée un influx important de calcium, activant le canal calcium-dépendant Gardos, également appelé SK4, sélectif du potassium. Il est défini comme étant le médiateur de la déshydratation du GR (Raphaël Rapetti-Mauss et al. 2017). A la suite de son activation, le canal Gardos crée une forte hyperpolarisation de la membrane du GR par un relargage du potassium intracellulaire. La sortie passive de chlore afin de rééquilibrer le potentiel électrique accompagne la sortie de potassium. Enfin, pour compenser la perte de KCl, la cellule relargue de l'eau, l'amenant à la déshydratation.

Des mutations gain de fonction (GOF) ont été décrites comme étant associées à une pathologie héréditaire érythrocytaire : la xérocytose (Zarychanski et al. 2012) caractérisée par la déshydratation du GR. D'autre part, des mutations perte de fonction (LOF) sont associées à une autre pathologie non-érythrocytaire, la dysplasie lymphatique généralisée. Par ailleurs, les GRs de ses patients sont caractérisés par une hyperhydratation (Fotiou et al. 2015).

Un autre canal exprimé dans le GR et activable par stimulation mécanique est la Pannexine1

- **Pannexine1 (PANX1)**

Cette protéine est codée par le gène *PANX1* porté par le chromosome 11q21 (Panchina et al. 2000). Elle appartient à la famille des connexines. Dans les cellules nuclées et notamment les cellules endothéliales, la PANX1 est impliquée comme toutes les connexines dans la communication intercellulaire. Les canaux de cellules adjacentes s'assemblent afin de former des jonctions intercellulaires.

Dans le GRs, cette protéine de 45 kDa avec 4 domaines transmembranaires assure une fonction de canal, la N-glycosylation empêchant l'assemblage en jonction intercellulaire (Boassa et al. 2008) (**Figure *14* A**).

La PANX1 forme à la membrane des cellules un canal homoheptamérique dont la structure a été révélée récemment par Cryo-EM (Deng et al. 2020; Jin et al. 2020; Michalski et al. 2020; Qu et al. 2020) (***Figure 14* B**). Cette structure comporte une entrée de 11Å de diamètre dont la sélectivité, préférentiellement anionique est déterminée par un tryptophane en position 74 (Deng et al. 2020).

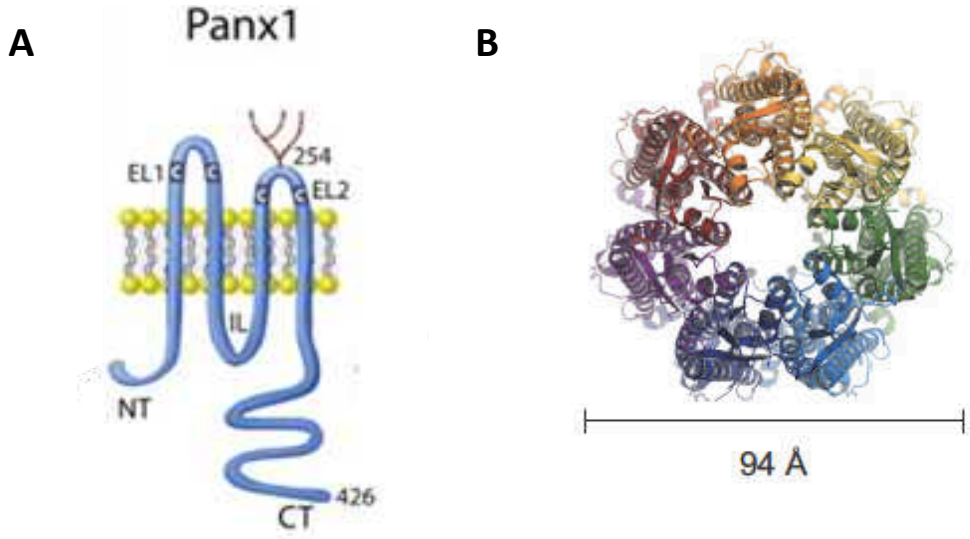


***Figure 14** : Schémas de la structure du canal Panx1. (**A**) Structure tridimensionnelle d'un monomère (Penuela, Gehi, et Laird 2013) (**B**) Assemblage des sept monomères afin de former le canal (Michalski et al. 2020)*

De plus, cet acide aminé est crucial dans l'interaction de la Pannexine1 avec l'inhibiteur Carbenoxolone (CBX) qui bloque l'entrée du canal et donc le passage d'ions (Ruan et al.

2020). Les études de Cryo-EM ont décrit le pore avec un diamètre plus étroit de 9Å, quand son ouverture était provoquée après clivage de l'extrémité C-terminale. Pour ce mécanisme d'ouverture, et pour la stimulation par la dépolarisation de la membrane, la conductance du canal ne serait que de quelques dizaines de pS, permettant le passage de chlore. Cependant, après stimulation avec une concentration forte en potassium dans le milieu extracellulaire ou hypotonique ou en augmentant la concentration intracellulaire de calcium, ils s'avèrent que la PANX1, avec une conductance de plusieurs centaines de pS, laisserait passer des composés de taille plus importante allant jusqu'à 1kDa (F. Qiu et al. 2011).

L'extrémité C-terminale est déterminante pour l'activation irréversible de PANX1. Elle comprend un site de clivage (DIID) des caspases 3/7 conduisant, au cours de l'apoptose de la cellule, à des sous-unités de la Pannexine1 tronquées et constitutivement actives (Sandilos et al. 2012).

L'extrémité N-terminale pourrait constituer le site d'interaction d'un autre inhibiteur de PANX1 : la probénicide (PBC). De plus, ce domaine interagirait avec des lipides dans le pore et contribuerait au passage des substrats (Kuzuya et al. 2022).

Enfin, la Pannexine1 est démontrée comme active dans les GRs humains, murins, et de *Xenopus*. Son activité, sensible à la CBX y a été explorée par trois techniques différentes : l'électrophysiologie, la bioluminescence et la perméabilité à des sondes fluorescentes. Dans le GR humain, PANX1 a pour rôle le relargage d'ATP impliqué dans la signalisation des récepteurs purinergiques qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la vasodilatation des vaisseaux sanguins (González-Alonso, Olsen, et Saltin 2002).

2. Stomatine érythrocytaire

La stomatine ou bande 7.2b est une protéine codée par le gène *EBP72* localisé sur le chromosome 9q33.2 (Hiebl-Dirschmied et al. 1991). La stomatine, ubiquitaire est fortement exprimée à la membrane de GRs sains, estimé entre 200 000 et 400 000 copies/GR. En revanche, elle est absente de la membrane de patients atteints de

Stomatocytose héréditaire à hématies hyperhydratées (OHSt) sans pour autant qu'il n'y ait de mutation sur son gène (Lande, Thiemann, et Mentzer 1982).

La chaine polypeptidique de la stomatine est constituée de 288 résidus d'acides aminés, lui conférent un poids moléculaire apparent de 31.7kDa. La stomatine est une protéine membranaire avec chacune de ses extrémités C-terminale et N-terminale cytosoliques et une région hydrophobe intramembranaire (***Figure 15***). Les études de mutagenèse sur les différentes régions et sur les différents acides aminés de la stomatine ont permis d'attribuer une fonction à chacune de ses régions (Rungaldier et al. 2017). La stomatine est une protéine intégrale qui s'ancre dans la membrane grâce à la proline en position 47 dans la région intramembranaire. De plus, les palmitoylations des cystéines 29 et 86 améliorent l'ancrage de cette protéine (Snyers, Umlauf, et Prohaska 1999). Plusieurs sites de phosphorylation ont également été identifiés sur la stomatine (U. Salzer, Ahorn, et Prohaska 1993).

Par ailleurs, la stomatine comporte en amont du domaine stomatine, un domaine consensus d'acide aminés de reconnaissance/interaction avec le cholestérol (Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus, CRAC) et en aval un domaine de super hélice (Coiled-Coil, CC) ainsi qu'un domaine d'oligomérisation et d'association aux radeaux lipidiques (Oligomerization and lipid Rafts-Association, ORA) (Rungaldier et al. 2017).

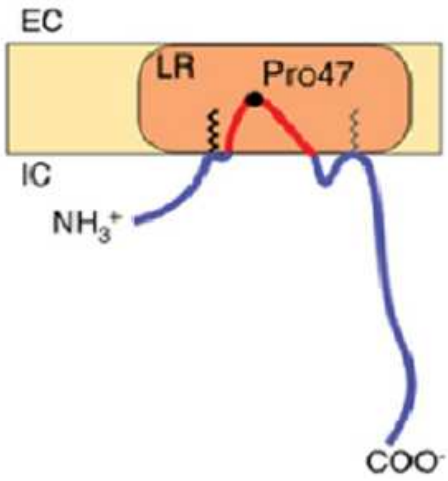


Figure 15 *: Schéma de la structure de la stomatine érythrocytaire ou bande 7.2b (Kadurin, Huber, et Gründer 2009)*

Les études d'interaction avec détergent après réticulation (cross-link) par des agents lui ont attribué plusieurs partenaires protéiques tels que l'aquaporine, Glut-1, l'AE1 (Rungaldier et al. 2013).

Cependant, jusqu'à présent, seules deux interactions ont été confirmées, grâce à des GRs déficients en stomatine provenant de patients présentant la pathologie de membrane OHSt**.** Pour ce phénotype, il a également été démontré une modification/altération de l'activité de :

- Transporteur de glucose Glut-1 : Glut1 est un transporteur permettant l'entrée d'acide déshydroascorbique, qui sera réduit dans le GR en acide ascorbique, également appelé vitamine C. Glut-1 favorise le transport d'acide déshydroascorbique par rapport au glucose sauf en absence de stomatine. Pour les GRs de 2 patients OHSt en effet, le transport de glucose par Glut-1 est favorisé au détriment de l'acide déshydroascorbique (Montel-Hagen et al. 2008).
- Échangeur anionique AE1 : également appelé Band3, ce co-transporteur facilite les échanges de chlore, Cl^- et de bicarbonate HCO_3^- à travers la membrane plasmique. En absence de stomatine, ou quand elle est fortement réduite dans les GRs de 4 patients OHSt et d'un patient CHC II, ces échanges sont considérablement réduits (Genetet et al. 2017a)

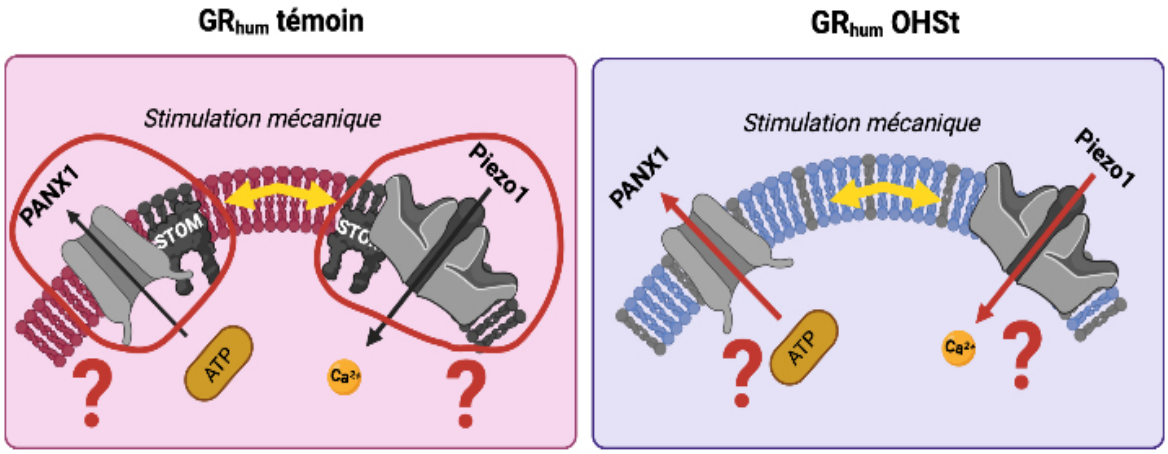
Y a-t-il, dans le globule rouge, une régulation de deux canaux ioniques mécanosensibles, Pannexine 1 et Piezo 1, par la stomatine ?

Afin de répondre à notre questionnement, cette thèse est présentée en 2 axes principaux :

- Axe I : L'activité mécanosensible de la Pannexine1 est-elle modulée par la stomatine dans le globule rouge humain ?
- Axe II : Modification de l'activité mécanosensible de Piezo1 impliquant une interaction du canal avec la stomatine

Pour cela, nous avons eu accès à des prélèvements sanguins de 3 patients atteints de stomatocytose héréditaire à hématie hyperhydratée (OHSt) déficient en stomatine. Ces échantillons collectés en 2016 de même que ceux de témoins sains ont été congelés et conservés par le Centre National de Référence des Groupes Sanguins.

Parallèlement, nous avons utilisé les cellules de la lignée érythroleucémique K-562, pour laquelle nous avons vérifié l'expression endogène de la Stomatine et de la Pannexine-1, Piezo1 n'étant exprimé.



Les objectifs de la thèse sont de :

- Montrer l'interaction de la stomatine et de la Pannexine1 dans les GRs témoins
- Mesurer l'activité de la Pannexine1 (le relargage d'ATP et l'influx de fluorophore ionique) dans les GRs et des cellules K-562 wild type (stom +) et invalidées pour l'expression de la stomatine (stom –)
- Montrer l'interaction de la stomatine et de Piezo1 dans les GRs témoins et les cellules K-562 exprimant Piezo1 recombinant
- Mesurer l'activité de Piezo1 (influx de calcium et mesure de courants ioniques) dans les GRs et les cellules K-562 stom + et stom-

PATIENTS ET METHODES

1. MODELES CELLULAIRES

Patients

Le sang total de 3 patients atteints de stomatocytose héréditaire à globules rouges hyperhydratés (ou OverHydrated Stomatocytosis, OHSt) a été prélevé en tube d'EthylèneDiamine TétraAcétique (EDTA). En parallèle, des échantillons de sang frais de 3 donneurs sains du Centre National de Référence des Groupes Sanguins (CNRGS), ont également été prélevés le même jour que pour chacun des 3 patients, pour permettre leur utilisation dans des tests d'ektacytométrie. Après 3 lavages dans du NaCl 0.9%, le sang des patients et des témoins sains a été congelé volume à volume dans une solution de glycérol à 40% sous forme de paillettes et conservé dans de l'azote liquide (-156°C) par le CNRGS.

Au maximum 24 heures avant les expérimentations, les échantillons de sang ont été décongelés et lavés dans successivement une solution à 10% de glycérol, une solution à 1% de sorbitol, puis trois fois dans du NaCl 0,9% par centrifugation (1000 g, 5 minutes à 4°C). Les échantillons sont ainsi maintenus jusqu'à utilisation à 4°C dans du CellStab (Bio-Rad), solution de conservation des globules rouges (GRs).

Osmoscan

200 µL de sang frais ont été resuspendus dans 5mL d'une solution visco-aqueuse de polyvinylpyrrolidone (PVP) et soumis à un stress mécanique de 30 Pa, changeant la forme du globule rouge (GR) de circulaire à elliptique, comme précédemment décrit (Clark, Mohandas, et Shohet 1983). La déformation des GRs a été suivie en continu en fonction de l'osmolarité du milieu. L'index de déformabilité (ID) et l'index d'élongation (IE) des cellules a été déterminé pendant un gradient osmotique entre 100 et 550 mOsm/kg et à une température constante de 37°C.

Des points particuliers (***Figure 16***) ont été extraits des courbes d'ektacytométrie des GRs témoins et OHSt :

- O_{min} correspond à l'osmolalité à laquelle 50% des GRs hémolysent, reflétant le ratio aire/volume du GR
- EI_{max} correspond à la valeur maximale d'ID reflétant la résistance de la membrane
- O_{hyper} correspond à la valeur d'osmolalité maximale pour laquelle 50% des GRs sont hémolysés, reflétant l'état d'hydratation du GR.

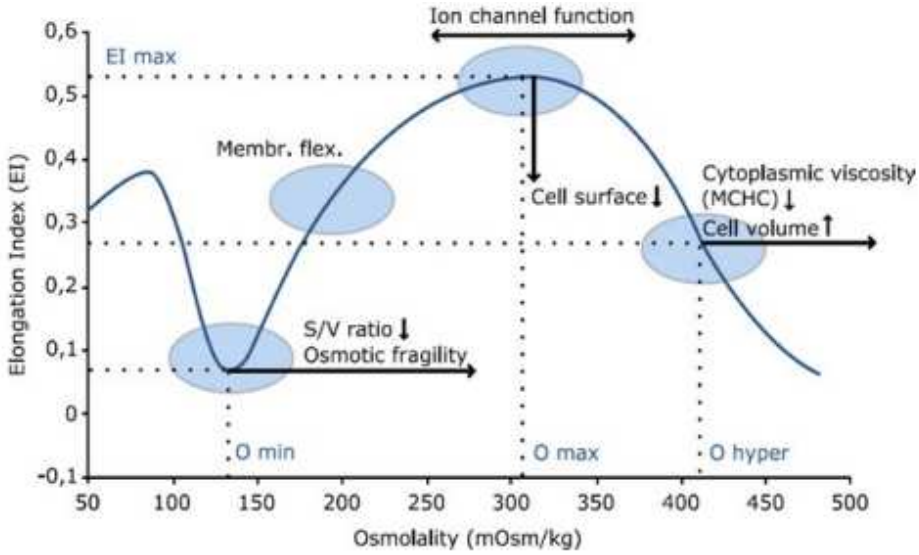


Figure 16 : *Courbe d'Osmoscan en ektacytométrie de l'indice d'élongation en fonction de l'osmolalité sur une population de GRs et relevance des points caractéristiques. D'après RR Mechatronic.*

Réjuvénation

Les GRs après décongélation, ont été réjuvénés par une solution de jouvence, le réjuvésol, permettant la restauration de métabolites intracellulaires tels que l'Adénosine TriPhosphate (ATP) ou le 2,3-Diphosphoglycérate (DPG) à des concentrations similaires à celle de GR frais (Meyer et al. 2011). De plus, la réjuvénation permet la restauration, à des niveaux proches de ceux observés pour des GRs frais, des espèces ioniques intracellulaires modifiés lors du stockage (voir annexe page 157). Les tests fonctionnels de mesure d'ATP relargué et d'influx de Ca^{2+} et de Na^{+} ont été réalisés dans ces conditions.

Avant les tests d'activité des canaux ioniques mécanosensibles, 100 µL de culot de GRs ont été lavés par centrifugation (450 g pendant 5 minutes à 10°C) dans un volume de 10 mL de PBS, puis resuspendus dans 3 volumes de PBS-glucose 5mM. Après ajout

de 80 µL de Réjuvésol (Zimmer, voir Annexe) à la suspension globulaire, les GRs sont agités pendant 1 heure à 37°C. Les GRs ont été lavés deux fois par centrifugation dans le tampon utilisé pour les tests d'activité.

Préparation des stromas

Les GRs sont lavés par centrifugation (1000 g, 5 minutes à 10°C) trois fois en tampon Phosphate Buffer Saline (PBS), puis le culot globulaire est soumis à une lyse hypotonique pendant 20 minutes à 4°C dans 40 volumes de tampon 5 mM Sodium Phosphate, 1 mM EDTA, pH8 (5P8). Le lysat obtenu est lavé également dans 40 volumes de tampon 5P8 par centrifugations de 20 minutes à 27 000 g à 4°C sans frein de décélération jusqu'à la disparition de l'hémoglobine. Le culot de stromas est utilisé immédiatement pour la cytométrie en flux et le proximity ligation assay ou conservé à -80°C pour les autres expérimentations.

Culture cellulaire

Les cellules de la lignée érythroleucémique K-562 de l'American Type Culture Collection (ATCC) proviennent d'une patiente ayant développé une Leucémie Myéloïde Chronique Philadelphia positive (Lozzio et Lozzio 1975).

Les cellules sont cultivées entre $2x10^5$ et $1.6x10^6$ cellules par ml en milieu Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) GlutaMAX™ (Gibco), 10% Sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Dutscher), 1X penicilline/streptomycine/amphotericine (Invitrogen). Les cellules sont maintenues en culture dans des flasques 25 ou 75cm^2 à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2 durant moins de 20 passages.

Transfection de plasmides CRISPR-Cas9 et HDR

Un mélange de 3 plasmides CRISPR/Cas9 (Cluster Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats) d'invalidation génique de la stomatine contenant des séquences qui codent, sous contrôle du promoteur U6, pour des ARNs (acides ribonucléotidiques)

guides ciblant le gène de la stomatine était disponible dans le commerce (Santa Cruz Biotechnology). Après transformation de bactéries compétentes XL10 Gold (Invitrogen) par ces plasmides et amplification de plusieurs clones indépendants suivie de l'extraction de l'ADN plasmidique (Thermo Fischer), étapes réalisées au laboratoire, le séquençage (GATC Eurofins) à l'aide d'une amorce correspondant à la séquence U6 a permis l'identification de trois ARN guides dont les séquences sont : Guide 1 : GGCCGAGAAGCGGC CACAC ; Guide 2 : GCCACCAAAATCCA CCGCA ; Guide 3 : GCGACCCAATCTAAAGATGA. Un plasmide CRISPR/Cas9 contrôle codant également pour la nucléase cas9 mais qui contient une séquence guide non spécifique de 20 nucléotides (Santa Cruz Biotechnology) est utilisé en tant que contrôle négatif pour l'invalidation de la stomatine. Les plasmides CRISPR/Cas9 contiennent également un gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) utilisée pour la détection directe en cytométrie en flux des cellules transfectées. L'expression de ce gène GFP est sous contrôle du même promoteur (CBh : Chicken Beta-actin hybride) que le gène codant pour la Cas9 ribonucléase qui est entouré par des séquences signal de localisation nucléaire (NLS) (***Figure 17***, plasmide de gauche).

Un mélange de plasmides HDR (Homology-Directed Repair) spécifique du gène ciblé, ici la stomatine, est également fourni par Santa Cruz Biotechnology (***Figure 17***, plasmide de droite). Ces plasmides contiennent une matrice de réparation homologue dirigée qui est constituée de deux bras de 800pb élaborés pour se lier spécifiquement à l'ADN génomique englobant le site de coupure de l'ADN double brin induit par Cas9. Cela permet, grâce à la co-transfection avec les plasmides CRISPR/Cas9 KO correspondants, l'introduction d'un gène de résistance à la puromycine entre ces sites de coupure ainsi générés (***Figure 17***). Ces plasmides HDR contiennent aussi entre les deux bras de recombinaison un gène codant pour la Red Fluorescence Protein (RFP) pour confirmer, par cytométrie en flux, d'une part l'efficacité de la transfection 24 heures après la transfection, puis d'autre part pour repérer, après stabilisation (résistance à la puromycine) et clonage, des clones de cellules dont l'ADN génomique a été remanié, donc potentiellement invalidées pour l'expression de la stomatine.

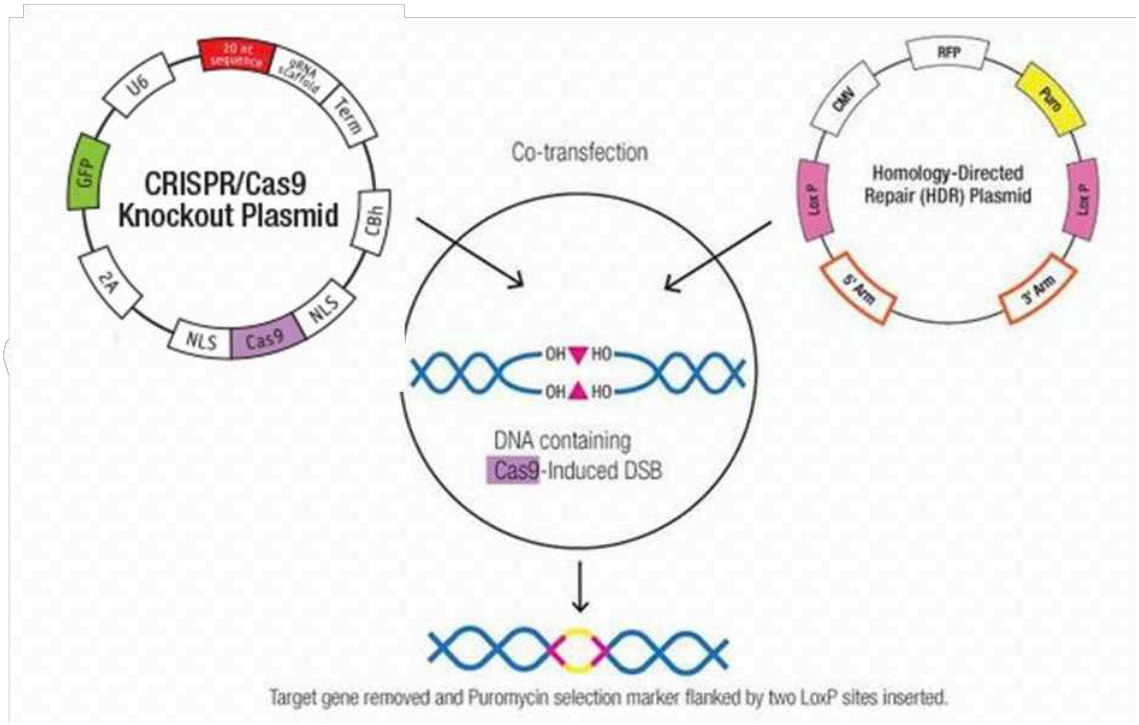


***Figure 17** : Schéma illustrant la mécanistique d'insertion du plasmide HDR au site de coupure généré par la ribonucléase Cas9 du plasmide CRISPR/Cas9 KO lors de la co-tranfection de ces 2 plasmides, d'après Santa Cruz*

$1x10^6$ cellules de la lignée K-562 sont transfectées avec 1 µg de chacun des 3 plasmides guides et 1 µg de plasmide HDR selon le protocole préconisé par AMAXA (Lonza) pour ce type de cellule : T-016. Après 24 heures, les cellules sont sélectionnées en ajoutant 5 µg/ml de puromycine au milieu de culture. Une dilution limite en plaque 96 puits est faite à 0,5 et 0,25 cellules/puits afin d'obtenir des clones.

Transfection de plasmide pcDNA3.1 Piezo1-FLAG et Piezo1-mCherry

Aucune étude ne référençant une expression endogène de Piezo1 dans les cellules K-562, un système de surexpression de Piezo1 a été obtenu par transfection des cellules avec un plasmide Piezo1- FLAG.

Pour les études d'électrophysiologie, les cellules K-562 ont été co-transfectées par le système AMAXA avec 2 µg du plasmide pcDNA3.1 Piezo1 humain avec un tag FLAG

(GenScript) (***Figure 18***) et 0.05 µg de pGFP (Lonza) afin que les cellules transfectées soit visible au simple microscope à fluorescence avant le patch.

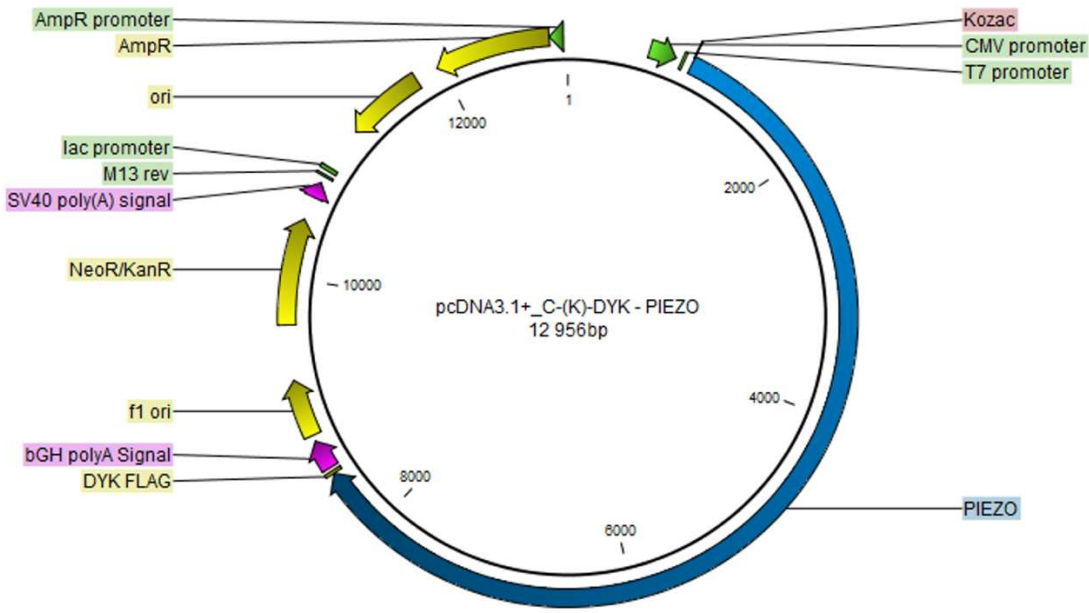


Figure 18 *: carte du plasmide pcDNA3.1 Piezo1 humain (en bleu) avec tag FLAG (en vert) GenScript*

Les anticorps disponibles ne reconnaissant par les sites antigéniques de Piezo1, ni le tag FLAG, sur les cellules transfectées, le plasmide Piezo1 humain-tag FLAG a donc été transformé et modifié afin d'intégré en position 1581 sur une boucle intracellulaire un tag mCherry (***Figure 19 a***) pour les analyses structurales. Pour cela, Le plasmide pcDNA3.1 Piezo1-FLAG a été transformé dans des bactéries ultracompétantes XL10-Gold (Stratagene) et une mutagenèse en position 1591 du plasmide a été effectuée afin d'insérer le tag mCherry en utilisant les enzymes de restriction Age1 et Spe1 (Thermofisher Scientific) avec le kit de mutagenèse (Agilent).

L'intégration de cette protéine à cette position intracellulaire a permis l'utilisation d'un anticorps anti-mCherry dans le même compartiment que l'anticorps anti-stomatine (pour les expériences de Proximity Ligation Assay) sachant que le tag à cette position n'altérait pas l'activité de Piezo1 (***Figure 19* b**) (Cox et al. 2016).

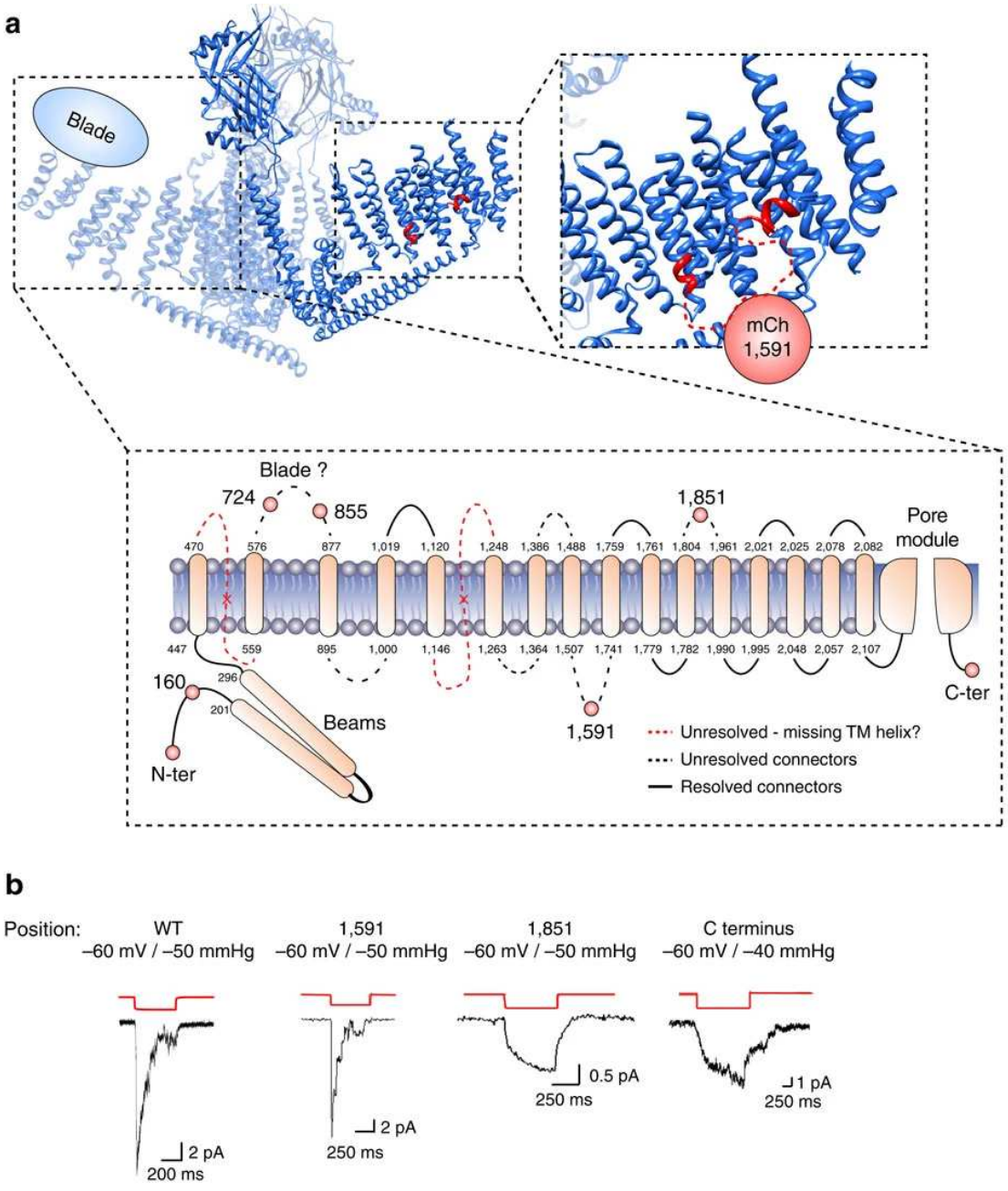


Figure 19 *: Insertion du tag fluorescent mCherry sur la protéine Piezo1 (a) positionnement du tag mCherry en position 1591 sur une boucle intracellulaire d'un monomère du canal Piezo1 (b) courant enregistré en configuration cellule attachée après stimulation par pression négative à -50mmHg, sur les cellules HEK-293 transfectées avec le plasmide sans mutation (WT) avec le tag mCherry en position 1591 ou 1851 ou à l'extrémité c-terminal (C terminus) (Cox et al. 2016)*

2 µg de plasmide pcDNA3.1 Piezo-mCherry (***Figure 20***) ont été transfectés sur $1x10^6$ cellules stom+ et stom- selon le protocole préconisé par AMAXA (Lonza) pour les cellules K562 : T-016. Les cellules ont été remises en culture dans 2 ml de milieu. 24 heures après la transfection, 0.8mg/ml de l'antibiotique de sélection neomycine (Invitrogen) a été ajouté au milieu de culture pour sélectionner les cellules transfectées. L'antibiotique a été maintenu pendant 3 semaines de culture à une concentration de 0.8 mg/ml afin de stabiliser l'expression de la protéine recombinante Piezo1-mCherry.

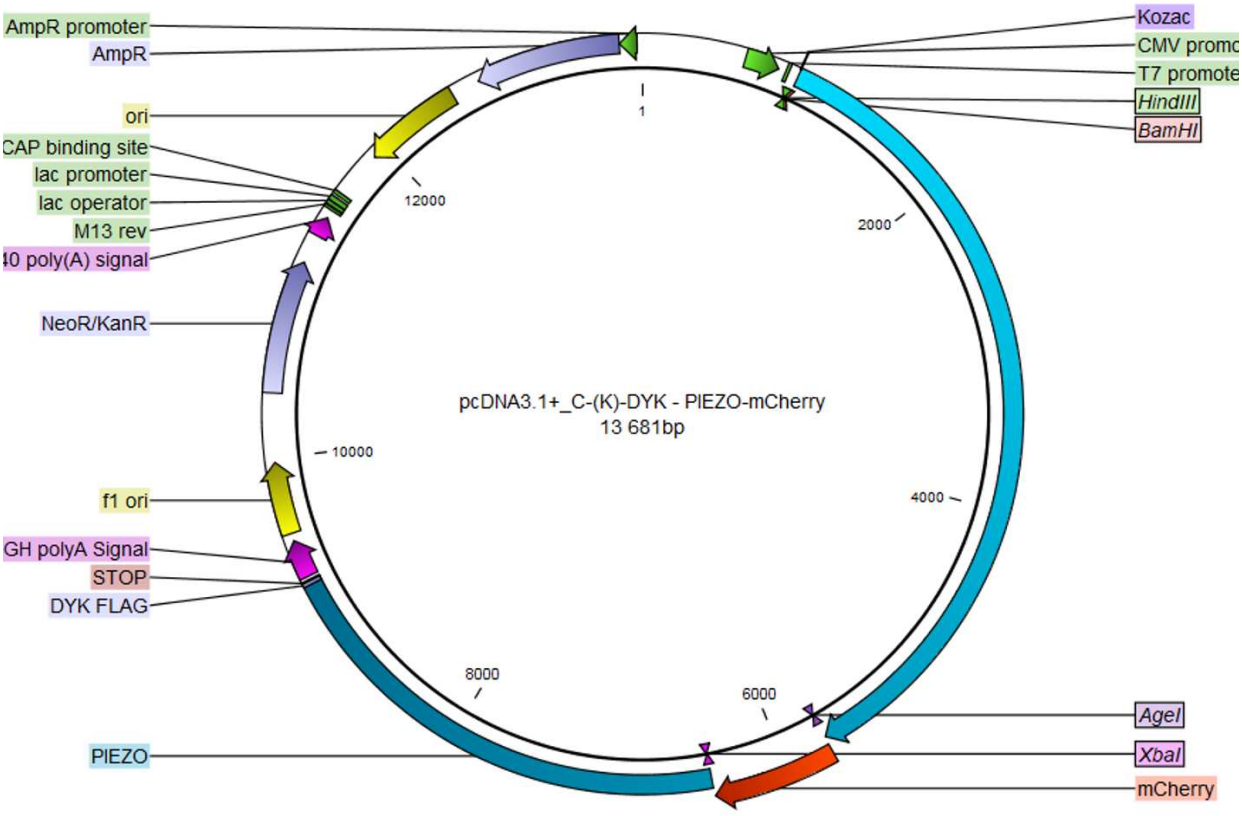


Figure 20 *: Carte du plasmide pcDNA3.1 Piezo1 (bleu)-mCherry(rouge)*

2. STRUCTURE MOLECULAIRE

Anticorps et marqueurs cellulaires

Dans cette étude, des immunoglobulines (IgGs) Monoclonales (M) et Polyclonales (P) produites par différentes espèces et de différentes provenances ainsi que des anti-IgG ont été utilisées respectivement comme anticorps primaires (***Tableau 3***) et secondaires (***Tableau 3***), dans les applications suivantes : Cytométrie en Flux (CF), Western Blot (WB), Proximity Ligation Assay (PLA) ImmunoPrécipitation (IP).

Anticorps primaires	**Type et espèce**	**Fournisseur**	**Utilisation**
Anti-stomatine E5*	IgG2b souris M	Santa Cruz	CF, WB, PLA, IP
Anti-Stomatine 7.2b*	Serum de Lapin P	Covalab	WB
Anti-Pannexine*	IgG lapin P	Alomone lab	WB, CF, PLA
Anti-Piezo1*	IgG lapin P	Novus	CF, PLA,
Anti-Piezo1 (Fam38a)	IgG lapin P	ProteinTech	WB
Anti-AE1*	IgG lapin P	Don du Pr Wagner, Zurich	CF, WB, PLA
Anti-mCherry	IgG lapin P	Millipore	CF, WB, PLA
Anti-Glut1	IgG lapin P	Millipore	CF, PLA
Anti-AQP1	IgG souris M	ThermoScientific	WB
Isotype contrôle	IgG lapin P	BD Biosciences	PLA
Isotype contrôle	IgG2b souris M	BD Biosciences	PLA

***Tableau 3** : anticorps primaires utilisés monoclonaux (M) et polyclonaux (P), provenance et utilisation dans les diverses applications techniques.*

*Ces anticorps ne reconnaissent que des épitopes intracellulaires. *In situ*, il est donc nécessaire de fixer et/ou de perméabiliser le modèle cellulaire utilisé.

Anticorps secondaires	Marquage	Fournisseur	Utilisation
Anti-IgG de souris	Fluorescéine isothiocyanate (FITC)	Beckman Coulter	CF
Anti-IgG de lapin	Allophycocyanine (APC)	Beckman Coulter	CF
Anti-IgG de souris	Brillant violet (BV421)	BD Biosciences	CF
Anti-IgG de lapin	Alexa Fluor (-488) (-633)	Thermofisher	IF
Anti-IgG de souris	Alexa Fluor (-488) (-633)	Thermofisher	IF
Anti-IgG de souris	PLUS	Duolink, Sigma Aldrich	PLA
Anti-IgG de lapin	MINUS	Duolink, Sigma Aldrich	PLA
Anti-IgG de lapin	HRP (Horseradish Peroxidase)	Abliance	WB

***Tableau 4** : anticorps secondaires utilisés*

En plus des anticorps, nous avons utilisé, dans les applications mentionnées précédemment, différents marqueurs (***Tableau 5***).

Marqueurs	Fournisseur	Fonction	Utilisation
Phalloidine-Alexa488	Thermofisher	Marqueur de l'actine	CF, IF, PLA
Lactadhérine (-FITC)	Haematologic Technologies	Marqueur de la Phosphatidylsérine (PS)	CF
TO-PRO®-3	Thermofisher	Intégrité membranaire	CF
DAPI en milieu de montage Fluoromount		Marqueur d'acide nucléique	IF
SYTOX™ (-Blue)	Thermofisher	Marqueur d'acide nucléique Viabilité	CF
FLICA 660	Bio-Rad	Marqueurs compétitifs des caspases 3/7	CF
NucView Caspases 3/7 Green	Biotium	Marqueurs compétitifs des caspases 3/7	CF

***Tableau 5** : Marqueurs cellulaires utilisés*

Lysats cellulaires et dosage des protéines

Après 2 lavages de $5x10^6$ cellules dans 10 ml de PBS par centrifugation (1 200 rpm pendant 5 minutes à température ambiante), les cellules sont resuspendues dans 1 ml de tampon Laemmli 1X (Tris 10mM pH6.8, EDTA 1mM 5% de SDS final). Le lysat de cellules est obtenu en plongeant la sonde d'un sonicateur (Branson Ultrasonic) paramétré pour induire entre 10 et 15 courtes impulsions d'ultrasons à la suspension cellulaire.

Le culot de stromas a été resuspendu à une dilution d'1/10 et 1/50 dans du tampon Laemli à 5 % de SDS.

Les lysats de cellules et de stromas sont ensuite dosés par le test Pierce d'Acide BiCinchoninique (BCA) (ThermoFisher Scientific). Brièvement, sur une plaque transparente de 96 puits à fond plat (Greiner), 200 µL du mélange des solutions A et B (50:1) fourni dans le kit sont ajoutés à 10 µL de lysat. La réaction de réduction des ions Cu (II) en ions Cu (I) par les protéines en milieu alcalin est poursuivie pendant 30 minutes à 37°C sous agitation rotative puis l'absorbance est lue à 562 nm sur un lecteur de plaque (Bio-Rad).

Gels d'électrophorèse en Polyacrylamide (SDS-PAGE)

- Pour un gel dans le but d'effectuer une coloration en nitrate d'argent ou un immunoblot anti-stomatine/anti-Pannexine1 : les lysats cellulaires sont déposés sur gel d'électrophorèse en Polyacrylamide gradient 4-12% Sodium Duodecyl Sulfate (SDS-PAGE) en tampon Bis-Tris (Invitrogen). Le gel a été plongé dans une cuve remplie de tampon de migration à base d'acide 3-Morpholino-1-propanesulfonique (MOPS, Novex) sous une tension constante de 150 mV pendant environ 1 heure afin d'effectuer l'électrophorèse des protéines.
- Pour un gel dans le but d'effectuer un immunoblot ave l'anti-Fam38A : deux solutions d'acrylamide pour réaliser un gel de migration à 8% d'Acrylamide-BisAcrylamide et un gel de concentration à 3.25% d'Acrylamide Bis Acrylamide ont été coulées successivement dans une cassette d'épaisseur 1.5 mm (Novex). Après la

polymérisation du gel, la migration est effectuée en tampon MOPS (Novex) après dépôts des lysats cellulaires et mise sous une tension constante de 150 mV pendant environ 1 heure et 30 minutes afin d'effectuer l'électrophorèse des protéines.

Coloration de gel en nitrate d'argent

Après l'électrophorèse, le gel est rincé brièvement sous un jet d'eau distillée pendant 30 secondes. Les protéines ont été fixées sur le gel, en l'incubant pendant 1 heure dans une solution contenant 50% de méthanol, 12% d'acide acétique et 0,0185% de formaldéhyde. Le gel a été lavé trois fois dans 50 mL de solution à 50% d'éthanol pendant 10 minutes puis a été pré-traité dans une solution de thiosulfate de sodium à 1.26 mM pendant 1 minute. Le gel a été de nouveau rincé avec de l'eau distillé puis les bandes ont été colorées par ajout de 2mg/ml de nitrate d'argent dilué dans de l'eau distillée contenant 0,0185% de formaldéhyde. Après un rinçage du gel à l'eau distillée la coloration a été révélée par ajout de 6% de sodium carbonate contenant 25,3 μM de thiosulfate de sodium et de 0.0185% de formaldéhyde. Enfin la réaction est stoppée par ajout direct d'acide acétique dilué à 10%.

Immunoblots

- Pour la détection de la stomatine et/ou la Pannexine1 : Les protéines sont transférées du gel d'acrylamide à une membrane de Nitrocellulose entre deux couches de papier absorbant imbibées de tampon de transfert dans un cassette Trans-Blot Turbo (système Bio-Rad).
- Pour la détection de Piezo1 : les protéines sont transférées du gel d'acrylamide à une membrane de PolyFluorure de VinyliDène (ThermoFisher Scientific) (préactivée 1 minute dans du méthanol) entre 2 couches de papier absorbant (Watmann) et entre 4 éponges imbibées de tampon de transfert (Novex) supplémenté de 10% d'éthanol, le tout placé dans une cassette de transfert remplie de tampon de transfert. Le transfert s'effectue sous un courant constant de 60 mA pendant 2 heures et 20 minutes.

Les sites non spécifiques des membranes de nitrocellulose ou de PVDF sont saturés dans un tampon salin Tris (Tris Buffer Saline, TBS, Interchim) -lait 5% (Régilait) pendant 1 heure à température ambiante. Pour les deux types de membranes, l'anticorps anti-stomatine (Santa Cruz Biotechnology) est dilué à 1/1000 en tampon de saturation. Pour la membrane de nitrocellulose, l'anticorps anti-PANX1 (Alomone Lab) est dilué à 1/1000 dans une solution de TBS-lait 5% et pour la membrane de PVDF l'anticorps anti-Fam38A (Proteintech) dilué à 1/1000 en tampon de saturation. Les incubations avec les anticorps primaires sont effectuées sur la nuit à 4°C sous agitation rotative. Après trois lavages de 10 minutes dans environ 10 mL tampon TBS contenant 0,1% de Tween 20 (Sigma), les anti-IgG de souris (Abliance) et anti-IgG de lapin (Jackson) couplés aux Peroxydases de raifort (Horseradish Peroxydases, HRP) sont dilués respectivement au 1/1000 et 1/5000 dans du TBS-lait 5% et incubés avec la membrane pendant 30 minutes. Après deux lavages dans environ 10 ml de TBS-Tween 20 pendant 10 minutes et 1 lavage dans environ 10 ml de TBS, la révélation des bandes est obtenue après incubation pendant 2 minutes de la membrane avec 1.5 ml de réactif de chimiluminescence améliorée (Enhanced ChemiLuminescence, ECL, Cytiva).

L'acquisition des images d'immunoblots et des gels a été faite sur l'imageur ChemiDoc (Bio-Rad). Ces images ont par la suite été analysée avec le logiciel Image Lab (Bio-Rad).

Cytométrie en flux

Afin de déterminer les niveaux d'expression relatifs des protéines dans chaque modèle cellulaire, les GRs et les cellules de la lignée K-562 ont été étudiés en cytométrie en flux, en utilisant les anticorps primaires décrits dans le paragraphe « Anticorps et marqueurs cellulaires ».

Les cellules K-562 sont lavées par centrifugation (400 g, 5 minutes, 20°C) trois fois dans 10 mL de PBS et fixées 20 minutes dans du PBS-formaldéhyde 4% dans la glace. Après deux autres lavages en PBS, les cellules sont perméabilisées dans une solution de PBS-Saponine 0,1% (Sigma) pendant 20 minutes à température ambiante.

Les GRs sont lavés par centrifugation (1000 g, 5 minutes, 20°C) trois fois dans 10ml de PBS et fixés 15 minutes à température ambiante dans du PBS-formadéhyde 1% (Interchim)-glutaraldéhyde 0,025% (Sigma). Après deux autres lavages en PBS, les GRs sont perméabilisés dans une solution de PBS-n-octyl-β-D-glucopyranoside 1% (Bachem) pendant 15 minutes à température ambiante.
Les stromas préparés à partir des GRs sont fixés pendant 15 minutes à température ambiante dans du PBS-formadéhyde 1%-glutaraldéhyde 0,025% puis sont lavés deux fois dans 1,5 ml de PBS par centrifugation (21 000 g, 5 minutes, 4°C).

Afin de permettre la saturation des sites libres non spécifiques, les cellules K-562, les GRs, ainsi que les stromas sont incubés 1 heure à température ambiante dans du PBS-Bovine Serum Albumin (BSA) 1% et 2% de sérum normal de chèvre (NGS) pour les stromas. Ces cellules ou vésicules sont ensuite incubées pendant 1 heure à 37°C en présence d'anticorps primaires : anti-Stomatine (1/200), anti-Pannexine (1/100), anti-Piezo1 (1/200) ou anti-mCherry (1/200). Après deux lavages par centrifugation (comme décrits précédemment selon l'outil cellulaire utilisé) les cellules, GRs, ou stromas sont incubés pendant 30 minutes avec des anti-IgG de souris, anticorps secondaires couplés à la Fluorescéine IsoThioCyanate (FITC) ou au Brillant Violet 421 (BV421) dilués respectivement au 1/50 et au 1/200 ou avec des anti-IgG de lapin, anticorps secondaires dilués au 1/100 et couplés à l'AlloPhycoCyanine (APC). Après deux lavages dans 1 ml PBS par centrifugation (21 000 g, 5 minutes, 4°C), les stromas sont incubés avec 0.165 μM de phalloidine-Alexa488 (ThermoFisher) pendant 20 minutes et lavés à nouveau par centrifugation dans 1 mL de PBS.

Enfin, l'expression de la Stomatine, de la Pannexine et de Piezo1 est analysée en cytométrie en flux (BD FACS Canto II, BD, Biosciences).

Proximity Ligation Assay (PLA)

Le PLA est une technique d'étude d'interaction *in situ* couplant l'immunodétection et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Bagchi, Fredriksson, et Wallén-Mackenzie 2015). Des culots globulaires (10 μL de cGR) fraichement prélevés sont fixés

et perméabilisés comme décrit précédemment puis sont resuspendus dans 1 mL de Duolink Blocking Buffer (Duolink, Sigma Aldrich) 1 heure à 37° afin de saturer les sites libres. La suspension globulaire est répartie sur une plaque 96 puits à fond en V (Greiner) à raison d'1x10^6 GRs/puits. Ces GRs sont incubés pendant 1 heure à 37°C en présence des anticorps anti-Pannexine1 ou anti-AE1 ou d'un isotype IgG, qui sont tous produits chez le lapin et utilisés seuls ou par paire avec, soit l'anti-stomatine, soit l'isotype IgG2b produits chez la souris. Après 2 lavages dans 200 µL de tampon de lavage A Duolink (Sigma Aldrich) par centrifugation (1200 g, 3 minutes), les GRs sont incubés pendant 1 heure à 37°C avec la paire d'anticorps secondaires (Duolink, Sigma Aldrich) dilués au 1/5ème et couplés à des oligonucléotides complémentaires : PLUS reconnaissant les IgGs de souris et MINUS reconnaissant les IgGs de lapin (***Tableau 4***).

Après 2 lavages par centrifugation dans 200 µL de tampon de lavage A Duolink, la réaction de PLA est poursuivie par la potentielle ligation des oligonucléotides, étape critique du PLA. En effet, si les 2 oligonucléotides complémentaires (et donc les 2 protéines testées) sont assez proches (distance inférieure à 40 nm (Bagchi, Fredriksson, et Wallén-Mackenzie 2015)), ils pourront s'hybrider et se lier en présence de la ligase diluée au 1/40 (Duolink, Sigma Aldrich). Après 30 minutes de ligation à 37°C, suivie de deux lavages par centrifugation dans 200 µL de tampon de lavage B Duolink (Sigma Aldrich), les doubles brins formés vont être amplifiés en présence de la polymérase diluée au 1/80 (Duolink, Sigma Aldrich) formant des « pelotes ». Cette polymérisation est effectuée sur la nuit à 37°C. Enfin, les « pelotes » formées sont marquées par hybridation pendant 20 minutes à 37°C avec la sonde Far Red (oligonucléotides complémentaires couplés à un fluorochrome) fournie dans le kit Duolink. Les différentes étapes sont schématisées dans la ***Figure 21***.

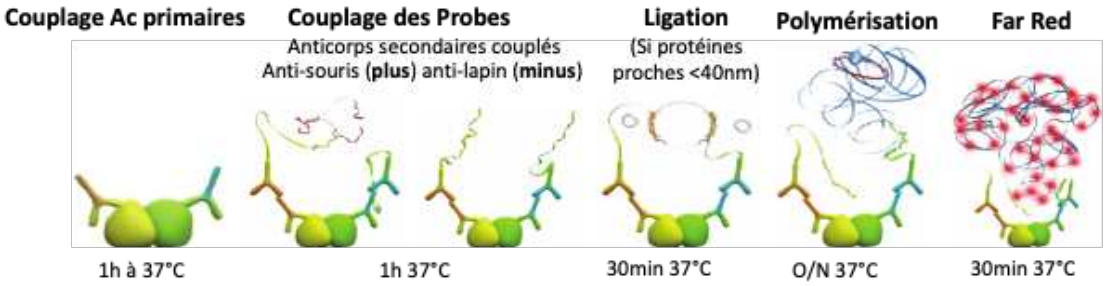


Figure 21 *: Schéma illustrant les étapes du PLA in situ selon le kit fourni par Duolink*

Pour l'étude de l'interaction entre Piezo1 et la Stomatine, le PLA est également effectué sur des stromas fixés, comme décrit précédemment sur les GRs. Après les couplages d'anticorps primaires et secondaires ainsi que des réactions de ligation, polymérisation et marquage de pelote, les stromas sont marqués avec 0.165 µM de phalloidine-Alexa488 pendant 20 minutes à température ambiante. La phalloidine se lie spécifiquement à l'actine permettant ainsi la détection des stromas faiblement denses et donc non visibles en lumière blanche (***Figure 22***).

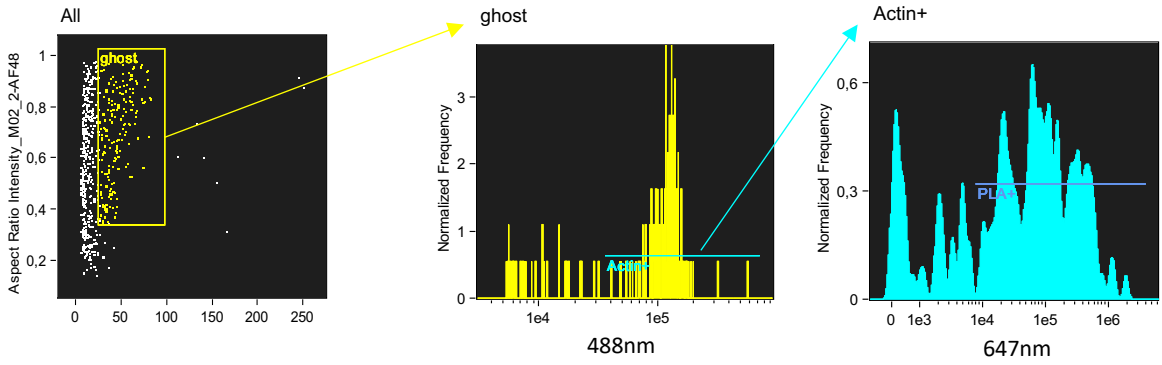


Figure 22 *: Stratégie d'inclusion des stromas (ghosts) marqués à la phalloïdine Alexa Fluor 488 pour l'analyse du PLA*

Enfin un PLA permettant de tester la proximité entre la stomatine endogène et Piezo1-mCherry recombinant est effectué sur des cellules K562 non-transfectées et transfectées avec le plasmide pCDNA3.1 Piezo1-mCherry. Les cellules fixées et perméabilisées selon le protocole établi pour la cytométrie en flux, sont d'abord traitées afin de saturer les sites libres puis incubées en présence des anticorps primaires anti-stomatine E5 et anti-mCherry pendant 1 heure à 37°C. Comme contrôle positif, l'interaction stomatine-Glut1 ayant été précédemment démontrée (Montel-Hagen et al. 2008), un PLA testant la proximité Glut-1/stomatine a été réalisé dans les cellules K562 WT qui expriment Glut1 à la membrane. Pour cela, un anticorps anti-Glut1 (***Tableau 3***) reconnaissant un épitope intracellulaire de la protéine a été utilisé en paire avec l'anti-stomatine.

Les GRs, les stromas et les cellules sont ensuite analysés en imagerie en flux (ImageStream, Amnis®, Merck). Au moins 5000 évènements sont enregistrés après application d'un masque morphologique pour les GRs, d'un masque inclusif de la fluorescence de la Phalloïdine pour les stromas, ou d'un masque inclusif de la fluorescence du Hoeschst pour les cellules K-562. Parmi les GRs ou stromas ou cellules définis par les masques précédemment décrits, le pourcentage d'évènements PLA+ correspondant à la détection de spots fluorescents en Far Red est déterminé par analyse avec le logiciel IDEAS® (Merck). Le nombre de spots par cellules est également déterminé pour les cellules K-562.

Préparation des SMALPs enrichis en Piezo1

Le SMA est un co-polymère synthétique fabriqué à partir de monomères de styrenes et d'acides maléiques qui s'insère dans les membranes afin de les dissocier en disques solubles de 10 à 40 nm de diamètre en absence de détergent. Les nanodisques de membrane appelés SMALPs (Styrene Maleic Acid LipoParticles) contiennent les protéines membranaires et leurs partenaires sans changement de leurs conformations et dans un environnement lipidique natif (Knowles et al. 2009). Les stromas préparés à partir de GRs témoins sont solubilisés dans du tampon 150 mM NaCl contenant 2,5 % (m/v) Styrene Maleic Acid (SMA, Sigma Aldrich) et la suspension est incubée 1 heure à 37°C sous agitation magnétique selon un protocole précédemment développé au laboratoire (Desrames et al. 2020).

Les SMALPs sont par la suite déposés sur un gradient discontinu de sucrose dilué dans le tampon 150 mM NaCl pH8 et composé de coussins successifs de 1.5 mL du tampon à 10% de sucrose, de 2 mL du tampon à 15% de sucrose, de 1 mL à du tampon 30% de sucrose et de 0.5 mL du tampon à 50% de sucrose dans un tube ½ x 2UC (13x51 mm, Beckman Coulter). Le tube a été ultracentrifugé pendant 4 heures et 10 minutes à 45 000 g à 25°C, puis des fractions du gradient sucrose (FSuc) sont récoltées : 500 µL pour les six premières fractions (FSuc 1-6) puis de 250 µL pour les 8 dernières fractions (FSuc 7-13). Après analyse d'un immunoblot contenant l'ensemble des fractions et incubé avec un anti-Piezo1, les fractions FSuc positives pour Piezo1 sont rassemblées dans un

volume total de 500 µL et, afin d'éliminer le sucrose de la solution de SMALPs, sont injectées dans une colonne d'exclusion de taille, Superdex 200 Increase 10/300 GL (Cytiva) en utilisant le système Akta (Cytiva). Les fractions de 500 µL sont récupérées à la sortie de la colonne (FSEC1-8) et congelées à -20°C.

Les SMALPs ont été observés en coloration négative, utilisant un microscope électronique de la plateforme de l'Institut Jacques Monod. Les SMALPs sont observés avec le grossissement 30 000 X.

Immunoprécipitation des SMALPs

400 µL de fraction de SMALPs après SEC (F_{SEC}) avec 100 µL de tampon 150 mM NaCl 5mM Sodium Phosphate pH8 et 50 mM d'arginine sont incubés avec 50 µL de billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-Stomatine (Santa Cruz Biotechnology) et 1X de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) à 4°C durant la nuit. Les SMALPs couplés sont récupérés par centrifugation des billes pendant 1 minute à 800 g et le surnageant (matériel Non Retenu, NR) est conservé à -20°C. Les SMALPs retenues sont lavés par centrifugation (1 minute, 800 g) deux fois dans 600 µL de tampon 150 mM NaCl 5 mM Sodium Phosphate pH8, une fois dans 600 µL de tampon 300 mM NaCl 5mM Sodium Phosphate pH8, et les surnageants (L1, L2, L3) sont conservés à -20°C. Les SMALPs sont élués une fois dans 50 µL de tampon Laemli 1% SDS pendant 10 minutes à température ambiante (E1) et une autre fois dans le même tampon pendant 10 minutes à 70°C (E2). Ces deux éluats sont également conservés à -20°C avant d'être analysés sur gel pour identifier les protéines retenues éventuellement en complexe dans les nanodisques.

3. MESURE D'ACTIVITE DES CANAUX IONIQUES

Mesure de l'influx de 5(6)-carboxyfluoresceine

La 5(6)-carboxyfluoresceine (5(6)-CF) est une sonde perméante fluorescente émettant à 517 nm quand elle est excitée à 492 nm. De plus, cette sonde de 376.32 Da serait apte à traverser les pores de la PANX1 élargis après stimulation, pour laisser passer des molécules jusqu'à 1 kDa (F. Qiu et al. 2011).

Les GRs décongelés ont été réjuvénés tels que décrit dans le paragraphe « Réjuvénation », lavés dans un tampon Krebs basal (en mM 135 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 5 D-glucose, 1 $MgCl_2$, 1.5 $CaCl_2$; pH 7.4 ; 300 ± 5mOsm), et resuspendus dans le même tampon à 0.1% d'hématocrite. Dans les conditions d'inhibition, les GRs ont été préalablement incubés avec des inhibiteurs de la PANX1 : 20 µM de carbenoxolone (CBX, Sigma-Aldrich) ou 100 µM de probenecide (PBC, Sigma-Aldrich) ou 0.1 µM de méfloquine (MFQ, Bioblocks) pendant 20 minutes à température ambiante. Après une centrifugation, les GRs sont resuspendus dans le tampon Krebs basal ou le tampon Krebs où le Na^+ a été substitué par du K^+ (KCl), permettant l'activation de la PANX1, avec 2mM de carboxyfluoresceine (Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes. Après trois lavages par centrifugations dans le tampon Krebs basal ou KCl, les GRs ont été resuspendus à 0.1% d'hématocrite et la fluorescence intracellulaire est mesurée en cytométrie en flux.

Mesure du relargage d'Adénosine TriPhosphate (ATP)

La bioluminescence de la luciferine oxydée en présence d'ATP, d'O_2 et de Mg^{2+} par la luciférase de luciole a permis d'évaluer la quantité d'ATP dans un milieu (***Figure 23***).

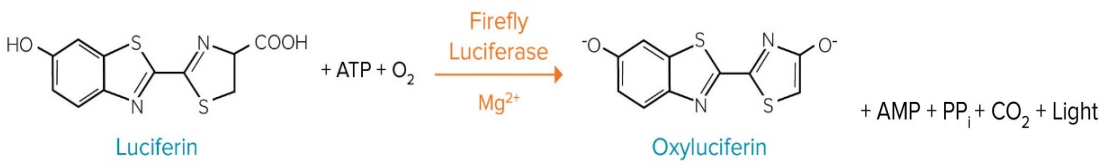


Figure 23 *: Réaction enzymatique d'oxydo-réduction de la D-luciférine en présence d'ATP et d'O_2 catalysée par la luciférase en présence de Mg^{2+} conduisant à la production d'oxyluciférine, d'AMP, d'ions biphosphate de CO_2 et de lumière.*

Après réjuvénation des GRs comme décrit dans le paragraphe « réjuvénation », les cellules ont été lavées dans du tampon RBC-2 (en mM 137 NaCl, 2.7 KCl, 1.5 Na_2HPO_4, 1.32 $CaCl_2$, 2.05 $MgSO_4$, 5 Glucose ; pH 7.4 à 300 mOsms) et resuspendues à 20% d'hématocrite.

Les GRs ont été stimulés en condition hypoosmotique, c'est-à-dire en rajoutant, volume à volume, du RBC-2 à une osmolarité de 198 mOsm, afin d'obtenir un gradient osmotique final de 60 mOsm. Les conditions basales correspondent à l'utilisation du RBC-2 isotonique (300 mOsms). Une condition d'inhibition de la Pannexine correspond à l'ajout, avant la stimulation hypoosmotique, de 100 μM de carbenoxolone (CBX) à la suspension cellulaire pendant 20 minutes.

Dans le luminomètre, l'enregistrement de la luminescence débute avec la lentille vide pendant quelques secondes, puis 48,5 μL du mélange luciférine, luciférase et co-enzyme A dans du RBC-2 est ajouté, puis 1,5 μL du surnageant de la suspension globulaire, enfin 1 μL de la gamme d'ATP de 0,25 à 16 μM pour un volume total sur la lentille de 58 μL.

Parallèlement, après centrifugation du milieu réactionnel, l'hémolyse des GRs est évaluée, par spectrophotométrie à 415 nm sur un lecteur de plaque (Bio-Rad) permettant la lecture du signal qui est émis dans le surnageant et qui correspond à la présence d'hémoglobine extracellulaire. Les GRs sont par ailleurs dénombrés par comptage au CASY.

Perméabilité au *TO-PRO®-3*

Afin d'évaluer l'activité de PANX1 dans les cellules K-562 invalidées pour la stomatine, la perméabilité au colorant fluorescent TO-PRO-3 a été mesurée par cytométrie en flux (BD FACS Canto II, BD, Biosciences). Les cellules sont préalablement incubées avec 100 μM de CBX (Sigma Aldrich), un inhibiteur de PANX1, afin de soustraire la fluorescence liée à des flux hors du canal. Les cellules sont ensuite incubées dans un tampon Tyrode basal (en mM 135 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 5 glucose, 1.5 $CaCl_2$ et 1 $MgCl_2$, pH 7.4, 300 ± 5 mOsm) et dans un tampon Tyrode hyposmotique dilué dans de l'eau distillée à 1/3.

Les cellules sont discriminées en utilisant, comme marqueur de viabilité se fixant à l'ADN le SYTOX™-blue à 1 µM (ThermoFisher), et comme marqueur d'apoptose, 0.016 µM de lactadhérine-FITC (Haematologic Technologies) pendant 15 minutes à température ambiante. 0.1 µM de TO-PRO®-3 (ThermoFisher) a été ensuite ajouté à la suspension cellulaire, et la fluorescence du TO-PRO®-3 a été quantifiée par cytométrie en flux après 5 minutes pour les cellules viables et non apoptotiques (SYTOX™ -/lactadhérine -), activées ou non par choc hypoosmotique.

Mesure du calcium intracellulaire par imagerie calcique

Afin d'évaluer l'activité du canal cationique mécanosensible Piezo1 dans les GRs témoins et OHSt, la fluorescence de la sonde Fluo-4 AM (Thermofisher), sensible au calcium intracellulaire libre est mesurée dans des GRs préalablement chargés en sonde, après un choc hypotonique. Les échantillons décongelés de GRs OHSt et témoins (environ 100 µL) sont réjuvénés, comme décrit dans le paragraphe « Réjuvénation ».

Après réjuvénation, les GRs témoins et OHSt sont lavés 2 fois dans un tampon Tyrode basal. Ils sont ensuite incubés à l'abris de la lumière dans 5 µM de Fluo-4 AM (Thermofisher) pendant 1 heure à 37°C. Après deux lavages successifs, les GRs sont dilués à 0.1% d'hématocrite dans le tampon Tyrode.

Les GRs présents dans 500 µL de suspension sont observés après les avoir laissés sédimenter dans un puit IBIDI à fond optique pendant au moins 10 minutes. Le puit est placé sur le support du microscope (TE2000-U, Nikon) avec l'objectif inversé, grossissement 40X. Le fluorophore calcique est excité par la source du laser (DPSS, Calypso) paramétrée à la longueur d'onde 491 nm. Un système de perfusion avec des valves monitorées permet la délivrance de divers tampons sur le champ d'acquisition des GRs par un capillaire d'un diamètre d'1 mm *(**Figure 24***).

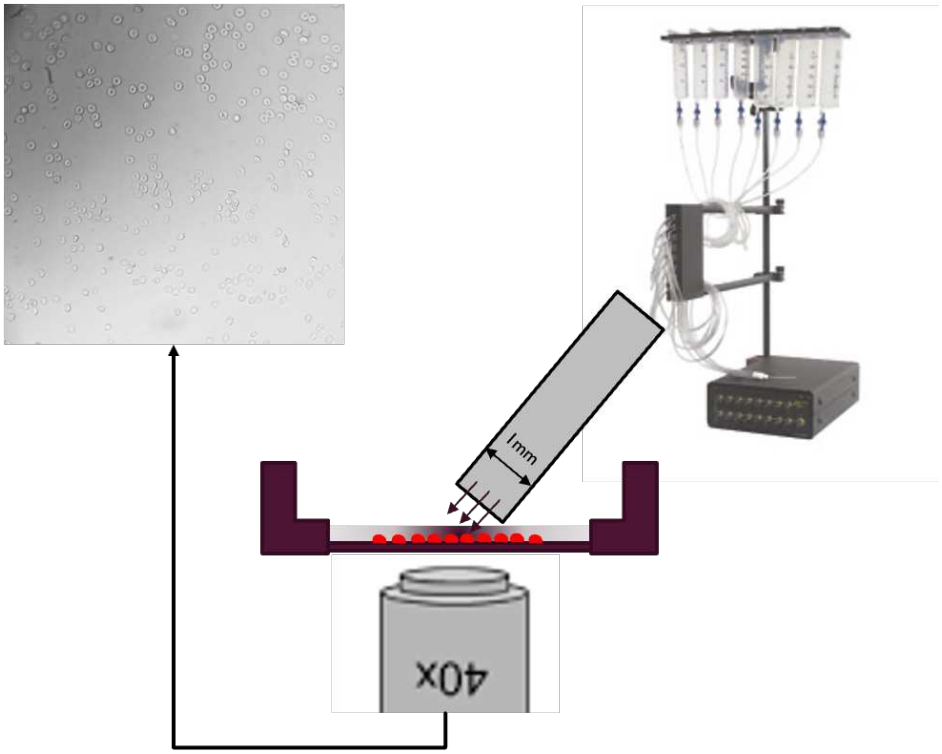


Figure 24 *: Schéma du système de perfusion local : les seringues contiennent les solutions de Tyrode isotonique, hypoosmotique avec 10 µM de Yoda1, ou hypoosmotique avec 2.5 µM de GsMTx4. Les valves monitorées contrôlent le flux dans les tubulures qui se rejoignent en un capillaire de 1mm de diamètre. Le capillaire visible dans le champ d'acquisition (ombre noir) délivre les solutions de la perfusion localement sur les GRs également dans le champ d'acquisition.*

L'intensité de fluorescence de la sonde Fluo-4 AM est suivie pendant 3 minutes par une caméra (Hamamatsu) qui est paramétrée afin d'acquérir 1 image toutes les 2 secondes dans les conditions de tampon Tyrode basal (300 mOsms) ou après un choc hypotonique en diluant le tampon Tyrode au 2/3 avec de l'eau (220 mOsms). L'impact de l'inhibition de Piezo1 sur la stimulation hypoosmotique est également étudié en incubant préalablement au moins 20 minutes les GRs témoins et OHSt avec le peptide provenant du venin d'araignée : GsMTx4 à 2.5 µM final. Ce peptide s'insère dans la membrane lipidique, inhibant la conductance du canal et augmentant les forces de tension nécessaire à l'activation de canaux cationique mécanosensibles (Gnanasambandam et al. 2017).

L'intensité de fluorescence est également suivie pendant 3 minutes après stimulation de Piezo1 par une molécule agoniste Yoda1 à 10 µM en conditions de tampon Tyrode basal (300 mOsms).

Le rapport d'intensité entre, soit les GRs en milieu hyposmotique (220 mOsms), soit les GRs stimulés par Yoda1, et les GRs en milieu isotonique (300 mOsms) est analysé pour chaque GR, en définissant des contours d'intérêt avec le logiciel Fiji (Image J).

Mesure des courants ioniques générés par un agoniste de Piezo1 : Yoda1

L'activité de Piezo1 dans les cellules K562 KO pour la stomatine, transfectées de manière transitoire avec le plasmide pcDNA3.1 Piezo-FLAG est évaluée par électrophysiologie. De 24 à 48 heures après la co-transfection des plasmides pcDNA3.1 et pGFP, 10^5 cellules ont été mises à adhérer dans un puits IBIDI Ø 0.33 cm recouvert par de la polylysine à 0.05 mM. Après 24 heures, les cellules sont lavées trois fois avec le tampon extracellulaire (en mM : 140 NaCl, 5 KCl, 2 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 5 Glucose, 10 HEPES) à pH 7.4.

La micropipette (Brand) formée avec une étireuse à pipette P-97 (Sutter Instrument) de manière à obtenir une résistance entre 5 et 7 Ohm a été préalablement remplie avec une solution intracellulaire (en mM 140 CsCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 EGTA et 10 HEPES) à pH 7.2, permettant de n'observer que les courants calciques. Les cellules sont « patchées » en configuration « cellule entière » (ou « whole cell ») donnant accès à l'intégralité des courants des canaux ioniques de la cellule, le signal électrique étant converti en signal analogique par un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instrument).

Le protocole appliqué à la cellule a été une série de rampes avec un voltage montant en continu de -120 mV à 80mV pendant 150 millisecondes en revenant à 0 mV toutes les 2.5 secondes.

Durant ces rampes, une perfusion délivre à la cellule « patchée » successivement la solution extracellulaire seule, la solution extracellulaire avec 15 μM de Yoda1 et la solution extracellulaire avec 15 μM de Yoda1 et 30 μM de Rouge de Ruthénium (RR).

RESULTATS

AXE I : L'ACTIVITE MECANOSENSIBLE DE LA PANNEXINE1 EST MODULEE PAR LA STOMATINE DANS LE GLOBULE ROUGE HUMAIN

1. INTRODUCTION DE L'AXE I

La Pannexine1 (PANX1) est un canal ionique mécanosensible dont l'activité a été détectée et étudiée depuis longtemps dans les GRs humains, de souris et de xénopes (Alvarez et al. 2022; Keller et al. 2017; Locovei, Bao, et Dahl 2006; F. Qiu et Dahl 2009). En effet, lorsque ce canal est activé *in vivo* par différents stimuli (***Figure 25***, gauche), il est capable de relarguer de l'ATP. Cet ATP contribue au processus de vasodilatation des vaisseaux afin de faciliter la circulation de GRs (González-Alonso, Olsen, et Saltin 2002). La stomatine qui est déficiente sur la membrane des GRs OHSt est connue pour moduler l'activité de canaux ioniques mécanosensibles dans les cellules neuronales. De plus, dans les cellules HEK-293 transfectées, la stomatine recombinante interagit avec la PANX1 recombinante afin de potentialiser les courants ioniques au travers du pore du canal (Zhan et al. 2012). Dans le premier axe de recherche de cette thèse, le premier objectif a été de mettre en évidence une probable interaction entre la stomatine et la PANX1 dans le GR. Le deuxième objectif a été de vérifier si l'absence de stomatine dans un contexte érythroïde pouvait contribuer à une modification de l'activité mécanosensible de la PANX1.

Afin d'étudier la présence de la PANX1 et de la stomatine dans un même complexe à la membrane du GR, nous avons utilisé le Proximity Ligation Assay (PLA) *in situ* (***Figure 25***, milieu). Concernant l'activité mécanosensible de GRs témoins et OHSt, elle a été testée dans un premier temps en activant la PANX1 par un choc hypoosmotique et en mesurant, par bioluminescence, l'ATP relargué. Dans un deuxième temps, des tests fonctionnels de perméabilité à la 5(6)-carboxyfluoresceine ont été effectués par des mesures, en cytométrie en flux, de la fluorescence intracellulaire, après stimulation par le potassium extracellulaire à grande concentration, le NaCl du tampon Krebs ayant été substitué par du Kgluconate ou du KCl (***Figure 25***, droite). Trois inhibiteurs de la PANX1 ont été utilisés afin de déterminer la spécificité de l'influx de la sonde.

Par ailleurs, nous avons utilisé les cellules de la lignée érythroleucémique K-562 pour laquelle nous avons, dans un premier temps, vérifié l'expression endogène de la stomatine et la PANX1. Après invalidation de la stomatine par CRISPR-Cas9, nous avons généré 6 clones pour lesquels nous avons testé l'activité mécanosensible de la PANX1.

En cytométrie en flux, après stimulation par un choc hypoosmotique, des mesures de la fluorescence de la sonde TO-PRO-3 intracytoplasmique liée à son influx dans les cellules ont été effectuées dans les différents clones stom+ et stom- viables et non apoptotiques.

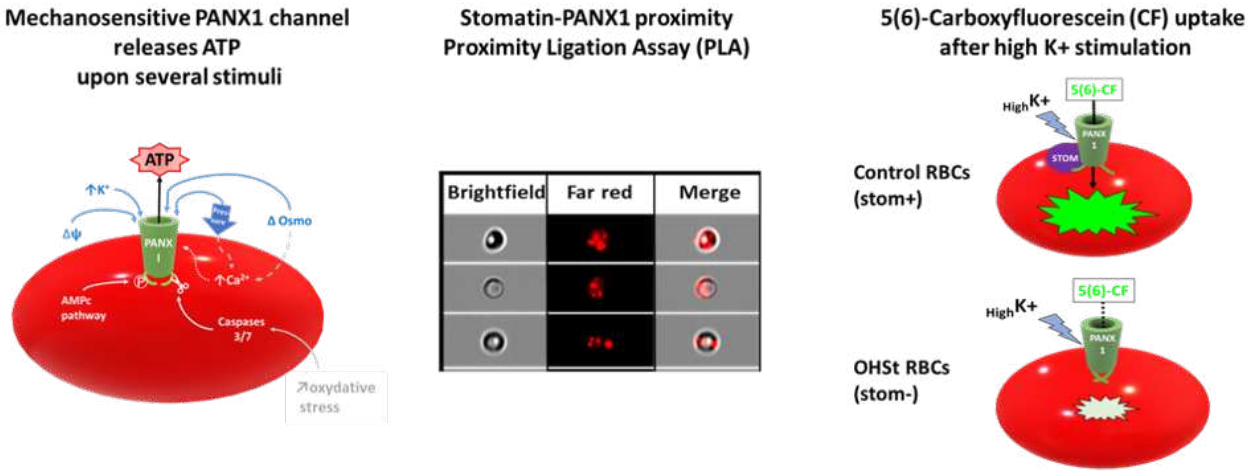


Figure 25 *: Schéma de la méthodologie appliquée à l'étude de la régulation de l'activité de la PANX1 par la stomatine dans les GRs témoins et OHSt (déficient en stomatine)*

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication parue le dans l'International Journal of Molecular Science et intitulée : « Mechanosensitive Pannexin-1 activity is modulated by stomatin in human Red Blood Cells ». Elle est incluse dans le chapitre I Partie II.a (pages 66 à 84). Les figures supplémentaires (Partie 2.b) ainsi que les résultats non publiés (Partie 2.c) font suite à la publication dans la même partie.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Mechanosensitive Pannexin 1 Activity Is Modulated by Stomatin in Human Red Blood Cells

Sarah Rougé [1], Sandrine Genetet [1], Maria Florencia Leal Denis [2], Michael Dussiot [3], Pablo Julio Schwarzbaum [2], Mariano Anibal Ostuni [1] and Isabelle Mouro-Chanteloup [1,*]

[1] Université Paris Cité and Université des Antilles, INSERM U1134, BIGR, F-75014 Paris, France
[2] Instituto de Química y Fisico-Química Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini", UBA, CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 1113 Buenos Aires, Argentina
[3] Université Paris Cité, INSERM U1163, IMAGINE, F-75015 Paris, France
* Correspondence: isabelle.mouro-chanteloup@inserm.fr

Abstract: Pannexin 1 (PANX1) was proposed to drive ATP release from red blood cells (RBCs) in response to stress conditions. Stomatin, a membrane protein regulating mechanosensitive channels, has been proposed to modulate PANX1 activity in non-erythroid cells. To determine whether stomatin modulates PANX1 activity in an erythroid context, we have (i) assessed the in situ stomatin-PANX1 interaction in RBCs, (ii) measured PANX1-stimulated activity in RBCs expressing stomatin or from OverHydrated Hereditary Stomatocytosis (OHSt) patients lacking stomatin, and in erythroid K562 cells invalidated for stomatin. Proximity Ligation Assay coupled with flow imaging shows 27.09% and 6.13% positive events in control and OHSt RBCs, respectively. The uptake of dyes 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) and TO-PRO-3 was used to evaluate PANX1 activity. RBC permeability for CF is 34% and 11.8% in control and OHSt RBCs, respectively. PANX1 permeability for TO-PRO-3 is 35.72% and 18.42% in K562 stom$^+$ and stom$^-$ clones, respectively. These results suggest an interaction between PANX1 and stomatin in human RBCs and show a significant defect in PANX1 activity in the absence of stomatin. Based on these results, we propose that stomatin plays a major role in opening the PANX1 pore by being involved in a caspase-independent lifting of autoinhibition.

Keywords: erythrocyte; ATP release; pannexin activity; stomatin; overhydrated hereditary stomatocytosis

check for updates

Citation: Rougé, S.; Genetet, S.; Leal Denis, M.F.; Dussiot, M.; Schwarzbaum, P.J.; Ostuni, M.A.; Mouro-Chanteloup, I. Mechanosensitive Pannexin 1 Activity Is Modulated by Stomatin in Human Red Blood Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9401. https://doi.org/10.3390/ijms23169401

Academic Editor: Berthold Huppertz

Received: 22 July 2022
Accepted: 18 August 2022
Published: 20 August 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/).

1. Introduction

Pannexin 1 (PANX1), a plasma membrane pore-forming channel, is widely expressed in various cell types and tissues [1]. In contrast to other members of the gap junction protein family, this single-membrane channel is no longer considered to form intercellular channels but rather described as exerting a physiological role mainly in nucleotide release [2]. In apoptotic cells, activated PANX1 has been proposed to mediate a 'find-me' signal for cell clearance by phagocyte recruitment [3]. In these cells, the most commonly accepted molecular mechanism of PANX1 activation is an irreversible cleavage by caspases 3 or 7 of its C-terminal (CT) tails [3–5], leading to a lift of autoinhibition by releasing the CT tails from the pore of the previously physically plugged channel.

The heptameric structure of PANX1 has been recently solved [6–11], giving new insights into the channel conformation though none of the presented structures could provide a precise visualization of the CT tail. Moreover, the CT tail cleavage cannot explain the PANX1 function under most physiological situations [12], where PANX1 is reversibly activated by several ligands in the absence of caspase activation. Such a mode of pore activation might entail a displacement of the CT tail due to sequential posttranslational modifications and/or binding of diverse stimuli on PANX1 subunits [12,13]. Alternatively, conformational changes in other parts of the macromolecule might participate in the gating mechanism. In this respect, dynamic conformational changes of the N-terminus of PANX1 have been associated with lipid movement in and out of the pore and with modifications of

the functionality, suggesting a role in this domain of the gating mechanism of the membrane protein [14]. Among efficient stimuli tested in vitro, the most commonly described are pressure/stretch, hypotonicity, and increased extracellular K^+ or intracellular Ca^{2+} [13]. PANX1 activation has been monitored by quantifying membrane currents, the release of intracellular ATP, and/or dye permeation [15–17]. However, K^+ and Ca^{2+} have recently been shown to have no direct effect on PANX1 conformation [11].

Previous studies revealed the expression of PANX1 at the human and mouse erythrocyte membranes [18–21], and others showed that it is the main channel regulating ATP release from RBCs in response to either hypotonic and high K^+ stress [17,22] or pharmacological and physiological stimuli [23,24]. In human, mouse, and Xenopus RBCs [25], ATP release directly correlated with the uptake of dyes with an exclusion limit >1 kDa. Moreover, RBCs from wild-type (WT) mice exhibited an activation of both ATP efflux and 5(6)-carboxyfluorescein (CF) uptake when stimulated with hypotonic high K^+ medium, whereas RBCs from PANX1 deficient mice ($Panx1^{-/-}$) did not take up the dye under similar conditions [21]. More recently, in response to hemoglobin deoxygenation (physiological stimulus), a significant lack of ATP export has been reported in vivo $Panx1^{-/-}$ mice compared to WT [26].

PANX1 was suggested to react to local modifications or deformations of its membrane environment [15]. In the erythroid context, we wondered whether the integral membrane protein stomatin might directly interact with PANX1, affecting its function. A previous report showed an interaction between recombinant proteins PANX1 and stomatin co-expressed in HEK293 cells, highlighting the involvement of the CT tail of PANX1 in this interaction [27]. Moreover, stomatin is known to interact with various ion channels and modulate their activities [28]. As regards the acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in sensory neurons, an accurate relationship was described between the inhibition of the channel and the oligomeric state of the SPFH (stomatin, prohibitin, flotillin, HflC/K)-domain of stomatin [29,30], a domain then reported to be common to stomatin-like and related proteins [31]. Interestingly, the molecular mechanism of this inhibition has recently been highlighted [32]. Stomatin has also recently been shown to interact with the Na^+ taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes and to modulate bile salt uptake [33]. In RBCs, stomatin is particularly well expressed and localized in cholesterol-rich lipid rafts, with connections to actin and the spectrin-based skeleton [34]. The monomeric form of stomatin, also known as protein 7.2 or as the major component of band 7, exhibits an apparent molecular weight of 31-kDa [35,36] and is totally absent from mature RBCs of a rare human haemolytic anaemia, hereditary stomatocytosis (OHSt) [37]. Previous studies clearly identified the interaction between stomatin and several channels or transporters in erythrocyte membrane domains [38]. They demonstrated its capability to regulate the activity of membrane transporters in RBCs, such as the glucose transporter GLUT-1 and the anion exchanger Band 3 (or AE1) [39,40].

In this study, we characterized, for the first time, a physical and functional link between PANX1 and stomatin at the human RBC membrane. We used an in situ Proximity Ligation Assay (PLA) to highlight the colocalization (<40 nm) of stomatin and PANX1 at the RBC membrane. We also took advantage of samples from three OHSt patients previously described to naturally lack stomatin [41] to investigate the role of stomatin on PANX1 activity. Finally, we confirmed our results by measuring PANX1 activity on both WT K562 ($stom^+$), and K562 invalidated for stomatin ($stom^-$).

2. Results

2.1. Deformability Properties over an Osmotic Gradient Measured in RBCs from Controls and OHSt Patients

Osmotic gradient ektacytometry (osmoscan) was used to determine RBC deformability or the Elongation Index (EI) under defined shear stress as a function of medium osmolality (in mOsm/kg). Osmoscan curves are similar for each OHSt patient compared to appropriate controls (Figure 1A). A characteristic shift to the right was observed with Osmolality values

significantly higher for the patient RBCs (O_{min}: 187.7 vs. 147.6 mOsm/kg, $O(EI_{max})$: 396.3 vs. 326.0 mOsm/kg and O_{hyper}: 630.3 vs. 497.3 mOsm/kg, for OHSt and Control, respectively) (Figure 1B), indicating an osmotic fragility and overhydration, as previously described in OHSt RBCs [42,43]. The Elongation Index values were similar among all the tested RBCs from both controls and OHSt patients except for EI_{min}, which was significantly higher for OHSt (0.219 vs. 0.122 in controls) (Figure 1B). This result might be related to the O_{min} increase in the patient RBCs.

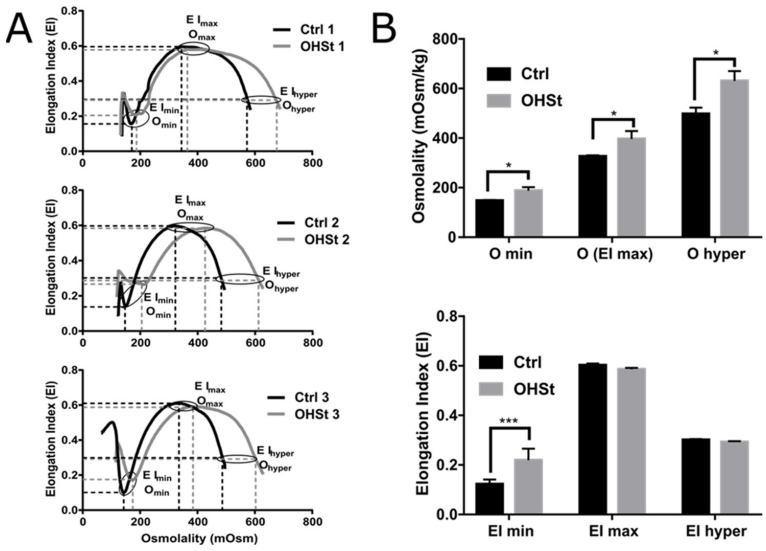


Figure 1. Rheological properties of OHSt RBCs compared to controls. (**A**) Osmoscan curves of the 3 studied OHSt patients (in grey) compared to healthy control (Ctrl) subjects (in black) with critical points (Osmolality: O_{min}, O_{max}, O_{hyper} and Elongation Index: EI_{min}, EI_{max}, EI_{hyper}) specified on each curve. (**B**) The values of these critical points have been determined, and their averages have been compared between OHSt and Ctrl using a multiple t-test (p values ≤ 0.05: * and ≤ 0.001: ***).

2.2. Stomatin and PANX1 Expression at the RBC Membrane of Controls and OHSt Patients

Western blot analysis confirmed the expected lack of stomatin in OHSt samples (Figure 2A), using a mouse monoclonal antibody (E-5, see material and methods) raised against amino acids 1–45 mapping at the intracellular N-terminus of the human stomatin. Similarly, using a KO-validated rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 18–31 mapping at the intracellular N-terminus of PANX1 revealed the presence of PANX1 at the RBC membrane of control and OHSt patients (Figure 2A). On the immunoblot, PANX1 could be detected at the expected molecular weight of 40 kDa representing a monomeric form. Moreover, large bands at 80 kDa were also detected in all samples, and these bands most probably correspond to a dimer of PANX1. We used the same antibodies in flow cytometry analysis to measure stomatin and PANX1 expression levels in permeabilized RBCs from controls and OHSt patients. The values of Mean Fluorescence Intensity (MFI) confirmed the stomatin-deficiency in OHSt RBCs (MFI: 85.8 vs. 978.3 in Controls). Regarding the expression level of PANX1, this study revealed a slight increase in OHSt (MFI: 783) compared to controls (MFI: 553) (Figure 2B), suggesting either a higher PANX1 copy number at the OHSt RBC membrane or increased accessibility of the anti-PANX1 antibody in the absence of stomatin. A similar trend was found when quantifying the expression level of AE1 on OHSt RBC membranes with anti-AE1 (unpublished results). Even though the specificity of the anti-PANX1 antibody signal has been previously demonstrated by

the supplier using KO samples, it was also validated here by flow cytometry using RBCs previously incubated with a competitor peptide (Figure S1).

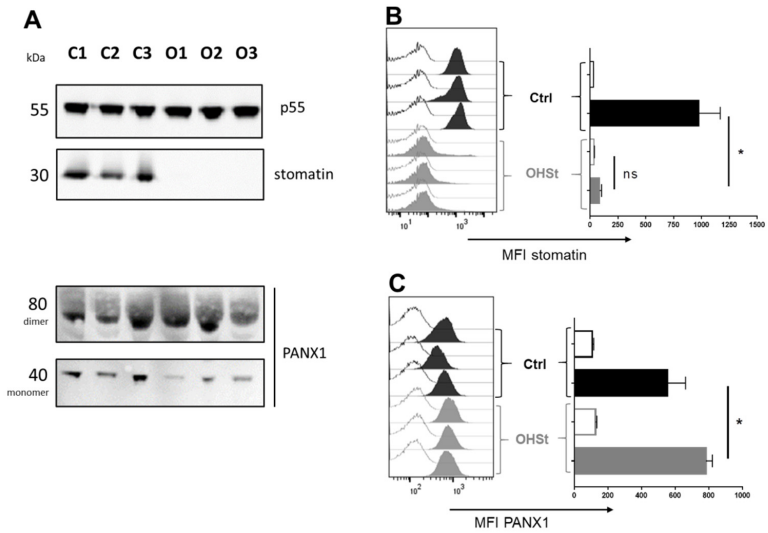


Figure 2. Stomatin and PANX1 expression in OHSt RBCs compared to controls. (**A**) Western blot analysis of RBC ghosts from 3 controls (C1, C2, C2) and the 3 OHSt patients (O1, O2, O3) using mouse monoclonal anti-stomatin (E-5), rabbit polyclonal anti-PANX1 and rabbit polyclonal anti-p55 as control. The molecular weights (kDa) of the detected bands are mentioned. (**B**) Flow cytometry analysis of stomatin expression in the RBCs of the 3 controls and the 3 OHSt patients after permeabilisation. Negative controls consist of the observed fluorescence with only the secondary antibody. The averages of Mean of Fluorescence Intensity (MFI) were compared between OHSt and control (Ctrl) RBCs using a two-way ANOVA Sidak's multicomparison test (p values > 0.05: ns and $\leq$0.05: *, ns stands for not significant), paired for comparisons within OHSt samples when signals with anti-stomatin were compared to that of Negative controls and unpaired when OHSt were compared to Ctrl. (**C**) Flow cytometry analysis of PANX1 expression in the 3 controls and the 3 OHSt patient RBCs after permeabilization and comparisons of MFIs between controls and OHSt, as performed in B.

2.3. Proximity between Stomatin and PANX1 in Control RBCs

Using validated anti-stomatin and anti-PANX1 antibodies, an in situ PLA was performed on fixed and permeabilized control red cells from unfrozen control blood of 7 different individuals. Following the incubation with the primary antibodies, the addition of PLA reagents and successive steps (probe coupling, ligation, polymerization, and finally hybridization with a fluorescent dye) produced positive reactions that were characterized by FarRed spots clearly visualized in some RBCs using an Amnis ImageStream Imaging Flow Cytometer (Figure 3A). The positive reactions corresponding to the proximity of 40 nm or less between the two stomatin and PANX1 proteins could be quantified by determining a percentage of RBCs containing the FarRed spots designated as %PLA+. The anti-stomatin/anti PANX1 antibody pair gave 27.09% PLA+ (Figure 3B). This result could be compared to that obtained in the same conditions but using the anti-stomatin/anti-AE1 antibodies, which gave 42.38% PLA+ (Figure 3B), in agreement with previous studies [39]. The slightly higher percentage obtained for the positive control is consistent with the high expression level of both stomatin and AE1 compared to a much lower expression level of PANX1 in RBCs. In this assay, negative controls were initially composed of reactions missing one of the two primary antibodies or both, giving 4.01% PLA+ and 1.57% PLA+, when anti-stomatin and anti-PANX1 were used alone, respectively (Figure 3B). Moreover,

we used stomatin-deficient RBCs to perform another PLA negative control, this time using the anti-stomatin/anti-PANX1 antibody pair. This PLA was performed on frozen and thawed RBCs and resulted in 6.13% PLA+ from the RBCs of the 3 OHSt patients (Figure 3C). This value was significantly lower than that obtained from frozen and thawed control RBCs (26.67%). Interestingly, values for the stomatin/PANX1 tests were very similar whether control RBCs had been frozen/thawed or not (27.09% vs. 26.67% PLA+, respectively).

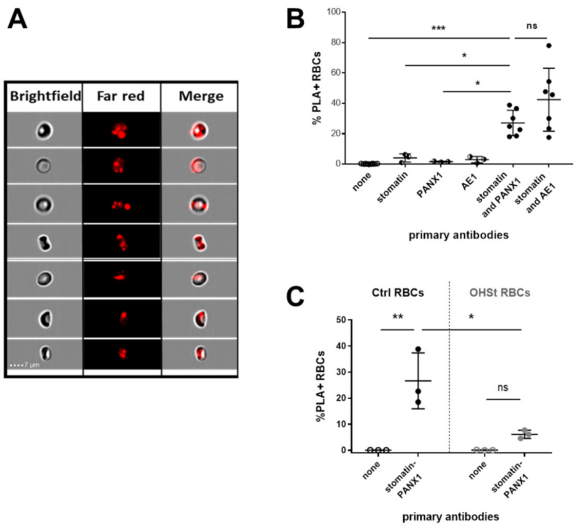


Figure 3. Stomatin and PANX1 proximity in control and OHSt RBCs assessed by Proximity Ligation Assay (PLA) and analyzed by Imaging Flow Cytometry. (**A**) PLA-positive (PLA+) events characterized by red spots which result from the detection oligos coupled to fluorochromes (FarRed) hybridizing to sequences in the amplified DNA were visualized by Imaging Flow Cytometry and merged with Brightfield images of the corresponding Control RBCs. (**B**) Quantification of the assay corresponding to the percentage of PLA+ RBCs was performed several times in different conditions: without any primary antibody (none, N = 10), with only one antibody (anti-stomatin or anti-PANX1 or anti-AE1, N = 3 for each condition) and in the presence of two antibodies (anti-stomatin + anti-PANX1 or anti-stomatin + anti-AE1, N = 7 in both conditions). A comparison was performed using an unpaired One-way Anova Tukey's test. (**C**) PLA using anti-stomatin + anti-PANX1 was performed in identical conditions to those described above but on frozen/thawed control (Ctrl) and OHSt RBCs and compared using paired or unpaired (between control and OHSt) Two-way Anova Sidak's multiple comparisons test (p values > 0.05: ns, ≤0.05: *, ≤0.01: ** and ≤0.001: ***). ns stands for not significant.

2.4. ATP Release from RBCs

Rates of intracellular ATP release from RBCs were estimated by quantifying eATP concentration by online luminometry. The first series of experiments were run on fresh RBCs.

In isoosmotic medium (iso), basal levels of eATP in RBCs amounted to 0.10 ± 0.02 pmol/10^6 cells (Figure 4A). The hypoosmotic treatment (hypo) led to a 7-fold increase in total eATP concentration. In contrast, after stimulation, the increase of lytic ATP accounted for only 13% of the hypotonically induced-ATP release. Carbenoxolone (CBX), a well-known PANX1 inhibitor, significantly reduced the hypotonically elevated total eATP content by 56% (i.e., from 0.76 to 0.33 pmol/10^6 cells) (Figure 4A).

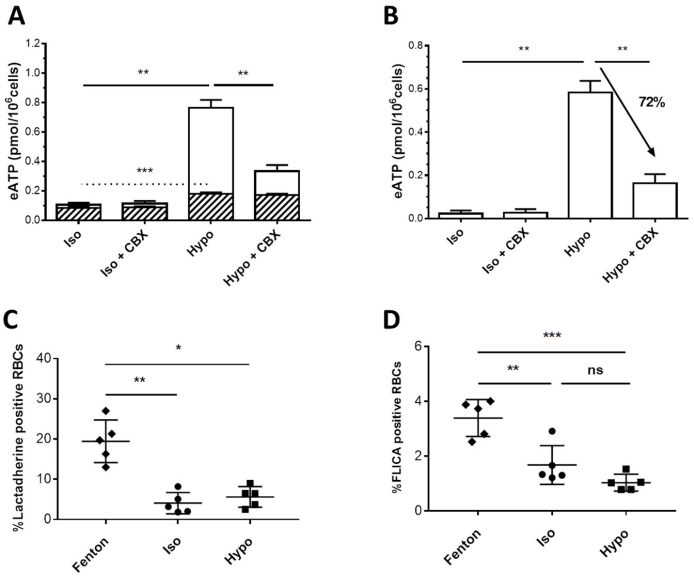


Figure 4. Activation of ATP release in fresh RBCs by a hypoosmotic challenge. (**A**) RBC suspensions were exposed to isoosmotic (Iso) or hypoosmotic (Hypo, 240 mOsm/kg) stimulation. Experiments were performed with or without preincubation with 100 µM CBX, a PANX1 inhibitor. Results are expressed as eATP (pmol/10^6 cells). The hemoglobin concentration of paired samples was used to estimate lytic eATP. A stacked graph was built to show the contribution of lytic ATP (hatched bars) within total ATP release from RBCs. Lytic and total eATP values were compared using a One-Way ANOVA Dunnett's test for Multiple Comparisons (N = 5). The results shown are mean values ± SEM. (**B**) The difference between total eATP and lytic eATP was calculated and denoted as non-lytic eATP. Non-lytic eATP values were compared using a One-Way ANOVA Dunnett's test for Multiple Comparisons. (**C**) PS exposure was measured by flow cytometry on Lactadherin-FITC stained RBCs in basal conditions after treatment with Fenton's reagent, as a control of eryptosis, and in basal or hypoosmotic conditions without Fenton. (**D**) Caspase activation was measured under conditions similar to PS exposure but on FLICA 660 caspase3/7-stained RBCs. The statistical analysis of the last two measurements (N = 5) was performed using an RM-one-way ANOVA test. (p values > 0.05: ns, ≤0.05: *, ≤0.01: ** and ≤0.001: ***). ns stands for not significant.

These results suggest that in fresh RBCs, most ATP release is mediated by PANX1. Fresh RBCs showed neither PS externalization nor caspase activation (Figure 4C,D), thus suggesting that PANX1 activation by hypotonicity does not require an irreversible caspase-dependent CT tail cleavage.

ATP release was also assessed in frozen/thawed RBCs from OHSt RBCs and their respective frozen/thawed control RBCs. Prior to experiments, cells were thawed and rejuvenated to increase levels of intracellular ATP and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) to that of fresh cells [44].

The hypoosmotic treatment triggered a 2- and 2.9-fold increase of eATP in control and OHSt RBCs, respectively, suggesting activation of ATP release (Figure 5A). Baseline (Iso) eATP was equivalent between control and OHSt RBCs. However, these values are significantly higher than baseline values obtained using fresh RBCs (Figure 4B). Furthermore, exposure to 100 µM CBX did not significantly affect the hypoosmotically stimulated ATP release in both cell groups and was clearly less efficient than in fresh RBCs (decrease of 23%, Figure 5B control cells, compared to 72%, Figure 4B). Results suggest that in frozen/thawed rejuvenated RBCs, PANX1 is not the main conduit mediating ATP release in response to hypoosmotic stimulation.

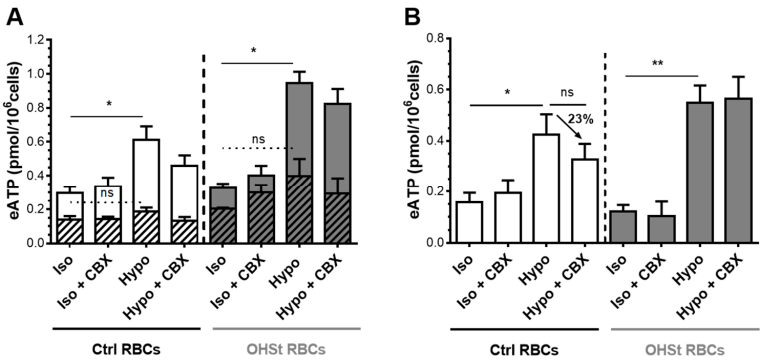


Figure 5. Activation of ATP release in frozen/thawed and rejuvenated RBCs from controls and OHSt patients. Suspensions of frozen/thawed and rejuvenated RBCs were exposed to isoosmotic (Iso) or hypoosmotic (Hypo, 240 mOsm/kg) stimulation. Experiments were performed with or without preincubation with 100 µM CBX, a PANX1 inhibitor. Results are expressed as eATP (pmol/10^6 cells). (**A**) Stacked graph showing total eATP including lytic eATP (hatched bars) released from control (white bars) or OHSt (grey bars) RBCs. The hemoglobin concentration of paired samples was used to estimate lytic eATP. (**B**) Non-lytic eATP was calculated as the differences between total eATP and lytic eATP. Total, lytic, and non-lytic eATP values were compared using a One-Way ANOVA Dunnett's test for Multiple Comparison (N = 3). The results shown are mean values ± SEM. (p values > 0.05: ns, ≤0.05: *, ≤0.01: **). ns stands for not significant.

2.5. 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) Uptake after High K^+ Stimulation of Control and OHSt RBC Membranes

Because frozen/thawed cells had lost the ability to respond to hypoosmotic stimulation, we decided to stimulate these cells using a high K^+ buffer as previously described [17]. Uptake of the fluorescent tracer molecule 5(6)-carboxyfluorescein by human erythrocytes was performed under conditions where Na+ was replaced by K^+ without changing the osmolarity of the Krebs solution. The Mean Fluorescence Intensity (MFI) was determined by flow cytometry following the protocol described in the patients and methods section below.

For frozen/thawed control RBCs, a significant 34% increase in fluorescence intensity was observed in the presence of K^+ (MFI Basal: 105 vs. MFI KCl: 160) (Figure 6A, white bars), and the use of three different PANX1 inhibitors resulted in a fluorescence signal was similar to that of basal conditions (Figure 6B). However, the RBC volume, corresponding to the FSC intensity (that is proportional to the diameter of the cells), was unmodified after stimulation (Figure 6C, black symbols). These results strongly indicated that PANX1 is activated in control RBCs by KCl. In contrast, on frozen/thawed OHSt RBCs, after KCl stimulation, the increase of fluorescence intensity was very weak and not significant (Figure 6A, grey bars). Moreover, the decrease of fluorescence intensity after preincubation with CBX was also non-significant. When frozen/thawed OHSt RBCs were compared to control RBCs in terms of their size, an expected significant increase of 31% (FSC basal OHSt: 118915 vs. FSC basal control: 90647) (Figure 6C, white symbols) was observed, consistent with the well-known increased volume of OHSt RBCs compared to that of control RBCs (in this study, mean RBC volume for OHSt: 138.2fl and for controls: 90fl, Supplementary Table S1). In high K^+ conditions, the size of OHSt RBCs was also unmodified. All these results strongly indicate that stomatin-deficient OHSt RBCs appear insensitive to K^+ stimulation regarding the fluorescein uptake, suggesting a potential inactivation of PANX1 in these cells.

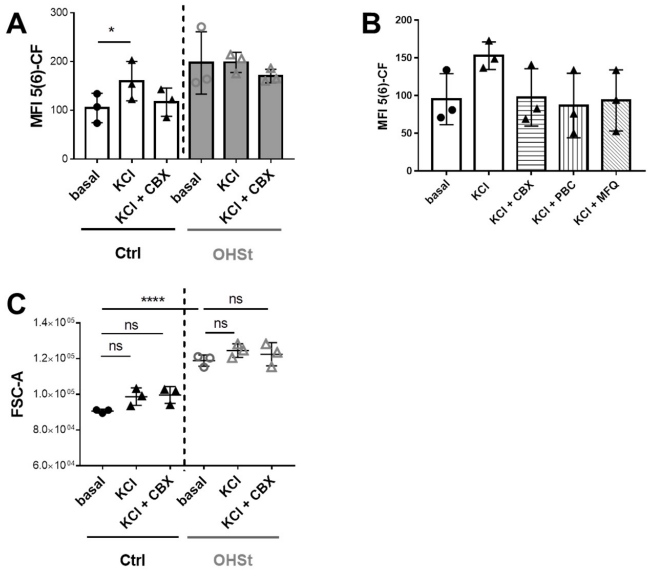


Figure 6. 5(6)-carboxyfluorescein uptake in control (Ctrl) and OHSt RBCs after stimulation by high K^+. (**A**) MFI due to the dye uptake in Ctrl (black) and OHSt (grey) frozen/thawed rejuvenated RBCs measured by flow cytometry in basal conditions and after stimulation by KCl without or with incubation with CBX. (**B**) Carbenoxolone (CBX), probenecid (PBC), and mefloquine (MFQ), three different PANX1 inhibitors, were added to RBC 20 min before the stimulation, resulting in a fluorescence signal similar to that of basal conditions. (**C**) FSC was also determined in all the conditions described above under KCl stimulation. Data obtained from stimulated cells were compared to that of unstimulated cells or cells stimulated in the presence of CBX using a paired Two-way Anova Sidak's multiple comparisons test. The same test but unpaired was used when Ctrl and OHSt RBCs were compared. (p values > 0.05: ns, ≤0.05: *, ≤0.0001: ****). ns stands for not significant.

2.6. Endogenous Expression of Stomatin and PANX1 in K562 Cells and PANX1-Dependent TO-PRO-3 Uptake

As we could not completely exclude that OHSt RBCs display other membrane abnormalities besides stomatin deficiency, we decided to test PANX1 activity using the nucleated erythroid K562 cell line. As we show below, using this cell line, it was possible to knock down the *STOM* gene and compare PANX1 activity in WT ($stom^+$) vs. $stom^-$ cells.

Endogenous expressions of stomatin and PANX1 in K562 cells were tested by flow cytometry with the anti-stomatin and anti-PANX1 antibodies previously used on RBCs. Clear positive signals (MFI anti-stomatin: 1013 and MFI anti-PANX1: 2153) were obtained (Figures 7A and 7B, respectively) compared to controls.

In these cells, PANX1 activity was assessed by the uptake of the FarRed fluorescent tracer molecule TO-PRO-3, as previously described [4], after stimulation by hypotonic stress of 80 mOsm. However, TO-PRO-3, impermeant to live cells, can penetrate cells not only through activated PANX1 channels but also through compromised membranes characteristic of dead cells. Importantly, these dead cells had to be excluded from the analysis of TO-PRO-3 uptake, and this could be done by detecting their specific positive stain with Sytox blue. In addition, the apoptotic cells exhibiting a possible irreversible activation of PANX1 by caspase cleavage of the CT tail also had to be excluded. They were specifically stained with Lactadherin FITC, detecting extracellular phosphatidylserine. The TO-PRO-3 uptake was analyzed on at least 85% of viable K562 clones (Sytox-negative and Lactadherin-negative, Figure 7C).

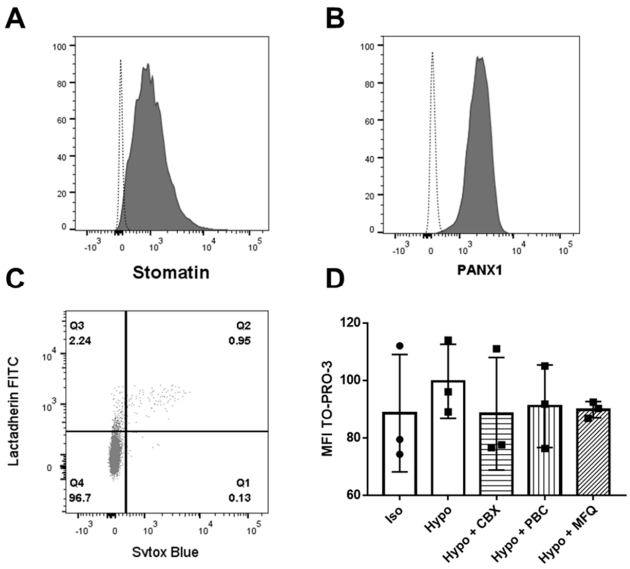


Figure 7. Endogenous expression of stomatin and PANX1 in K562 cells and PANX1-dependent TO-PRO-3 uptake by non-apoptotic K562 cells. (**A**) Stomatin expression analysed by flow cytometry on permeabilized K562 cells using anti-stomatin E5 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). (**B**) PANX1 expression analysed by flow cytometry on permeabilized K562 cells using anti-PANX1 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). (**C**) Gating strategy of Sytox-negative (Pacific Blue) and Lactadherin-negative (FITC) K562 cells (at least 85%, Q4) in which the TO-PRO-3 staining (APC) was evaluated by flow cytometry. (**D**) TO-PRO-3 uptake was measured on K562 cells in basal conditions and, after a hypotonic stimulation (80 mOsm/kg), on K562 cells that were preincubated or not with several PANX1 inhibitors (carbenoxolone [CBX], probenecid [PBC], and mefloquine [MFQ]) (N = 3).

Preincubation of K562 cells with several PANX1 inhibitors (carbenoxolone [CBX], probenecid [PBC], and mefloquine [MFQ]) before hypotonic stimulation resulted in fluorescence intensities comparable to that obtained in isotonic conditions (Figure 7D CBX: 88.37, PBC: 91, MFQ: 89.8 compared to control Iso: 88.57). This indicates that the increase of TO-PRO-3 fluorescence after stimulation is PANX1 dependent.

2.7. Generation of Stomatin CRISPR/Cas9 Knockout K562 Cell Clones

After co-transfecting K562 cells with stomatin Homology-Directed DNA Repair (HDR) plasmids with either control CRISPR/Cas9 or stomatin CRISPR/Cas9 Knockout plasmids, cells were stabilized for 3 weeks in the presence of puromycin for selection of cells where Cas9-induced DNA cleavage had occurred. The puromycin-resistant cells from both co-transfections were tested by flow cytometry after permeabilization and incubation with an anti-stomatin antibody (Figure 8A). Cells co-transfected with HDR and control CRISPR/Cas9 plasmids were distributed into a homogenous population expressing stomatin (MFI: 1315). In contrast, cells co-transfected with HDR and stomatin CRISPR/Cas9 KO plasmids were distributed into two sub-populations, one showing a similar expression level of stomatin to the control cells (MFI: 1071) and the second one exhibiting a marked decrease in stomatin expression (MFI: 307). A limiting dilution of these cells gave rise to several clones. A flow cytometry analysis of each clone regarding stomatin expression clearly showed that each was derived from one of the two sub-populations (Figure 8B). Five clones (C2, C9, E3 D8, and G8) were identified as stomatin-negative ($stom^{-}$) with a stomatin expression level similar to that of the negative control (average MFI for negative control: 305 (not shown) and the average of MFI for the 5 clones: 368.8, Figure 8C).

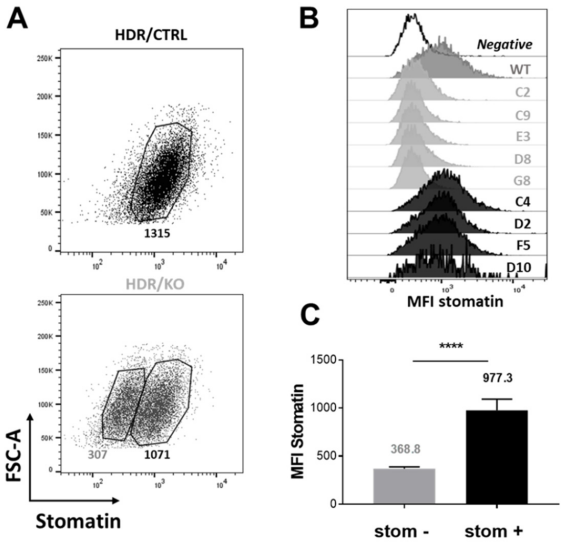


Figure 8. Stomatin deficiency on stomatin Knockout transfected K562 cells and generation of stom$^+$ and stom$^-$ clones. (**A**) Stomatin expression was assessed by flow cytometry on puromycin-resistant K562 cells after co-transfection with stomatin Homology-Directed DNA Repair (HDR) plasmids together with either control CRISPR/Cas9 (CRISPR Control) or stomatin CRISPR/Cas9 Knockout (CRISPR KO) plasmids. This led to two different dot plot representations (HDR/ CRISPR Control and HDR/ CRISPR KO), where fluorescence intensity corresponding to stomatin expression was plotted on the x-axis and Forward Scatter (FSC) on the y-axis. (**B**) Flow cytometry profiles of K562 stomatin-negative clones (C2, C9, E3 D8, and G8) compared to stomatin-positive controls (WT) and controls incubated without the primary anti-stomatin antibody (negative). (**C**) MFI averages of stomatin-negative (stom$^-$) and stomatin-positive (stom$^+$) K562 clones. A comparison of their stomatin expression level was performed using an unpaired *t*-test. (p values $\leq$ 0.0001: ****).

2.8. PANX1 Expression and Caspase-Independent TO-PRO-3 Uptake in stom$^+$ and stom$^-$ K562 Cell Clones

A similar endogenous expression level of PANX1 was detected for the stom$^+$ (average MFI: 2943) and the stom$^-$ (averaged MFI: 2893) K562 clones (Figure 9A) compared to WT K562 cells (Figure 7B).

Under hypotonic stimulation, the average (three different measurements for each clone) of the fluorescence intensities due to TO-PRO-3 uptake was determined. In stomatin-negative clones, a significant decrease in fluorescence, as compared to stomatin-positive clones (normalized fluorescence $(F - F0)/F0 \times 100$: 18.42 for stom$^-$ and 35.72 for stom$^+$) was observed, indicating that PANX1 is inactive in these clones (Figure 9B). Interestingly, the cell volume of stimulated K562 cells increased similarly whether they expressed stomatin (Figure 9C), ensuring accurate comparisons between the TO-PRO-3 fluorescence intensities measured in several conditions. As shown in Figure 9D, the same hypotonic stimulation led to a slight but significant activation of caspases 3/7 in both stom$^+$ and stom$^-$ K562 clones, respectively 2.49% and 1.90%, but this was not enhanced in the absence of stomatin.

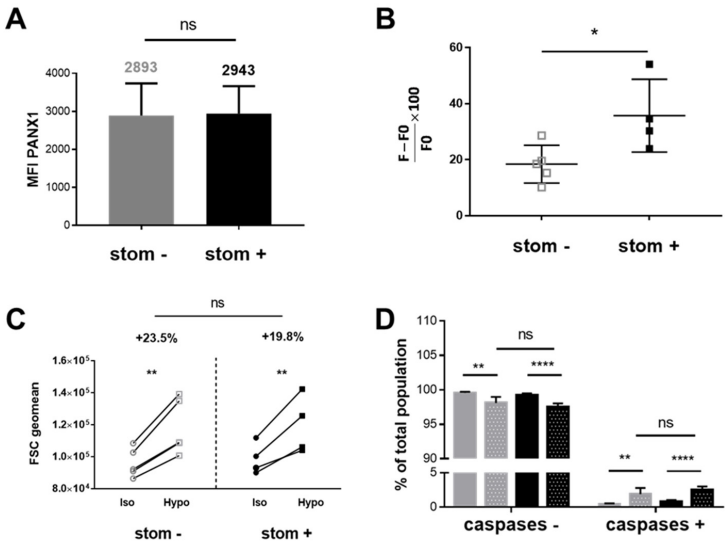


Figure 9. TO-PRO-3 uptake in viable and non-apoptotic stom$^+$ and stom$^-$ K562 cells after hypotonic stress. (**A**) Expression of PANX1 in stom$^-$ and stom$^+$ K562 clones was assessed by flow cytometry, giving similar levels. (**B**) Comparison of the relative TO-PRO-3 fluorescence intensity (F − F0/F0 − 100) between stom$^+$ (black squares) and stom$^-$ (grey squares) K562 cell clones using an unpaired t-test. (**C**) Cell volume of stom$^+$ (black) and stom$^-$ (grey) K562 clones assessed by flow cytometry comparing FSC geomean values obtained in isotonic (circles) and hypotonic (80 mosm/kg, squares) conditions. (**D**) Caspase 3/7 activity measured by flow cytometry analysis allowing the determination of the percentage of fluorescent stom$^+$ (iso: black and hypo: black with white dots) and stom$^-$ (iso: grey and hypo: grey with white dots) K562 cell clones preloaded by the NucView substrate and stimulated by hypotonic stress (two-way ANOVA Sidak's multiple comparisons test). (p values > 0.05: ns, ≤0.05: *, ≤0.01: ** and ≤0.0001: ****).

3. Discussion

To study the functional properties of the mechanosensitive channel PANX1 and to explore its modulation by stomatin, we carried out investigations using RBCs and K562 cells. While stomatin is ubiquitously expressed at the membrane of both cell types, the cell surface expression of PANX1 has not been clearly identified to date. Indeed, in human RBCs, the presence of PANX1 has been essentially demonstrated by functional studies [17,24] or by western blot [18], and, in K562 cells, its expression has previously been reported from proteomic studies [45]. In the present study, we used a specific anti-PANX1 antibody which allowed a clear identification of PANX1 at the membrane of human RBCs and K562 cells. On RBCs, a glycosylated form of the channel was revealed, consistent with a glycosylation site previously described at the second extracellular loop (Asn-254, [46]). Glycosylation in PANX1 is considered essential to prevent two oligomers from docking and forming an intercellular channel, thus ensuring that they form a single-membrane channel connecting the intra- and extracellular compartments of cells.

Furthermore, to highlight proximity (<40 nm) between PANX1 and stomatin at the erythrocyte membrane, an in situ PLA coupled with imaging flow cytometry was used to visualize and quantify, for the first time in RBCs, PLA-positive events. The in situ stomatin-PANX1 proximity in RBCs revealed in this study is consistent with a previously reported interaction between the two recombinant proteins stomatin and PANX1 by an in vitro pull-down assay [27]. Since stomatin was reported as a major protein in cholesterol-rich microdomains of RBCs (lipid-rafts) [47], present data strongly suggest that PANX1-stomatin interactions occur in these microdomains of the RBC membranes.

Many stimuli have been described to activate PANX1 in a large number of cells expressing the endogenous or the recombinant mechanosensitive channel [13]. In the present study, when fresh RBCs were stimulated in vitro by applying hypotonic stress, a substantial non-lytic ATP release, sensitive to PANX1 inhibitor carbonoxolone (CBX), strongly indicated that PANX1 plays an essential role in ATP release from RBCs, as previously described with other stimuli [4,22,23,48]. However, a considerable release of ATP was also observed in unstimulated frozen/thawed and rejuvenated RBCs, not due to hemolysis. Furthermore, the stimulation by the hypotonic stress induced a small but significant increase of ATP release that could not be inhibited by CBX, suggesting other exit pathways than PANX1 for ATP. The voltage-dependent anion channel (VDAC) previously proposed to be able to release ATP once oligomerized [49] could be involved in this pathway, and the oligomerization state of VDAC would be interesting to investigate in frozen/thawed RBCs. The present study shows that in vitro ATP release assays, which can be successfully used to specifically study the PANX1 activity on fresh RBCs, are unsuitable for such investigations on frozen/thawed and rejuvenated RBCs. In contrast, stimulation by K^+ previously described to induce 5(6)-Carboxyfluorescein dye uptake through the activated PANX1 [20] could be efficiently reproduced in this study on fresh as well as on frozen/thawed RBCs.

We took advantage of the availability of blood samples of 3 OHSt patients, genetically defined by a mutation in the *RHAG* gene [41] and phenotypically characterized by a cation leak and a stomatin deficiency [50–52]. In the absence of mutation in the *STOM* gene, the origin of this deficiency in mature erythrocytes is still unknown [53]. However, the rheological properties of the patient RBCs, as previously described for OHSt [43], resulted in specific values on the osmoscan curves that were characteristic of an increase in osmotic fragility and overhydration [54], and this could be compared for the first time between various OHSt patients. The present study also revealed a common EI_{min} value for the 3 OHSt, indicating an altered surface/volume of their RBCs. Importantly, the stomatin deficiency reasonably suggests that the activity of RBC membrane channels or transporters that are shown to interact with stomatin in control RBCs [38] could be impacted in OHSt, as previously described for GLUT1 [40] and AE1 [39]. Using frozen/thawed control and OHSt RBCs tested simultaneously, we have demonstrated that cells expressing both PANX1 and stomatin can uptake 5(6)-Carboxyfluorescein and that this uptake is inhibited by three well-characterised inhibitors of PANX1 belonging to different chemical families [55–57]. Moreover, OHSt lacking stomatin was not able to take up the dye. Altogether, the data presented in this study demonstrate that PANX1 is endogenously expressed in RBCs and colocalizes with stomatin which regulates PANX1 activity.

To confirm results obtained with $stom^+$ (control) and $stom^-$ (OHSt) RBCs, we used CRISPR Cas9 to generate K562 $stom^-$ clones exhibiting unchanged endogenous PANX1 expression levels and no modification in their cell volume. In $stom^-$ K562 clones, TO-PRO-3 uptake was measured by flow cytometry after a hypoosmostic (80 mOsm/kg) stimulation of cells. Uptake of this impermeant dye was previously associated with PANX1 activation in HEK293 cells [4]. However, Chui et al. described that the apoptotic process in these cells could be associated with the activation of caspases 3/7, which can cleave the CT tail end of PANX1 and, therefore, irreversibly open the channel [3]. Together with increased permeability to TO-PRO-3 in dying cells [58], this caspase activation can lead to a dye uptake independently of the mechanical stimulation. Unlike these previous studies focusing on the irreversible activation of PANX1, we were interested in investigating the role of stomatin in the caspase-independent activation of PANX1. The apoptotic and dead cells were therefore excluded from the TO-PRO-3 uptake analysis. When only viable cells were tested, the dye uptake was compared between $stom^+$ and $stom^-$ K562 clones, showing a significant decrease in fluorescence in the absence of stomatin. As for CF uptake in RBCs, the TO-PRO-3 uptake in K562 cells was strongly inhibited by 3 different PANX1 inhibitors, clearly indicating that this uptake is due to PANX1 activity. Interestingly, the hypoosmotic stimulation weakly but significantly induced the activation of caspases. However, caspase activation was similar in $stom^-$ clones and could therefore not account for a lower dye

uptake in these cells. Consequently, the stom$^-$ K562 cells appeared less sensitive to the hypotonic stress regarding caspase-independent PANX1 activation.

All these results clearly demonstrate a role of stomatin, shown here to be in the proximity of PANX1, in this alternative small conductance ion-conducting pathway that involves side tunnels [11]. In addition, the recent description of a dynamic conformational change of the N-terminal ends in association with lipid movement *in* and *out* of the pore leading to modifications of the functionality [14] also supports the involvement of the stomatin. Indeed, this major lipid-raft protein at the RBC membrane could play an indirect role in this gating mechanism, probably by maintaining a specific lipid environment around the PANX1 membrane protein. In the future, it will be interesting to carry out ATP release studies on fresh stomatin-deficient RBCs from OHSt patients when they are available, as well as biochemical and structural characterization of native PANX1-stomatin complexes using recently developed detergent-free protocols specially adapted to studying RBC membrane proteins [59].

4. Methods and Materials

4.1. Control and Patient RBCs

Blood from healthy volunteers and 3 OHSt patients with the Phe65Ser RhAG mutation was obtained by venipuncture on the same day ektacytometry was done. All samples containing the whole cells from blood were washed with NaCl 0.9% and frozen in 20% glycerol solution as previously described [39]. These samples were stored by the Centre National de Référence des Groupes Sanguins (CNRGS). To remove glycerol, the blood cells were first washed in glycerol 10%, then in sorbitol 8%, and finally three times in NaCl 0.9%. Finally, RBCs derived from the last pellet were resuspended in ID-CellStab (Biorad, Marnes la Coquette, France) and washed in DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline Gibco, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) before being used in some of the experiments described below.

4.2. RBC Deformability Index and Elongation Index Measurements by Ektacytometry

One hundred µL of blood from each patient was run on an ektacytometer (LoRRca MaxSis, RR Mechatronics®, Zwaag, The Netherlands). Each patient was compared to a matched healthy control. Fresh whole blood cells suspended in a viscous aqueous polyvinylpyrrolidone solution were exposed to a fixed shear stress of 30 Pa, changing the RBC shapes from circular to elliptical, as previously described [60,61]. The deformation of RBC was then monitored as a continuous function of suspending medium osmolality. In particular, the deformability index (DI) and the elongation index (EI) of cells were determined along an osmotic gradient between 100 and 550 mOsm at a constant temperature of 37 °C.

Distinct features of OHSt RBC ektacytometry curve patterns were compared to that of controls, in particular: O_{min}, reflecting the surface area-to-volume ratio and corresponding to the osmolality at which 50% of the RBCs hemolyzed during the regular osmotic resistance test; EI_{max}, reflecting the membrane surface and corresponding to the maximal deformability index (DI) or elongation index (EI); and O′ or hyper points reflecting the hydration state of the cells and corresponding to the osmolality at which RBCs reach 50% of the DI_{max} in the hyper-osmolar area.

4.3. Cell Culture and Transfection

K562 (human erythroleukemia) cell line (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) was grown between 2×10^5 and 1.5×10^6 cells/mL in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) glutamax (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with FBS 10% and Gibco™ Antibiotic-Antimycotic at 37 °C with humid 5% CO_2 atmosphere. Cells were counted by trypan blue counting in a Malassez cell or CASY cell counter (OMNI life science, Bremen, Germany) and used for less than 20 passages.

During the exponential growth phase, 10^6 K562 cells were co-transfected by electroporation using the Amaxa® Cell Line Nucleofector® kit V (Lonza, Basel, Switzerland)

with 1 µg human Stomatin Homology-Directed DNA Repair (HDR) plasmids containing a puromycin resistance gene and 3 µg of human Stomatin CRISPR/Cas9 KO plasmids and 3 µg of human Stomatin CRISPR/Cas9 KO plasmids (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Immediately after the transfection, cells were transferred into 2 mL of culture medium to which 5 µg/mL of puromycin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) were added 24 h post-transfection. The expression of both plasmids was stabilized for 3 weeks by keeping puromycin in the culture medium. Puromycin-resistant cells were then subjected to a limiting dilution cloning in 96-well microplates before expanding for flow cytometry analysis of several clones.

4.4. Stomatin and PANX1 Membrane Expression Analysis by Flow Cytometry

RBCs, diluted in DPBS to 1% hematocrit, were fixed in ice for 20 min in 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France)-0.025% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), washed twice in DPBS and permeabilized in 0.1% n-Octyl-β-D-glucopyranoside (Bachem, Bubendorf, Switzerland) for 10 min at room temperature before incubation with primary antibodies.

K562 cells, diluted in DPBS at 2×10^6 cells/mL, were fixed in ice for 20 min in 4% paraformaldehyde, washed twice in DPBS by centrifugation (1000× *g*, 5 min), and permeabilized in 0.1% saponin for 15 min at room temperature before incubation with primary antibodies.

All cell types were saturated in DPBS-BSA 1% for 1 h at 37 °C. Proteins were stained with 1/200 mouse anti-Stomatin E5 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) or 1/100 rabbit anti-PANX1 polyclonal antibody (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) in DPBS-BSA 0.2% for 1 h at 37 °C. Both antibodies recognize intracellular epitopes.

After 2 successive washes in DPBS by centrifugation (1000× *g*, 5 min), secondary antibodies were coupled for 30 min at room temperature: for RBCs, 1/50 Allophycocyanine (APC) anti-rabbit (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), 1/100 Fluorescein Isothiocyanate (FITC) anti-mouse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), and for cells, 1/50 APC anti-mouse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) and 1/100 FITC anti-rabbit (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) in DPBS-BSA 0.2%. After 2 washes with DPBS, cells were analyzed using a flow cytometer (FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Results were analyzed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, OR, USA).

4.5. Stomatin and PANX1 Membrane Expression Analysis by Western Blot

Ghosts from washed RBCs were obtained by hypotonic lysis for 20 min at 4 °C in 5 mM sodium phosphate buffer pH8. After successive washes by centrifugation (27,000× *g* for 15 min at 4 °C) and removal of the supernatants that contain hemoglobin, the ghost pellets were collected. Protein quantification of these ghosts was obtained using Bicinchoninic acid assay by mixing samples with reagents of the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) for 30 min at 37 °C and measuring absorbance at 562 nm using a plate reader (BioRad, Marnes la Coquette, France).

Ghost samples containing 20 µg of proteins were denaturized in 5X Laemli buffer (5% SDS, 5 mM Tris pH 6.8) with 2 mM β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and were loaded in a 4–12% gradient acrylamide/bis-acrylamide gel (BioRad, Marnes la Coquette, France).

Proteins were transferred from acrylamide gel to nitrocellulose membrane by Trans-Blot Turbo system as preconized by the supplier (BioRad, Marnes la Coquette, France). The membrane was saturated in TBS (Tris Buffered Saline)-milk 5% for 1 h and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies, anti-stomatin E5 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and anti-PANX1 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) 1/1000 in TBS-milk 5%. Washes were carried out in TBS-Tween 0.1 %. HRP-conjugated secondary antibodies (Abliance, Compiègne, France) were incubated for 30 min at room temperature. After final washes in TBS, ECL Prime reagent (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay,

France) was added. The signal was detected by a Chemidoc MP apparatus (Biorad, Marnes la Coquette, France).

4.6. Proximity Ligation Assay

RBCs, previously fixed and permeabilized as described above, were washed twice by centrifugation at 1000× *g* for 5 min in DPBS and saturated for 1 h in Duolink® Blocking Solution (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and incubated with anti-stomatin or/and anti-PANX1 or neither for 1 h at 37 °C.

The proximity ligation assay was made according to the Duolink® flowPLA Mouse PLUS /Rabbit MINUS kit-FarRed protocol (Duolink), using Duolink® PLA Probes (1/5 MINUS anti-rabbit for anti-PANX1 and 1/5 PLUS anti-mouse for anti-Stomatin) and the FarRed Duolink® Fluorescent Detection Reagent.

After 2 washes in DPBS, PLA positive (PLA+) RBCs were determined by detecting FarRed spots using Amnis Imagestream Mk II (Luminex, Minneapolis, MN, USA) and IDEAS software (EMD Millipore, Seattle, WA, USA) for the analysis.

4.7. Dye Uptakes

RBCs were washed twice by centrifugation (450× *g*, 5 min) in basal Krebs solution (in mM, 126 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 2.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4, 1.2 $MgCl_2$, 2.5 $CaCl_2$, pH 7.4, 300 ± 5 mOsm). In the RBC suspension diluted at 0.1% hematocrit, PANX1 was stimulated by substituting basal Krebs with Krebs in which Na+ was replaced by K^+ in the presence of 2 mM of 5(6)-carboxyfluorescein (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) for 10 min. For inhibitions, 20 µM of carbenoxolone (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) or 100 µM of probenecid (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), or 0.1 µM of mefloquine (Bioblocks, San Diego, CA, USA) were added to the RBC suspension incubated for 20 min in the basal Krebs and then for 10 min with 2 mM of 5(6)-carboxyfluorescein in the K^+ Krebs also containing the inhibitors. After 3 washes, carboxyfluorescein fluorescence in control and OHSt RBCs were analysed using a flow cytometer (FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

In K562 transfected clones diluted at 1 × 10^6 cells/mL in Tyrode Buffer (in mM, 135 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 5 D-glucose, 1 $MgCl_2$, 1.5 $CaCl_2$, pH 7.4, 300 ± 5 mOsm), PANX1 channel, previously blocked or not, was then activated by adding 1/3 volume of water corresponding to a decrease of 80 mOsm. The inhibition was performed by adding 100 µM of carbenoxolone (or 500 µM of probenecid or 0.5 µM of mefloquine) 20 min beforehand. Non-viable cells were stained with Sytox blue (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France), and apoptotic cells were stained with Lactadherin FITC (Haematologic Technologies, Essex Junction VT, USA) to exclude them from the analysis of dye uptake. After 5 min staining in 1/5000 TO-PRO-3 (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France), the intensity of TO-PRO-3 fluorescence was analysed for intact cells (Sytox−/Lactadherin−) using a flow cytometer (FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Three different measurements were performed for each clone and averaged before comparison.

In parallel, after the same hypoosmotic stimulation, caspase activation was evaluated by adding 1 µM of NucView 405 Caspase-3 substrate (Biotium, Fremont, CA, USA) and incubating at room temperature for 20 min.

4.8. ATP Release and Hemolysis

Immediately after fresh blood collection, plasma, platelets, and leukocytes were removed by centrifugation (900× *g* at 20 °C for 3 min). The supernatant and buffy coat were removed and discarded. Isolated red blood cells (RBCs) were resuspended and washed three times in an isoosmotic medium (in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 2.5 Na_2HPO_4, 1.50 KH_2PO_4, 1.32 $CaCl_2$, 1.91 $MgSO_4$, 5 glucose, pH 7.4 at 25 °C, 300 mOsM) and supplemented with 0.1% BSA. Packed RBCs were resuspended in an isoosmotic medium to the corresponding final hematocrit.

Thawed RBCs were treated with Rejuvesol (Zimmer Biomet, Warsaw, IN, USA), diluted 6 times in DPBS with 5mM of Glucose (Sigma, St Quentin Fallavier, France) for 1 h at 37 °C, as previously described [44].

For ATP measurements, all reagents were of analytical grade. Bovine serum albumin (BSA), carbenoxolone, glucose, firefly luciferase (EC 1.13.12.7), and ATP were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). D-luciferin was purchased from Invitrogen/ Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

Total extracellular ATP (eATP) measurements were performed by online luminometry using the luciferin-luciferase reaction as described previously [16,23,24]. Briefly, 3×10^6 RBCs were incubated in 50 µL of luciferin-luciferase reaction mix prepared in iso- or hypoosmotic (in mM: 113.6 NaCl, 2.7 KCl, 2.5 Na_2HPO_4, 1.50 KH_2PO_4, 1.32 $CaCl_2$, 1.91 $MgSO_4$, 5 glucose, pH 7.4 at 25 °C, 240 mOsm/kg) media. Experiments were performed with or without preincubation (20 min) of 100 µM CBX. Light emission was monitored for 20 min and then transformed into eATP concentration using a calibration curve. That is, at the end of each experiment, ATP from 1 to 32 µM was sequentially added to the assay medium from a stock solution of pure ATP dissolved in iso- or hypoosmotic medium. Results were expressed as eATP in pmol/10^6 cells at 20 min post-stimulus.

Hemolysis was assessed in eATP measurement-paired samples by an enzymatic method described by Vazquez et al. [62] (Figure S2). Results were expressed as a percentage of hemolyzed RBCs (% Hemolysis). Hemoglobin concentration was used to estimate lytic eATP. The difference between total eATP and lytic eATP was calculated and denoted as non-lytic ATP.

4.9. PS Exposure and Caspase Activity on RBCs

To induce PS exposure and caspase activation, 1 µL of RBCs from 5 different donors was washed twice and resuspended at 0.1% hematocrit in RBC-2 buffer (in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 2.5 Na_2HPO_4, 1.50 KH_2PO_4, 1.32 $CaCl_2$, 1.91 $MgSO_4$, 5 glucose, pH 7.4 at 25 °C, 300 mOsm) with Fenton solution (2 mM of H_2O_2 and 0.3 mM of $FeSO_4$) during 1 h at RT. 1 µL of RBCs was resuspended in basal RBC-2 (300 mOsm/kg) or hypotonic RBC-2 (in mM: 113.6 NaCl, 2.7 KCl, 2.5 Na_2HPO_4, 1.50 KH_2PO_4, 1.32 $CaCl_2$, 1.91 $MgSO_4$, 5 glucose, pH 7.4 at 25 °C, 240 mOsm/kg) at 0.1% hematocrit. RBCs resuspended in the three different conditions (basal with Fenton, basal or hypotonic without Fenton) were stained with FLICA 660 caspase3/7 at a 1:60 ratio (*v/v*) during 20 min at 37 °C. After 2 washes in PBS-BSA 0.2%, RBCs were stained with Lactadherin-FITC 1/100 for 5 min at RT, and samples were analyzed by flow cytometry.

4.10. Statistics

Data were statistically analyzed using Prism Graph Pad 7.0 software (San Diego, CA, USA). Corresponding tests were indicated in the legend of each figure, as well as the number of independent experiments (N) used to estimate the mean and standard error of the mean. *p* values (>0.05: ns, ≤0.05: *, ≤0.01: **, ≤0.001: *** and ≤0.0001: ****) were obtained with a confidence interval of 95%.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23169401/s1. Reference [62] is cited in the supplementary materials.

Author Contributions: Conceptualization, S.R., I.M.-C.; Methodology, S.R., S.G., M.D., M.F.L.D.; Validation, M.A.O., I.M.-C.; Formal analysis, S.R., S.G., M.F.L.D., M.D., I.M.-C.; Investigation, S.R., S.G., M.D., M.F.L.D., I.M.-C.; Resources, P.J.S., M.A.O., I.M.-C.; Data curation, S.R., S.G., M.F.L.D.; Writing original draft preparation, S.R., M.F.L.D., P.J.S., M.A.O., I.M.-C.; Writing review and editing, S.R., M.A.O., I.M.-C.; Project administration, M.A.O., I.M.-C.; Funding acquisition, I.M.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: P.J.S. was funded by PIP 11220200101013C0, UBACYT 20820160401330BA, and Guest Researchers program from Université Paris Cité. M.F.L.D. was funded by PICT 201961430.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Comité d'Ethique de l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS) DC-2016-2872.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Experimental data of the results within this work would be available under request.

Acknowledgments: S.R. received an MSc scholarship from Club du Globule Rouge et du Fer and a Ph.D. scholarship from Collectivité Territoriale de Martinique. M.F.L.D. and P.J.S. are career researchers at Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). M.A.O. is a full professor at University Paris Cité. I.M.-C. is a career researcher at the INSERM. We thank our native English-speaking colleague Alice Tomlinson for the English revision of the manuscript.

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

References

1. Penuela, S.; Gehi, R.; Laird, D.W. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 15–22. [CrossRef]
2. Sosinsky, G.E.; Boassa, D.; Dermietzel, R.; Duffy, H.S.; Laird, D.W.; MacVicar, B.; Naus, C.C.; Penuela, S.; Scemes, E.; Spray, D.C.; et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels* **2011**, *5*, 193–197. [CrossRef]
3. Chekeni, F.B.; Elliott, M.R.; Sandilos, J.K.; Walk, S.F.; Kinchen, J.M.; Lazarowski, E.R.; Armstrong, A.J.; Penuela, S.; Laird, D.W.; Salvesen, G.S.; et al. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* **2010**, *467*, 863–867. [CrossRef]
4. Chiu, Y.H.; Jin, X.; Medina, C.B.; Leonhardt, S.A.; Kiessling, V.; Bennett, B.C.; Shu, S.; Tamm, L.K.; Yeager, M.; Ravichandran, K.S.; et al. A quantized mechanism for activation of pannexin channels. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14324. [CrossRef]
5. Sandilos, J.K.; Chiu, Y.H.; Chekeni, F.B.; Armstrong, A.J.; Walk, S.F.; Ravichandran, K.S.; Bayliss, D.A. Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 11303–11311. [CrossRef]
6. Deng, Z.; He, Z.; Maksaev, G.; Bitter, R.M.; Rau, M.; Fitzpatrick, J.A.J.; Yuan, P. Cryo-EM structures of the ATP release channel pannexin 1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2020**, *27*, 373–381. [CrossRef]
7. Jin, Q.; Zhang, B.; Zheng, X.; Li, N.; Xu, L.; Xie, Y.; Song, F.; Bhat, E.A.; Chen, Y.; Gao, N.; et al. Cryo-EM structures of human pannexin 1 channel. *Cell Res.* **2020**, *30*, 449–451. [CrossRef]
8. Michalski, K.; Syrjanen, J.L.; Henze, E.; Kumpf, J.; Furukawa, H.; Kawate, T. The Cryo-EM structure of pannexin 1 reveals unique motifs for ion selection and inhibition. *eLife* **2020**, *9*, e54670. [CrossRef]
9. Mou, L.; Ke, M.; Song, M.; Shan, Y.; Xiao, Q.; Liu, Q.; Li, J.; Sun, K.; Pu, L.; Guo, L.; et al. Structural basis for gating mechanism of Pannexin 1 channel. *Cell Res.* **2020**, *30*, 452–454. [CrossRef]
10. Qu, R.; Dong, L.; Zhang, J.; Yu, X.; Wang, L.; Zhu, S. Cryo-EM structure of human heptameric Pannexin 1 channel. *Cell Res.* **2020**, *30*, 446–448. [CrossRef]
11. Ruan, Z.; Orozco, I.J.; Du, J.; Lu, W. Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature* **2020**, *584*, 646–651. [CrossRef]
12. Mim, C.; Perkins, G.; Dahl, G. Structure versus function: Are new conformations of pannexin 1 yet to be resolved? *J. Gen. Physiol.* **2021**, *153*, e202012754. [CrossRef]
13. Chiu, Y.H.; Schappe, M.S.; Desai, B.N.; Bayliss, D.A. Revisiting multimodal activation and channel properties of Pannexin 1. *J. Gen. Physiol.* **2018**, *150*, 19–39. [CrossRef]
14. Kuzuya, M.; Hirano, H.; Hayashida, K.; Watanabe, M.; Kobayashi, K.; Terada, T.; Mahmood, M.I.; Tama, F.; Tani, K.; Fujiyoshi, Y.; et al. Structures of human pannexin-1 in nanodiscs reveal gating mediated by dynamic movement of the N terminus and phospholipids. *Sci. Signal.* **2022**, *15*, eabg6941. [CrossRef]
15. Bao, L.; Locovei, S.; Dahl, G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* **2004**, *572*, 65–68. [CrossRef]
16. Leal Denis, M.F.; Lefevre, S.D.; Alvarez, C.L.; Lauri, N.; Enrique, N.; Rinaldi, D.E.; Gonzalez-Lebrero, R.; Vecchio, L.E.; Espelt, M.V.; Stringa, P.; et al. Regulation of extracellular ATP of human erythrocytes treated with alpha-hemolysin. Effects of cell volume, morphology, rheology and hemolysis. *Biochim. Biophys Acta Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 896–915. [CrossRef]
17. Locovei, S.; Wang, J.; Dahl, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 239–244. [CrossRef]
18. Alvarez, C.L.; Chene, A.; Semblat, J.P.; Gamain, B.; Lapoumeroulie, C.; Fader, C.M.; Hattab, C.; Sevigny, J.; Denis, M.F.L.; Lauri, N.; et al. Homeostasis of extracellular ATP in uninfected RBCs from a Plasmodium falciparum culture and derived microparticles. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2022**, *1864*, 183980. [CrossRef]

19. Keller, A.S.; Diederich, L.; Panknin, C.; DeLalio, L.J.; Drake, J.C.; Sherman, R.; Jackson, E.K.; Yan, Z.; Kelm, M.; Cortese-Krott, M.M.; et al. Possible roles for ATP release from RBCs exclude the cAMP-mediated Panx1 pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2017**, *313*, C593–C603. [CrossRef]
20. Locovei, S.; Bao, L.; Dahl, G. Pannexin 1 in erythrocytes: Function without a gap. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 7655–7659. [CrossRef]
21. Qiu, F.; Wang, J.; Spray, D.C.; Scemes, E.; Dahl, G. Two non-vesicular ATP release pathways in the mouse erythrocyte membrane. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 3430–3435. [CrossRef] [PubMed]
22. Sridharan, M.; Adderley, S.P.; Bowles, E.A.; Egan, T.M.; Stephenson, A.H.; Ellsworth, M.L.; Sprague, R.S. Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H1146–H1152. [CrossRef] [PubMed]
23. Leal Denis, M.F.; Incicco, J.J.; Espelt, M.V.; Verstraeten, S.V.; Pignataro, O.P.; Lazarowski, E.R.; Schwarzbaum, P.J. Kinetics of extracellular ATP in mastoparan 7-activated human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 4692–4707. [CrossRef]
24. Montalbetti, N.; Leal Denis, M.F.; Pignataro, O.P.; Kobatake, E.; Lazarowski, E.R.; Schwarzbaum, P.J. Homeostasis of extracellular ATP in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38397–38407. [CrossRef]
25. Qiu, F.; Dahl, G. A permeant regulating its permeation pore: Inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2009**, *296*, C250–C255. [CrossRef]
26. Kirby, B.S.; Sparks, M.A.; Lazarowski, E.R.; Lopez Domowicz, D.A.; Zhu, H.; McMahon, T.J. Pannexin 1 channels control the hemodynamic response to hypoxia by regulating O2-sensitive extracellular ATP in blood. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2021**, *320*, H1055–H1065. [CrossRef]
27. Zhan, H.; Moore, C.S.; Chen, B.; Zhou, X.; Ma, X.M.; Ijichi, K.; Bennett, M.V.; Li, X.J.; Crocker, S.J.; Wang, Z.W. Stomatin inhibits pannexin-1-mediated whole-cell currents by interacting with its carboxyl terminal. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39489. [CrossRef]
28. Brand, J.; Smith, E.S.; Schwefel, D.; Lapatsina, L.; Poole, K.; Omerbasic, D.; Kozlenkov, A.; Behlke, J.; Lewin, G.R.; Daumke, O. A stomatin dimer modulates the activity of acid-sensing ion channels. *EMBO J.* **2012**, *31*, 3635–3646. [CrossRef]
29. Langhorst, M.F.; Reuter, A.; Stuermer, C.A. Scaffolding microdomains and beyond: The function of reggie/flotillin proteins. *Cell. Mol. Life Sci.CMLS* **2005**, *62*, 2228–2240. [CrossRef]
30. Tavernarakis, N.; Driscoll, M.; Kyrpides, N.C. The SPFH domain: Implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 425–427. [CrossRef]
31. Lapatsina, L.; Brand, J.; Poole, K.; Daumke, O.; Lewin, G.R. Stomatin-domain proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **2012**, *91*, 240–245. [CrossRef] [PubMed]
32. Klipp, R.C.; Cullinan, M.M.; Bankston, J.R. Insights into the molecular mechanisms underlying the inhibition of acid-sensing ion channel 3 gating by stomatin. *J. Gen. Physiol.* **2020**, *152*, e201912471. [CrossRef] [PubMed]
33. Appelman, M.D.; Robin, M.J.D.; Vogels, E.W.M.; Wolzak, C.; Vos, W.G.; Vos, H.R.; Van Es, R.M.; Burgering, B.M.T.; Van de Graaf, S.F.J. The Lipid Raft Component Stomatin Interacts with the Na^+ Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) and Modulates Bile Salt Uptake. *Cells* **2020**, *9*, 986. [CrossRef] [PubMed]
34. Wilkinson, D.K.; Turner, E.J.; Parkin, E.T.; Garner, A.E.; Harrison, P.J.; Crawford, M.; Stewart, G.W.; Hooper, N.M. Membrane raft actin deficiency and altered Ca2+-induced vesiculation in stomatin-deficient overhydrated hereditary stomatocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 125–132. [CrossRef] [PubMed]
35. Hiebl-Dirschmied, C.M.; Adolf, G.R.; Prohaska, R. Isolation and partial characterization of the human erythrocyte band 7 integral membrane protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1065*, 195–202. [CrossRef]
36. Hiebl-Dirschmied, C.M.; Entler, B.; Glotzmann, C.; Maurer-Fogy, I.; Stratowa, C.; Prohaska, R. Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human erythrocyte band 7 integral membrane protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1090*, 123–124. [CrossRef]
37. Stewart, G.W.; Hepworth-Jones, B.E.; Keen, J.N.; Dash, B.C.; Argent, A.C.; Casimir, C.M. Isolation of cDNA coding for an ubiquitous membrane protein deficient in high Na+, low K^+ stomatocytic erythrocytes. *Blood* **1992**, *79*, 1593–1601. [CrossRef]
38. Rungaldier, S.; Oberwagner, W.; Salzer, U.; Csaszar, E.; Prohaska, R. Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band 3/SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 956–966. [CrossRef]
39. Genetet, S.; Desrames, A.; Chouali, Y.; Ripoche, P.; Lopez, C.; Mouro-Chanteloup, I. Stomatin modulates the activity of the Anion Exchanger 1 (AE1, SLC4A1). *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46170. [CrossRef]
40. Montel-Hagen, A.; Kinet, S.; Manel, N.; Mongellaz, C.; Prohaska, R.; Battini, J.L.; Delaunay, J.; Sitbon, M.; Taylor, N. Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. *Cell* **2008**, *132*, 1039–1048. [CrossRef]
41. Bruce, L.J. Hereditary stomatocytosis and cation-leaky red cells—Recent developments. *Blood Cells Mol. Dis.* **2009**, *42*, 216–222. [CrossRef] [PubMed]
42. Caulier, A.; Rapetti-Mauss, R.; Guizouarn, H.; Picard, V.; Garcon, L.; Badens, C. Primary red cell hydration disorders: Pathogenesis and diagnosis. *Int. J. Lab. Hematol.* **2018**, *40* (Suppl. S1), 68–73. [CrossRef] [PubMed]
43. Gallagher, P.G. Disorders of erythrocyte hydration. *Blood* **2017**, *130*, 2699–2708. [CrossRef] [PubMed]
44. Marin, M.; Roussel, C.; Dussiot, M.; Ndour, P.A.; Hermine, O.; Colin, Y.; Gray, A.; Landrigan, M.; Le Van Kim, C.; Buffet, P.A.; et al. Metabolic rejuvenation upgrades circulatory functions of red blood cells stored under blood bank conditions. *Transfusion* **2021**, *61*, 903–918. [CrossRef]
45. Gautier, E.F.; Ducamp, S.; Leduc, M.; Salnot, V.; Guillonneau, F.; Dussiot, M.; Hale, J.; Giarratana, M.C.; Raimbault, A.; Douay, L.; et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep.* **2016**, *16*, 1470–1484. [CrossRef]

46. Boassa, D.; Ambrosi, C.; Qiu, F.; Dahl, G.; Gaietta, G.; Sosinsky, G. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31733–31743. [CrossRef]
47. Salzer, U.; Prohaska, R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* **2001**, *97*, 1141–1143. [CrossRef]
48. Dahl, G. The Pannexin1 membrane channel: Distinct conformations and functions. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 3201–3209. [CrossRef]
49. Marginedas-Freixa, I.; Alvarez, C.L.; Moras, M.; Leal Denis, M.F.; Hattab, C.; Halle, F.; Bihel, F.; Mouro-Chanteloup, I.; Lefevre, S.D.; Le Van Kim, C.; et al. Human erythrocytes release ATP by a novel pathway involving VDAC oligomerization independent of pannexin-1. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11384. [CrossRef]
50. Eber, S.W.; Lande, W.M.; Iarocci, T.A.; Mentzer, W.C.; Hohn, P.; Wiley, J.S.; Schroter, W. Hereditary stomatocytosis: Consistent association with an integral membrane protein deficiency. *Br. J. Haematol.* **1989**, *72*, 452–455. [CrossRef]
51. Lande, W.M.; Thiemann, P.V.; Mentzer, W.C., Jr. Missing band 7 membrane protein in two patients with high Na, low K erythrocytes. *J. Clin. Investig.* **1982**, *70*, 1273–1280. [CrossRef] [PubMed]
52. Zarkowsky, H.S.; Oski, F.A.; Sha'afi, R.; Shohet, S.B.; Nathan, D.G. Congenital hemolytic anemia with high sodium, low potassium red cells. I. Studies of membrane permeability. *N. Engl. J. Med.* **1968**, *278*, 573–581. [CrossRef] [PubMed]
53. Fricke, B.; Argent, A.C.; Chetty, M.C.; Pizzey, A.R.; Turner, E.J.; Ho, M.M.; Iolascon, A.; von During, M.; Stewart, G.W. The "stomatin" gene and protein in overhydrated hereditary stomatocytosis. *Blood* **2003**, *102*, 2268–2277. [CrossRef] [PubMed]
54. Llaudet-Planas, E.; Vives-Corrons, J.L.; Rizzuto, V.; Gomez-Ramirez, P.; Sevilla Navarro, J.; Coll Sibina, M.T.; Garcia-Bernal, M.; Ruiz Llobet, A.; Badell, I.; Velasco-Puyo, P.; et al. Osmotic gradient ektacytometry: A valuable screening test for hereditary spherocytosis and other red blood cell membrane disorders. *Int. J. Lab. Hematol.* **2018**, *40*, 94–102. [CrossRef] [PubMed]
55. Anderson, C.L.; Thompson, R.J. Intrapore lipids hydrophobically gate pannexin-1 channels. *Sci. Signal.* **2022**, *15*, eabn2081. [CrossRef] [PubMed]
56. Iglesias, R.; Spray, D.C.; Scemes, E. Mefloquine blockade of Pannexin1 currents: Resolution of a conflict. *Cell Commun. Adhes.* **2009**, *16*, 131–137. [CrossRef] [PubMed]
57. Navis, K.E.; Fan, C.Y.; Trang, T.; Thompson, R.J.; Derksen, D.J. Pannexin 1 Channels as a Therapeutic Target: Structure, Inhibition, and Outlook. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 2163–2172. [CrossRef]
58. Jiang, L.; Tixeira, R.; Caruso, S.; Atkin-Smith, G.K.; Baxter, A.A.; Paone, S.; Hulett, M.D.; Poon, I.K. Monitoring the progression of cell death and the disassembly of dying cells by flow cytometry. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 655–663. [CrossRef]
59. Desrames, A.; Genetet, S.; Delcourt, M.P.; Goossens, D.; Mouro-Chanteloup, I. Detergent-free isolation of native red blood cell membrane complexes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2020**, *1862*, 183126. [CrossRef]
60. Clark, M.R.; Mohandas, N.; Shohet, S.B. Osmotic gradient ektacytometry: Comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood* **1983**, *61*, 899–910. [CrossRef]
61. Mohandas, N.; Clark, M.R.; Health, B.P.; Rossi, M.; Wolfe, L.C.; Lux, S.E.; Shohet, S.B. A technique to detect reduced mechanical stability of red cell membranes: Relevance to elliptocytic disorders. *Blood* **1982**, *59*, 768–774. [CrossRef] [PubMed]
62. Vazquez, A.; Tudela, J.; Varon, R.; Garcia-Canovas, F. Determination of hemoglobin through its peroxidase activity on chlorpromazine. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1991**, *23*, 45–52. [CrossRef]

3. FIGURES SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE

Les paramètres hématologiques des GRs des patients OHSt ont été déterminés après prélèvements sanguins par des équipes cliniques et avant l'acheminent des échantillons de sang dans le laboratoire. Par rapport à des GRs témoins, le volume globulaire moyen (VGM ou MCV en anglais) est augmenté d'environ 30% *(Supplementary Table 1)*, avec une moyenne de 138 fL pour les GRs de patient OHSt. L'hyperhydratation est également caractérisée par la diminution de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH ou MCHC en anglais) *(Supplementary Table 1)*, avec en moyenne 268 g/L de sang contre 345 g/L en moyenne pour du sang témoin. Enfin, la présence de réticulocytes a été mesurée pour deux patients : ces cellules présentes dans la circulation reflètent d'un mécanisme pour compenser l'anémie hémolytique en relation avec la fragilité des GRs.

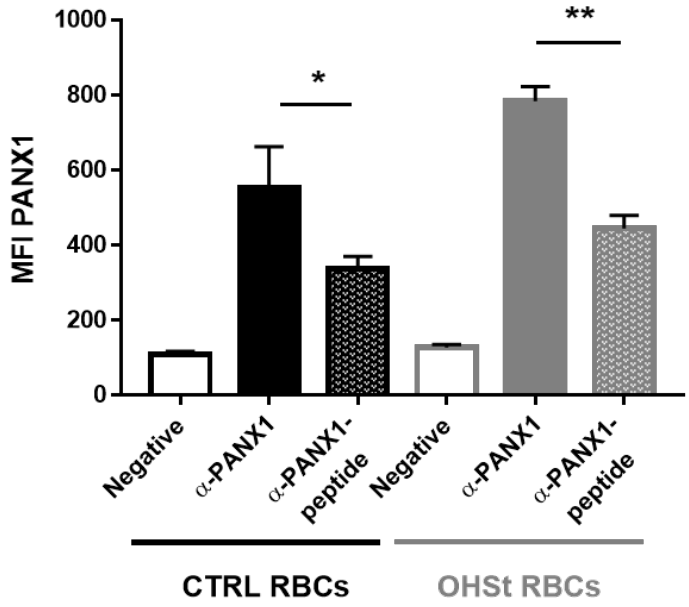
Supplementary Table 1: Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) and Reticulocytes values of the RBCs from the three OHSt patients and controls (CTRL)

	Origin	**MCV**	**MCHC (g/l)**	**Reticulocytes (G/l)**
CTRL	CNRGS	80-100	330-360	20-120
OHSt 1	Nancy	132.5	273	269
OHSt 2	Grenoble	138	284	242.7
OHSt 3	Toulouse	144	247	ND

Afin de valider l'utilisation de l'anticorps anti-PANX1 produit par Alomone et utilisé en cytométrie en flux, un peptique bloquant produit par le même fournisseur a été utilisé avec l'anticorps sur les GRs témoins et OHSt. L'incubation des GRs témoins fixés et perméabilisés avec l'anticorps anti-PANX1 (α-PANX1) a permis la détection en cytométrie en flux d'une MFI de 553 contre 106.7 sans anticorps primaire (Figure S1, gauche). Quand l'anticorps primaire a été préalablement incubé avec le peptide, la MFI diminuait significativement à 335.7. De même pour les GRs OHSt fixés et perméabilisés, l'incubation avec l'anticorps primaire montre une MFI de 783 contre 126 sans anticorps

primaire en cytométrie en flux, et la préincubation de l'anticorps primaire avec le peptide entraine une diminution significative de la MFI à 443.3 (Figure S1, droite).

Figure S1: PANX1 expression in control and OHSt RBC by flow cytometry



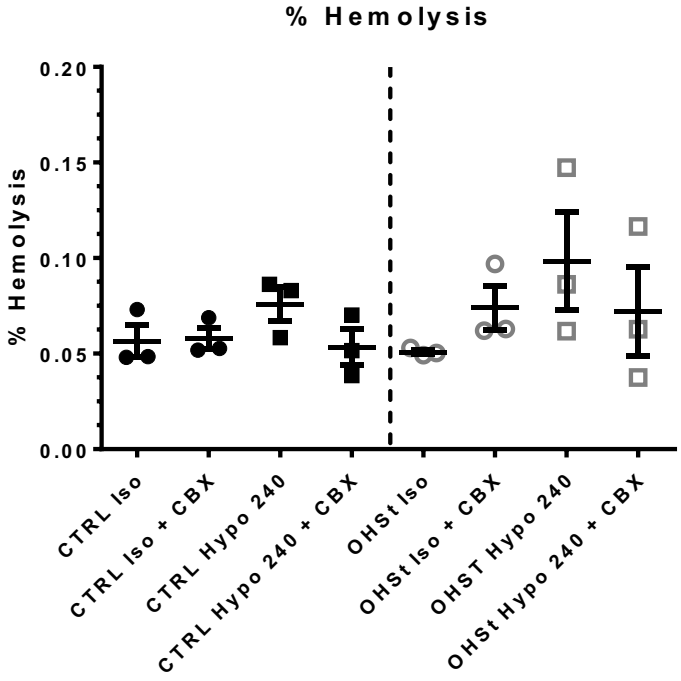
Prior to pannexin staining, 18-31 amino acid peptide of PANX1 (Alomone) were incubated 1h with α-PANX1 with a ratio of 1:10 (m/m). Two-way ANOVA test (paired for same population) * p values 0.0398, et ** p value 0.0079

De précédents travaux sur le relargage d'ATP par la PANX1 à la suite de la stimulation par choc hyposmotique dans les GRs ont mis en évidence l'implication de l'hémolyse dans ce processus (Sikora et al. 2014). L'hémolyse des GRs témoins et OHSt a été contrôlée afin de déduire la part d'ATP lytique de l'ATP relargué par la PANX1.

En solution isotonique (iso, 300 mOsms), l'hémolyse des GRs témoins était de 0.06% et de 0.058% avec l'inhibiteur CBX. En solution hyposmotique (Hypo, 240 mOsms), l'hémolyse était de 0,076% et avec l'inhibiteur de la PANX1, CBX de 0.053% (figure S2, gauche).

Pour les GRs OHSt, en solution isotonique (iso, 300 mOsms) l'hémolyse était de 0.051% et 0.074% avec la CBX. En solution hyposmotique l'hémolyse était de 0.098% et avec la CBX de 0.072% (figure S2, droite).

Figure S2: Control and OHSt RBC hemolysis in different osmotic conditions



For each sample taken to assess eATP by luminometry, a parallel sample was taken to assess hemolysis. The RBCs were processed as described above except that the luciferin-luciferase has not been added. After 20 min incubation with or without CBX, samples were centrifuged at 12 600×g at 20 °C for 30 s and the presence of free hemoglobin in the supernatant was determined by an enzymatic method to detect microquantities of free hemoglobin as described by Vazquez et al. [1]. Results were expressed as percentage of total hemoglobin in the RBCs present in the sample.

4. TRAVAUX ET FIGURES SUPPLEMENTAIRES NON PUBLIES

La réjuvénation a été utilisée sur les GRs décongelés pour rétablir des concentrations en ATP intracellulaire (ATP_{intra}) équivalentes à celles de GR frais. Les valeurs d'ATP_{intra} des GRs témoins et OHSt ont été mesurées par bioluminescence après la lyse des cellules dans le photomultiplicateur avec 50 µM de digitonine (***Figure 26***).

Comme attendu, pour les GR témoins, la concentration en ATP_{intra} initialement de 1.67 pmoles pour $1x10^6$ GRs après décongélation (rouge vif), augmentait à 4.54 pmoles pour $1x10^6$ GRs après réjuvénation (rouge écarlate). De même pour les GRs OHSt, la concentration d'ATP_{intra} initialement de 2.15 pmoles d'ATP pour $1x10^6$ GRs (bleu ciel) augmentait 9.3 pmoles d'ATP pour $1x10^6$ GRs (bleu marine). La restauration des concentrations en ATP_{intra} est donc possible grâce à la réjuvénation, même après décongélation des culots globulaire stockés en azote liquide, pour les GRs témoins comme les GRs OHSt.

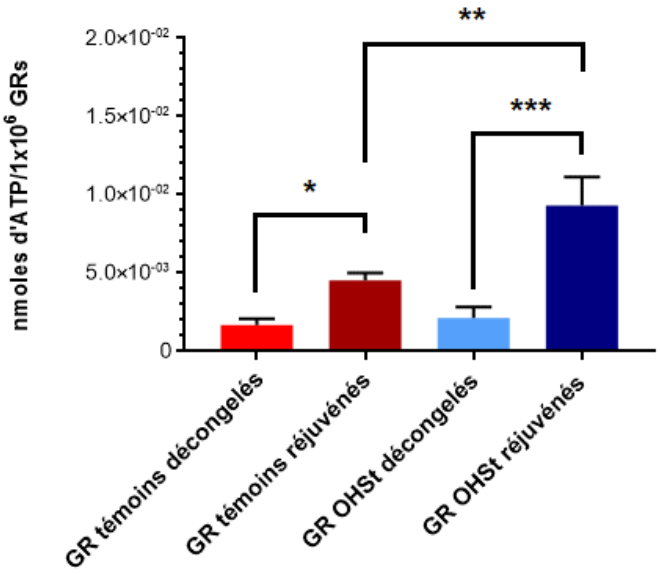


Figure 26 *: Effet de la réjuvénation des GRs témoins (rouge) et OHSt (bleu) sur la concentration intracellulaire en ATP. Test statistique one-way ANOVA, * : p value <0.05, ** : p value <0.01, *** : p value <0.005*

Afin d'induire l'influx de 5,6-CF dans le GRs, Locovei et al., avait remplacé le NaCl contenu dans le tampon Krebs par du KGluconate (KGlu) pouvant induire la dépolarisation de la membrane du GR.

En reprenant la technique de perméabilité de la 5(6)-CF adaptée à la cytométrie en flux telle que publiée dans l'article Rougé et al, 2022, le tampon Krebs KCl a été substitué par du tampon Krebs KGlu afin d'activer la PANX1.

La fluorescence moyenne de la 5(6)-CF contenue dans les GRs témoins mesurée à 182 dans le tampon basal double significativement avec un MFI de 369 dans le tampon KGlu, comme attendu pour une activation de PANX1. De plus, en utilisant l'inhibiteur de PANX1, la carbenoxolone (CBX), la fluorescence des GRs témoins diminue significativement à une MFI de 223.7. Après stimulation par le tampon KGlu, la fluorescence intracellulaire des GRs OHSt double également significativement passant d'une MFI de 273.3 à 567.3. Cependant, malgré l'inhibition de PANX1 par la CBX, la fluorescence ne revient pas à des valeurs basales puisqu'elle est de 690. Donc la perméabilité de la CF dans les GRs OHSt ne semble pas dépendante de PANX1 (***Figure 27* A**).

Pour comprendre ce qui se passe dans cette voie d'activation de PANX1, la taille des GRs a été analysée en parallèle en comparant les valeurs d'intensité de dispersion vers l'avant (Foward SCatter, FSC), relatif à la taille de la cellule. Ces données ont été acquises en cytométrie en flux au cours des expériences de mesure de fluorescence de la CF (***Figure 27* B**).

En condition basale, la moyenne de FSC des GRs témoins (89 703) est inférieure à celles des GRs OHSt (123 916), ce qui correspond bien au volume d'environ 1/3 supérieur de ces GRs comparés aux GRs témoins. Les valeurs moyennes de FSC des GRs témoins ne varient pas quand les GRs sont dans le tampon KGlu (86 851), même en présence de l'inhibiteur CBX (88 543). Cependant, pour les GRs OHSt, les valeurs de FSC des GRs en tampon Kglu diminuent significativement en présence (106 841) ou non de l'inhibiteur CBX (102 245). Il y aurait donc des modifications de la perméabilité des ions, provoquant la diminution du volume des GRs OHSt en tampon Kgluconate. Cette diminution serait

en corrélation avec l'augmentation de la fluorescence de la CF intracellulaire des GRs OHSt en tampon KGlu.

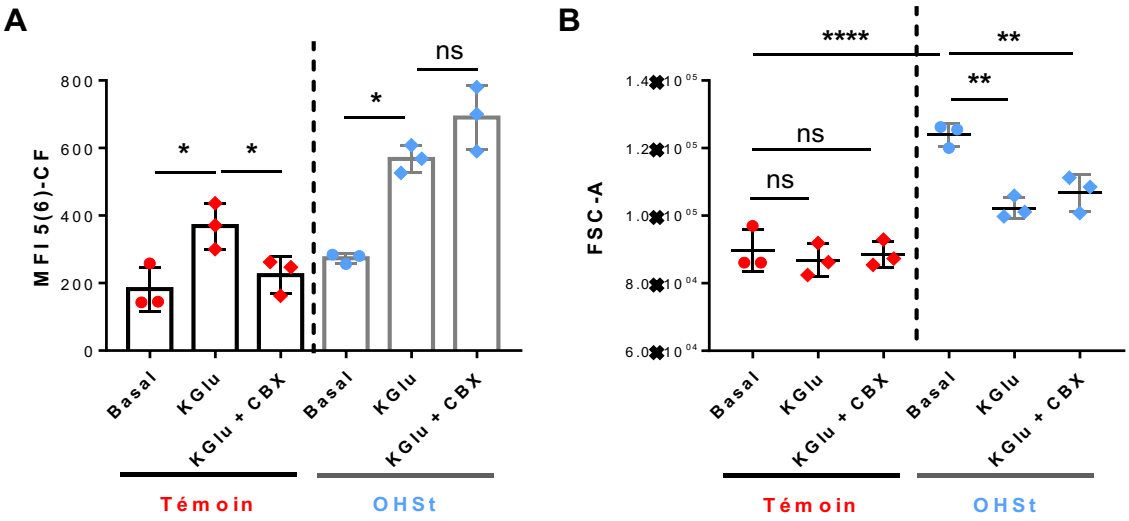


Figure 27 *: Activation de la PANX1 dans les GRs Témoins (rouge) et OHSt (bleu) après stimulation par le Kgluconate (Kglu, losange) ou avec une incubation préalable avec 20 µM de CBX, mesurée en cytométrie en flux (**A**) Fluorescence intracellulaire moyenne de la sonde 5(6)-CarboxyFluoresceine (MFI 5(6)-CF). (**B**) Dispersion de la lumière proportionnelle à la taille des évènements par suite du passage des GRs dans les tampons Krebs. Test two-way ANOVA, ns : non significatif, * : p value <0.05, ** : p value <0.01, **** : p value <0.001*

Par ailleurs, la sonde $DiBaC_4(3)$ qui permet de suivre le changement de potentiel de membrane a été utilisée dans les deux conditions de stimulation de PANX1, KGlu et KCl. A 20 minutes, on observe, pour les GRs témoins, une fluorescence plus importante (et donc l'augmentation du potentiel membranaire) quand le GR est dans le tampon KGlu (MFI de 1534) et KCl (MFI de 1553) en comparaison avec le tampon NaCl (MFI de 1340) (***Figure 28*** **A**). On observe le même comportement pour les GRs OHSt testés en condition KCl (2037), en comparaison avec les conditions basales NaCl (1711) à t= 20 minutes. Cependant, dans le tampon KGlu, le potentiel membranaire ne semble pas changer puisque la fluorescence de la DiBAC n'augmente pas (MFI de 1804 à t= 20 minutes) (***Figure 28*** **B**).

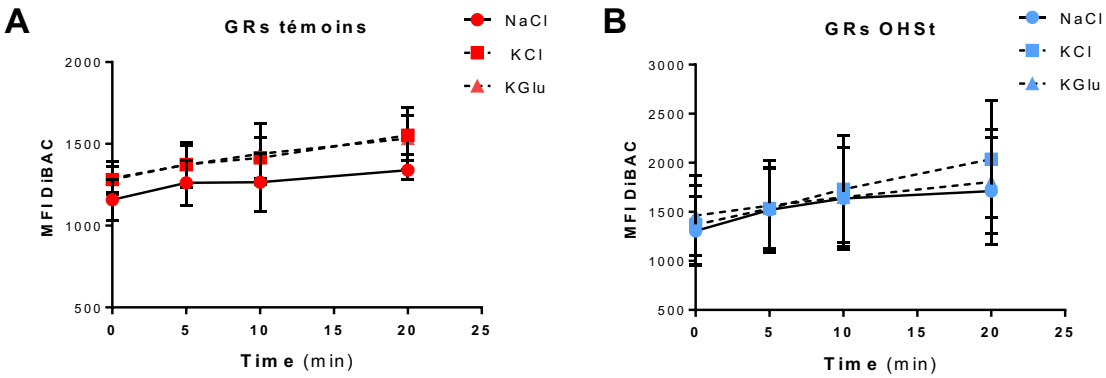


Figure 28 *: Cinétique de la dépolarisation des GRs témoins (symboles rouges en (A)) et OHSt (symboles bleus en (B)) induit par augmentation du K^+ extracellulaire (traits discontinus) des tampons Krebs KCl (carré) et KGlu (triangle) observée par fluorescence de la $DiBAC_4(3)$ en cytométrie en flux*

5. CONCLUSION ET DISCUSSION DU CHAPITRE 1

Expression du canal ionique PANX1 à la membrane du GR humain

L'expression de la PANX1 a été démontrée à l'aide de plusieurs anticorps dirigés contre plusieurs épitopes de la protéine dans les GRs humains et murins (Keller et al. 2017; Locovei, Bao, et Dahl 2006; F. Qiu et Dahl 2009). Sur des GRs d'un donneur témoin, nous avons également utilisé plusieurs anticorps reconnaissant des épitopes intra et extracellulaires. Par ailleurs, les données d'études protéomiques montrent la présence de la PANX1 dans les cellules de la lignée K-562, au nombre de 3 388 300 copies/cellule (Gautier et al. 2016). Cependant, cette même étude ne fait état de sa présence dans des précurseurs érythroïdes que dans les cinq premiers jours de différenciation et ce, dans seulement une des trois expériences d'érythropoïèse réalisées à partir de CD34+.

La PANX1 a d'abord été identifiée comme une protéine participant aux jonctions intercellulaires (gap jonction). Elle présente une structure de canal à large pore laissant préférentiellement passer des espèces anioniques de l'intérieur à l'extérieur de la cellule et cette structure est partagée avec certains membres de la famille des canaux ioniques régulateurs de volume (Volume Regulated Anionic Channel, VRAC), comme la **L**eucine-**R**ich **R**epeat **C**ontaining **8** proteins **a** (LRRC8a), potentiellement exprimée à la membrane du GR. La structure de LRRC8 est en effet très similaire à celle de la PANX1, et semblent partager un ancêtre commun (Abascal et Zardoya 2012). Cependant LRRC8a forme un canal homohexamérique alors que la PANX1 est un canal homoheptamérique (***Figure 29*** et ***Tableau 6***).

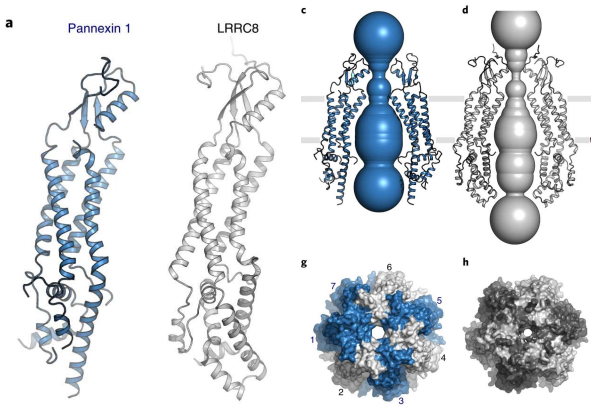


Figure 29 *: Schéma de la structure des canaux à larges pores PANX1 (bleu) et LRRC8a (gris) (Deng et al. 2020)*

	Pannexine 1	LRRC8
Structure	Heptamérique 4 domaines TM	Hexamérique 4 domaines TM
Sélectivité	Anionique (ATP, Cl^-) 74 et 75	Anionique (Cl^-, I^-, taurine) D102 and R103
Mécanisme d'ouverture	Extermité C-term	Extrémité C-term
Activation $K^+_{extracell}$	Oui	Non
Activation hypotonique	Oui	Oui
Activation voltage	Oui	Oui
Inhibition Carbenoxolone	Oui	Oui
Expression endogène	Ubiquitaire (érythrocytes)	Ubiquitaire (mais pas de littérature pour les GRs)

Tableau 6 : *Comparaison de la structure des canaux ioniques à larges pores LRRC8a et PANX1*

En protéomique, aucune trace de LRRC8a n'est retrouvée au cours de l'érythropoïèse, ni dans les cellules de la lignées K562 (Gautier et al. 2016). D'autre part, l'utilisation dans notre étude de plusieurs inhibiteurs différents connus de la PANX1, non seulement la carbenoxolone (CBX) mais aussi la probenecide (PBC) et la méfloquine (MFQ) (Navis et al. 2020), permet d'étudier une activité spécifique de la PANX1.

Complexe membranaire stomatine-PANX1

Antérieurement à la thèse, il avait été démontré dans les cellules HEK-293 co-transfectées avec la stomatine recombinante et la PANX1 recombinante et par immunoprécipitations de chacune des protéines taguées une interaction de l'une avec l'autre (Zhan et al. 2012). De plus, en délétant par mutagenèse l'extrémité C terminale de la PANX1 (Δ235-426), l'interaction entre les deux partenaires était abolie.

Dans notre étude, nous avons mis au point le PLA *in situ* sur GRs préalablement perméabilisés et fixés puisque les épitopes reconnus de la PANX1 et de la stomatine sont intracytoplasmiques. Cette technique de biochimie est basée sur l'immunodétection de deux protéines proches de moins de 40 nm. L'imagerie en flux a permis, pour la première fois sur le GR, d'associer des images de spots rouges à une quantification d'évènements PLA positifs (PLA+), démontrant, grâce à l'utilisation de contrôles négatifs (avec un seul anticorps primaire sur les deux) mais aussi à l'aide de GRs OHSt utilisés comme témoins

négatifs (stom-), une proximité entre la PANX1 et la stomatine à la membrane du GR. Un PLA sur cellules K-562 a également permis d'obtenir des résultats similaires pour le test effectué entre la stomatine-PANX1 et stomatine-Glut1 dont l'interaction avait précédemment été démontrée (Montel-Hagen et al. 2008) (données non présentée).

Une activité mécanosensible de la protéine PANX1

L'activation de la PANX1 implique plusieurs processus physiologiques ou pathologiques, réversibles ou irréversibles : le calcium intracellulaire, le potassium extracellulaire, la phosphorylation, le clivage de l'extrémité C terminale et enfin la stimulation mécanique (Chiu et al. 2017; Yang et al. 2022).

Dans le GR, la forte concentration de potassium extracellulaire a été décrite comme un moyen de stimuler l'ouverture du canal PANX1 (Locovei, Bao, et Dahl 2006). Le canal a été isolé après transduction de la PANX1 dans les cellules Sf9 infectées par baculovirus et des mesures en microscopie électronique du diamètre du canal et du diamètre du pore ont été effectuées et démontrent un élargissement du diamètre du pore dans le tampon potassique en comparaison avec un tampon majoritairement sodique (Wang et al. 2014) *(**Figure 30**)*.

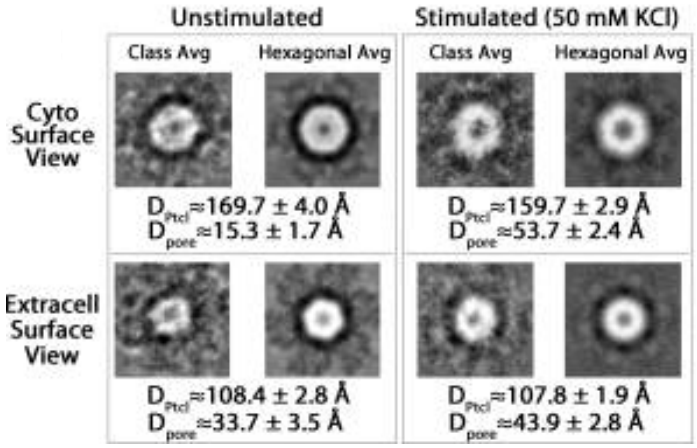


***Figure 30** : Images de microscopie électronique en coloration négative de PANX1 isolée à partir de cellules transduites sf9 par baculovirus montrant l'ouverture du canal par l'élargissement du pore central (Wang et al. 2014)*

La stimulation de la PANX1 dans le GR humain a été antérieurement réalisée avec un tampon Kgluconate (Locovei, Bao, et Dahl 2006). Dans ces travaux, Locovei évoque une stimulation par la dépolarisation de la membrane du GR. Tandis que membrane du GR est imperméable au gluconate extracellulaire, le chlore intracellulaire s'équilibre en sortant passivement de la cellule, ce qui entraine une augmentation du potentiel membranaire qui était à l'origine de -10 mV. L'utilisation de la sonde fluorescente sensible au potentiel $DiBAC_4(3)$ nous a permis de suivre cette dépolarisation. Cependant, dans les GRs OHSt, le Kgluconate induit des modifications du volume de la cellule. Ce changement de volume observé en cytométrie en flux par la mesure de la taille (FSC, Forward Scatter) résulte très probablement d'une sortie de sodium qui va équilibrer les charges négatives liées à la sortie de chlore. Comme la membrane du GR OHSt est perméable au sodium du fait de la fuite cationique caractéristique de ce phénotype, cela se traduit d'une part par une perte de volume mais également par l'absence de la dépolarisation des GRs OHSt en tampon Kgluconate. Ces résultats nous ont conduit à utiliser comme le KCl comme source de stimulation de la PANX1 par une concentration extracellulaire élevée en K^+ dans nos tests d'activité de la PANX1 par mesure de l'influx de la sonde fluorescente 5(6)-carboxyfluoresceine. Dans ce cas, le volume des GRs reste constant aussi bien pour le GRs témoins et les GRs OHSt. De même les modifications du potentiel de membrane enregistrés par la sonde DiBAC sont similaires pour les deux types de GRs.

Cependant l'élévation de la concentration en K^+ extracellulaire n'intervient pas que dans la dépolarisation de la membrane. Il existerait par ailleurs sur les boucles extracellulaires de PANX1 un ou plusieurs site(s) d'interaction avec le potassium (Wang, Jackson, et Dahl 2018). Dans la publication de Wang et al., des études de mutagenèse sur les boucles extracellulaires ont permis d'identifier des modifications de l'activité de PANX après stimulation avec le potassium extracellulaire.

Le choc hyposmotique est un autre stimulateur généralement utilisé sur le GR pour mesurer l'ATP relargué par la PANX1 (Locovei, Bao, et Dahl 2006). Dans notre étude, cette méthode a été utilisée sur GRs frais pour montrer, en utilisant comme inhibiteur la carbenoxolone (CBX), la spécificité du relargage d'ATP par la PANX1. Les

mesures par bioluminescence ont permis de déterminer les concentrations absolues de l'ATP intracellulaire et de l'ATP extracellulaire en tenant compte du volume globulaire plus élevé pour les GRs OHSt mais aussi de la concentration en GRs dans les diverses conditions.

Or il y a deux problèmes dans la comparaison du relargage d'ATP dans les GRs témoins et OHSt. D'une part, la fragilité osmotique est supérieure pour les GRs OHSt en comparaison de GRs témoins. Les variations de volume ne sont pas les mêmes et donc la tension à la membrane n'est pas la même. D'autre part, après la réjuvénation des GRs, la concentration d'ATP intracellulaire dans les GRs OHSt est supérieure d'un tiers à celle des GRs témoins, ce qui s'explique par la suractivation de la voie glycolytique dans les GRs OHSt (Darghouth et al. 2011). La force électromotrice et donc les flux ioniques ne sont pas les mêmes pour une pression osmotique égale entre les 2 phénotypes de GRs.

Dans les cellules K-562 stom+ et stom-, il n'y avait pas de différences de taille des cellules avant ou après choc hyposmotique. Cependant, nous n'avons pas pu mesurer l'ATP relargué, malgré les outils mis en place, notamment la transfection d'un plasmide permettant l'expression de luciférase à la membrane des cellules (voir annexe page 155). L'étude de la perméabilité au TO-PRO-3 après choc hyposmotique a permis de confirmer cependant une diminution de l'activité mécanosensible des PANX1 dans les cellules stom- comme observé après stimulation par le potassium extracellulaire pour les GRs OHSt déficient en stomatine.

Ces travaux de thèse ont donc montré dans un contexte érythroïde, une activité mécanosensible du canal ionique à large pore PANX1.

Probables conséquences physiologiques

Notre étude a montré qu'en absence de stomatine, l'incapacité de PANX1, après stimulation, à importer la carboxyfluoresceine se traduit par une diminution de l'activité de ce canal. Pour sa capacité ou non à relarguer l'ATP lorsque la stomatine est absente, nos résultats sur sangs congelés, décongelés et réjuvénés ne nous permettent pas

actuellement de conclure. Il serait intéressant, dès que possible, d'effectuer ces expériences sur sang frais. Toutefois, faisant l'hypothèse d'une PANX1 déficiente non seulement pour l'entrée de la sonde CF mais également pour le relargage d'ATP en absence de stomatine dans les GRs OHSt, cette déficience pourrait contribuer aux épisodes thrombotiques observés chez les patients OHSt, en particulier après splénectomie.

En effet, dans la circulation sanguine, le relargage d'ATP par le GR active les canaux purinergiques des cellules endothéliales. Il s'en suit une cascade de signalisation menant à la vasodilatation des vaisseaux sanguins (González-Alonso, Olsen, et Saltin 2002) (***Figure 31***).

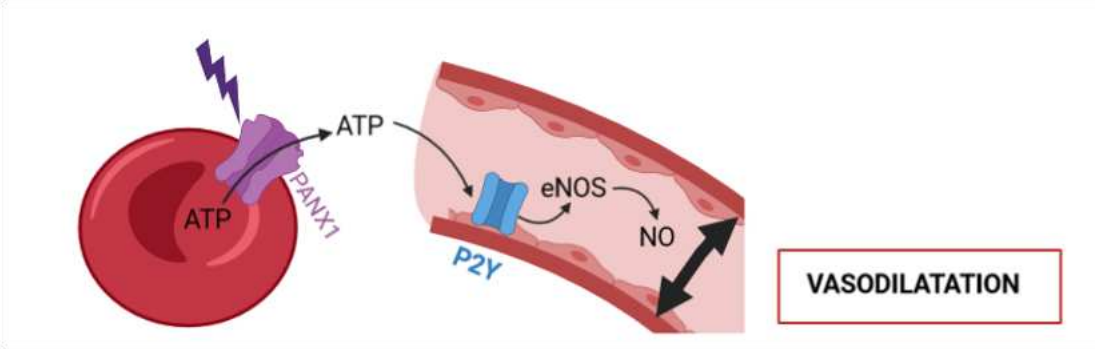


Figure 31 *: cascade de signalisation du relargage de l'ATP par le GR au travers de la Pannexine à la vasodilatation des vaisseaux sanguins par les cellules endothéliales*

Or cette cascade pourrait être fortement perturbée lorsque les GRs OHSt circulent dans des microcapillaires.

AXE II : MODIFICATION DE L'ACTIVITE MECANOSENSIBLE DE PIEZO1

IMPLIQUANT UNE INTERACTION DU CANAL AVEC LA STOMATINE

1. INTRODUCTION A L'AXE II

Piezo1 est un canal homotrimérique cationique non-sélectif exprimé à la membrane de nombreuses cellules répondant à des stimuli mécaniques. Dans le GR, à la suite de la stimulation de Piezo1, l'entrée de calcium conduit à l'activation du canal potassique calcium-dépendant KCNN4. La sortie de potassium par ce canal entraine la déshydration du GR (Dyrda et al. 2010).

D'autre part, dans les cellules neuronales, il a été démontré qu'un homologue de la stomatine, SLP-3, interagit avec Piezo1 et Piezo2 afin de potentialiser l'ouverture de ces derniers (Poole et al. 2014; Qi et al. 2015).

L'objectif des travaux décrits dans ce deuxième chapitre est donc de déterminer si la stomatine interagit avec Piezo1, et si la déficience en stomatine a un impact sur l'activité de Piezo1, avec des effets éventuels sur l'hydratation des GRs OHSt.

Dans notre étude, l'expression de Piezo1 à la membrane des GRs témoins et OHSt a d'abord été étudiée en immunoblot et en cytométrie en flux en utilisant deux anticorps dirigés contre des épitopes intracellulaires de la protéine, ce qui a nécessité des mises au point décrites dans le paragraphe « Patients et méthodes ».

Cela a permis de mettre en place un PLA *in situ* sur des membranes (ou stromas) des GRs témoins afin de déterminer la potentielle interaction entre la stomatine et Piezo1. Comme la préparation de ces stromas requiert, pour la réalisation des PLA, des quantités importantes de culot globulaire (>4mL), ces tests n'ont pas été effectués à partir des GRs OHSt, comme cela avait été fait pour l'étude de l'interaction PANX1-stomatine. Cependant, puisque nous avions à disposition des clones de cellules K-562 stom+ et stom- que nous avions générés pour notre étude sur la Pannexine, nous les avons utilisées pour effectuer des PLA. Toutefois, comme les cellules K-562 n'expriment pas Piezo1, nous avons dû procéder à des transfections de certains de ces clones avec un plasmide Piezo1-mCherry. La construction ce plasmide correspond à l'introduction d'un tag mCherry dans une boucle interne de Piezo1 sans que sans que l'activité de Piezo1 ne soit altérée (Cox et al. 2016) (voir le paragraphe « Patients et méthodes »).

Dans le but de mieux caractériser le complexe stomatine/Piezo1, des nanodisques appelés SMALPs ont été réalisés en condition native (sans détergent) par l'ajout d'un copolymère de Styrene Maleic Acid (SMA) à des membranes de GRs témoins, selon un protocole développé au laboratoire (Desrames et al. 2020). Après ultracentrifugation de ces SMALPS solubles en gradient de sucrose, des fractions enrichies en nanodisques contenant Piezo1 ont été obtenues puis isolées par chromatographie d'exclusion de taille (SEC). Les fractions de la SEC enrichis en Piezo1 ont par la suite été immunoprécipitées avec un anticorps anti-stomatine couplé à des billes d'agarose et les éluats ont été analysés en gel coloré au nitrate d'argent, en immunoblot et en spectrométrie de masse.

Par ailleurs, l'activité mécanosensible de Piezo1 dans les GRs témoins et OHSt a été investiguée par imagerie calcique après la stimulation de Piezo1 par choc hypoosmotique ou après induction de l'ouverture par un agoniste : Yoda1.

L'activité de Piezo1 a aussi été étudiée en électrophysiologie après la transfection en transitoire d'un plasmide contenant Piezo1-FLAG dans les cellules K562 stom+ et stom- également cotransfectées avec un plasmide GFP pour identifier les cellules transfectées. Les mesures en continu des courants ioniques générés par Yoda1 sont effectuées en configuration « cellule entière » en suivant un protocole de rampes de -120 à +80 mV, comme détaillé dans le paragraphe « Patients et méthodes ».

Ces travaux sont encore en cours de réalisation. Cependant, les résultats préliminaires sont présentés dans l'axe II et ont fait, par ailleurs, l'objet d'une présentation orale au congrès de L'European Red Cell Society (ERCS) le 9 avril 2022 et au congrès des canaux ioniques le 13 septembre 2022.

2. RESULTATS DE L'AXE II

Piezo1 est exprimé à la membrane des GRs témoins et OHSt

Piezo1 est un canal formé par 3 monomères de poids moléculaire apparent de 286 kDa chacun. Il exprimé à la membrane du GR dans un environnement enrichi en cholestérol, et le nombre de copie du canal par GR est très faible, environ 4000 par cellule. L'expression de Piezo1 a été étudiée à la membrane des GRs témoins et OHSt, déficient en stomatine, par immunoblot avec un anticorps anti-Fam38A (Proteintech), et en cytométrie en flux avec un autre anticorps anti-Piezo1 (Novus), tous les deux produits chez le lapin.

Des immunoblots ont été réalisés par transfert sur membrane PVDF de lysats de membranes de GRs témoins et OHSt préalablement déposés sur gel SDS-PAGE. Avant la saturation, une coloration rouge Ponceau a été réalisée afin de contrôler la qualité du transfert et les éventuelles dégradations des échantillons (***Figure 32*** **A**).

L'immunoblot incubé avec un anti-Piezo1 a permis la détection d'une bande de haut poids moléculaire apparent, à plus de 250 kDa (***Figure 32*** **B**). L'intensité des bandes pour les lysats des stromas de GRs OHSt paraît plus faible que celles correspondant aux témoins. Toutefois, une détection plus faible de l'Aquaporine 1 est également obtenue avec les échantillons OHSt, semblant indiquer une charge protéique sur gel plus faible de ces échantillons, puisque le nombre de site d'AQP1 avait été montré identique entre les témoins et les patients (***Figure 32*** **C**) (Genetet et al. 2012).

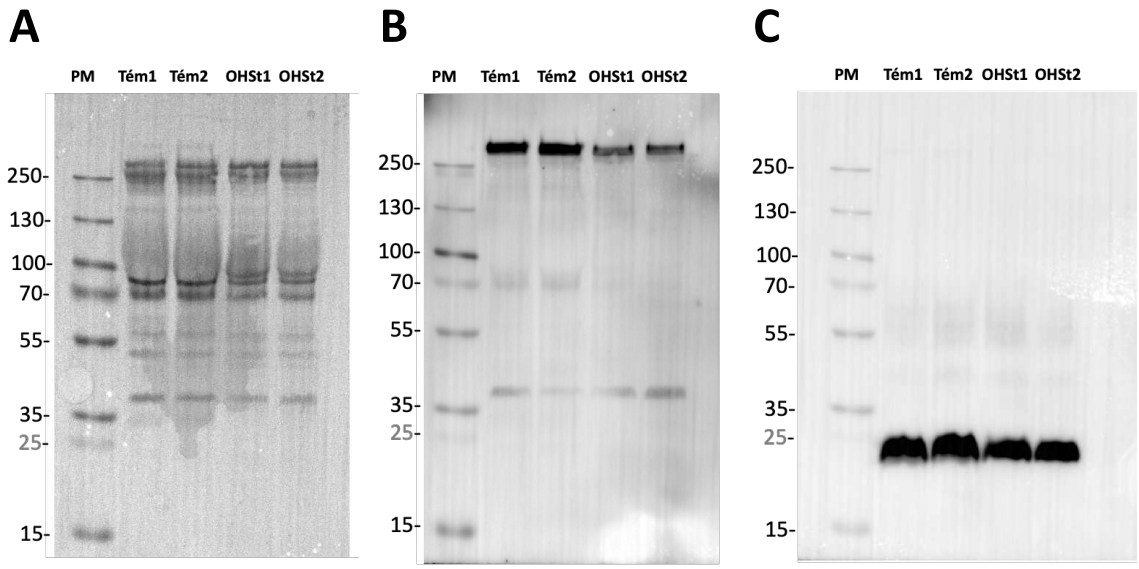


Figure 32 : *Expression de Piezo1, de l'Aquaporine1 et d'autres protéines érythrocytaires à la membrane des GRs témoins et OHSt par immunoblots (**A**) Coloration de la membrane au rouge ponceau après immunotranfert (**B**) Immunoblot avec l'anti-Fam38A (**C**) Immunoblot avec l'anti-AQP1*

Un premier test de cytométrie en flux sur des GRs fixés et perméabilisés en utilisant un anti-Piezo1 qui reconnait un épitope interne n'a pas permis de révéler la présence de Piezo1 sur GRs. Par ailleurs, même après démasquage des sites antigéniques avec de l'acide citrique, la détection n'était toujours pas possible sur GRs (données non présentées).

Toutefois, ce même anticorps utilisé sur des stromas fixés de GRs témoins nous a permis de détecter en cytométrie en flux la protéine Piezo1 avec une MFI de 1194 par rapport à une MFI de 18.5 avec les stromas incubés sans anticorps primaires (***Figure 33*** **A**, deux histogrammes du haut). De plus, une préincubation avec le peptide bloquant le site d'interaction de l'anticorps à son antigène a conduit, sur ces stromas de GRs frais de témoins, à la diminution de la fluorescence détectée en cytométrie en flux (MFI = 132), révélant ainsi la spécificité de cet anticorps (***Figure 33*** **A**, histogramme du bas).

Par ailleurs, après incubation des stromas de GRs décongelés issus d'un témoin (en rouge sur la ***Figure 33*** **B**) et d'un patient OHSt (en bleu sur la ***Figure 33*** **B**) avec un anticorps anti-stomatine, on remarque la diminution attendue du pic de fluorescence pour le patient OHSt (MFI de 98.4) par rapport au témoin (MFI de 757). L'absence de

l'expression de la stomatine est donc confirmée en utilisant des stromas à la place de GRs fixés et perméabilisés.

Enfin, l'incubation de l'anti-Piezo1 sur stromas de GRs témoins et OHSt révèle un pic comparable en cytométrie en flux (***Figure 33*** **C**), confirmant une expression similaire de Piezo1 sur les GRs témoins et OHSt.

L'ensemble de ces tests a permis d'envisager l'utilisation en PLA de cet anticorps anti-Piezo1 en paire avec l'anti-stomatine sur des stromas de GRs.

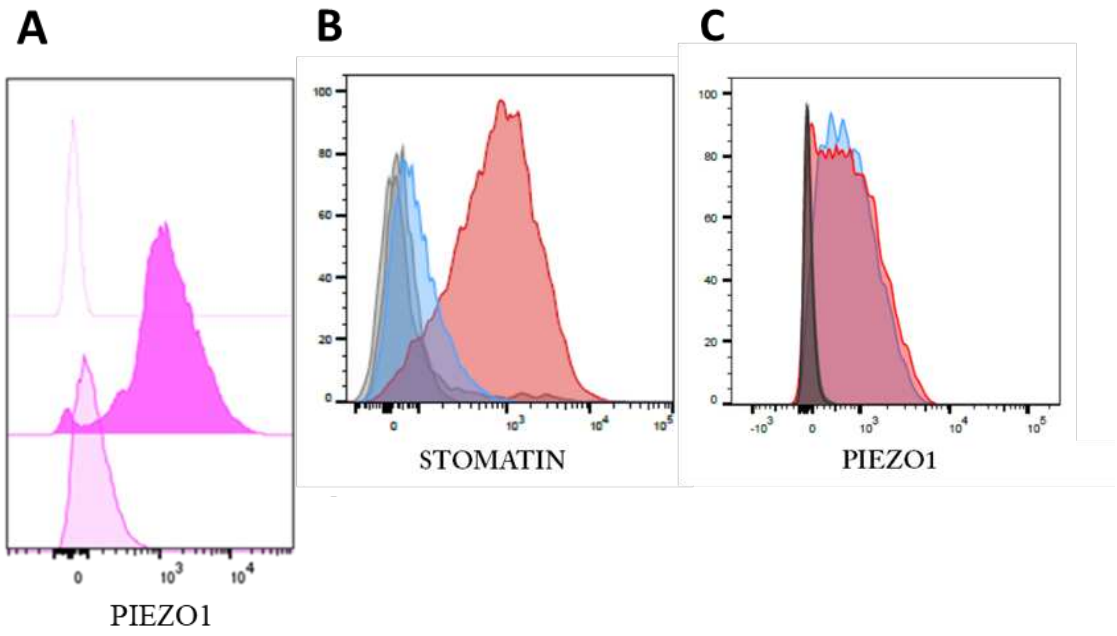


Figure 33 : *Expression de Piezo1 et de la stomatine sur les stromas des GRs témoins et OHSt en cytométrie en flux. (A) les stromas de GRs témoins fixés ont été incubés sans anticorps primaire (histogramme blanc) avec l'anticorps anti-Piezo1 (histogramme plein) ou avec l'anticorps anti-Piezo1 préalablement bloqué avec le peptide (histogramme semi-transparent) puis avec un anticorps secondaire. (**B**) Les stromas des GRs témoins (rouges) et OHSt (bleus) sont analysés après marquage de la stomatine par un anti-stomatine. (**C**) Les stromas des GRs témoins (rouges) et OHSt (bleus) sont analysés après marquage de Piezo1 par un anti-Piezo1.*

Piezo1 et la stomatine sont à proximité (<40 nm) à la membrane des GRs

Afin de déterminer une probable interaction entre la stomatine et Piezo1 à la membrane du GR, le PLA attestant d'une distance de moins de 40 nm a été utilisé avec les anticorps primaires validés en cytométrie en flux. Après réaction de PLA, l'analyse en

imagerie en flux a d'abord permis de visualiser des stromas marqués à la Phalloïdine-Alexa Fluor488 pour lesquels le réseau d'actine est présent (***Figure 34* A**, AF488). Sur certains de ces stromas, les spots caractéristiques d'une réaction positive de PLA sont observés (***Figure 34* A**, Far Red). Quand la réaction de PLA est faite avec un seul anticorps primaire, le pourcentage d'évènement PLA + (respectivement 4.42% pour l'anticorps anti-stomatine et 5.65% pour l'anticorps anti-Piezo1) n'est pas significativement différent de la réaction faite sans anticorps primaire (0.92%) et reflète du bruit de fond. Quand la réaction de PLA est réalisée avec les deux anticorps anti-stomatine et anti-piezo1 dans la même réaction, ce pourcentage est de 32.34% d'évènements PLA+, significativement plus grand que celui obtenu pour les réactions faites avec un seul anticorps.

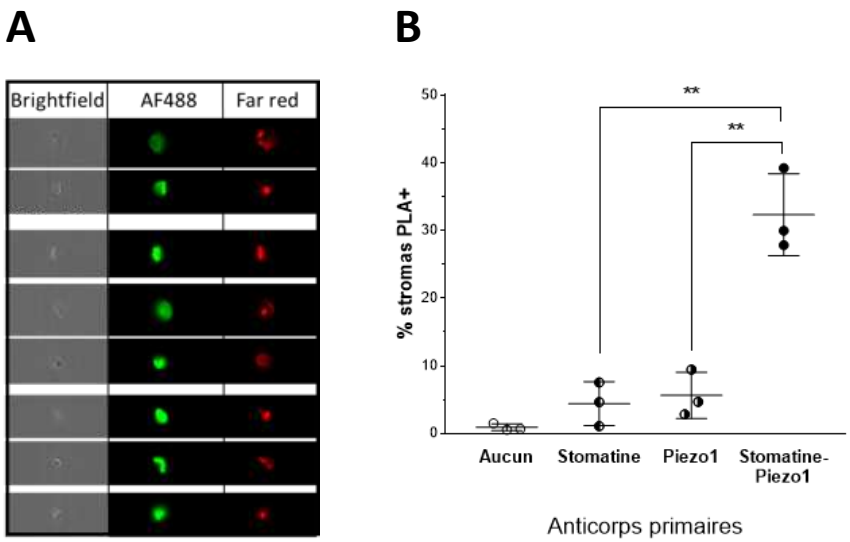


Figure 34 : PLA i*n situ* appliqué aux stromas de GRs témoins *utilisant le couple d'anticorps anti-stomatine/anti-Piezo1 (A) Images de stromas extraites de l'analyse en imagerie en flux observés en champ clair (brightfield), à 488nm pour le marquage de l'actine (AF488) et à 664nm pour le marquage des spots PLA (Far red). (B) Quantification en pourcentage des évènements correspondant à des stromas qui présentent des spots rouges (PLA+) parmi les stromas actine+, quand la réaction de PLA est faite sans anticorps primaires (aucun) ou avec un seul anticorps primaire anti-stomatine ou anti-piezo1 ou avec les deux anticorps primaires. Test statistique Anova one-way, ** p value <0.01*

Piezo1 est enrichi dans des SMALPs après fractionnement en gradient de sucrose

Afin d'étudier, à l'échelle nanométrique, un complexe stomatine-Piezo1, des nanodisques (SMALPs) ont été formés par solubilisation de stromas de GRs témoins à l'aide d'un polymère d'acide maléique styrène (SMA). La réaction n'utilisant aucun détergent, les complexes protéiques et lipidiques extraits des membranes sont considérés dans un état « natif ». Cette approche n'entraine pas certains artéfacts pouvant éventuellement se produire avec une utilisation de détergents après des « cross-link », comme précédemment rapportés dans des études d'identification de partenaires de la stomatine (Rungaldier et al. 2013).

Les SMALPs enrichis en Piezo1 par fractionnement après dépôt sur un gradient de sucrose (***Figure 35*** **A**) et ultracentrifugation tels décrits dans le paragraphe « Patients et méthodes », ont été isolés. Les fractions de sucroses (F_{Suc}) contenant Piezo1 ont été identifiées par immunoblot avec l'anti-Fam38A (***Figure 35*** **B**). Dans la piste où les SMALPs non fractionnés ont été déposés, deux bandes de plus de 250 kDa ont été détectées. La forme la plus intacte de Piezo1 pourrait correspondre à la bande la plus haute. Nous avons donc retenu les fractions $F_{Suc}11$, $F_{Suc}12$ et $F_{Suc}13$ et, afin d'éliminer le sucrose contenu dans ces fractions, une chromatographie d'exclusion de taille (SEC) a été réalisée en injectant 200 µL de chacune d'elles dans la colonne. Six fractions de la SEC (500 µL chacune) correspondantes au pic d'absorbance à 280 nm ($F_{SEC}1$ à $F_{SEC}6$), ont été récupérées (***Figure 35*** **C**). De nouveau, la présence de Piezo1 est détectée par Immunoblot avec l'anti-Fam38A. Piezo1 est détecté dans les fractions $F_{SEC}2$, $F_{SEC}3$ et $F_{SEC}4$, majoritairement dans la fraction $F_{SEC}3$. La présence de la stomatine est également détectée dans ces fractions en incubant la membrane avec un anti-stomatine. Cette dernière est détectée dans les fractions $F_{SEC}2$ à $F_{SEC}6$, plus abondante dans la fraction $F_{SEC}3$ (***Figure 35*** **D**). Ces différentes étapes ont donc permis le co-enrichissement des SMALPs en stomatine et en Piezo1.

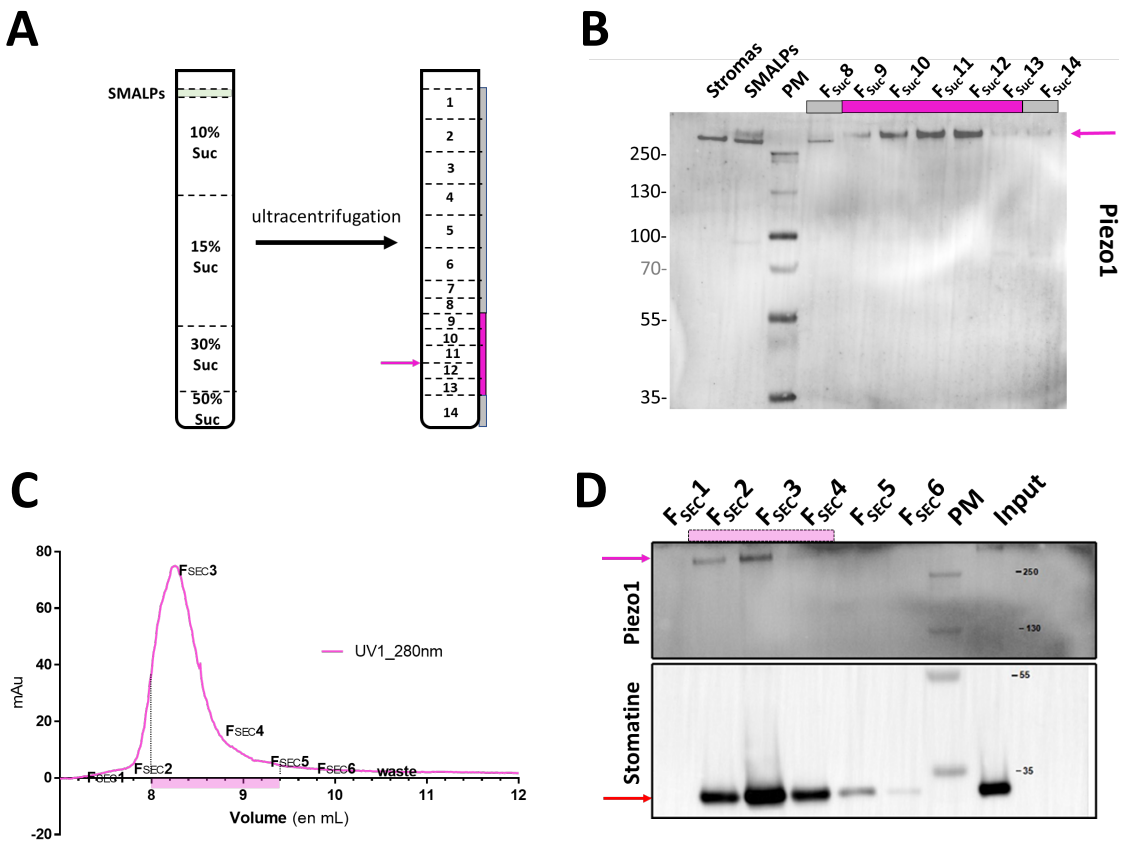


Figure 35 *: Caractérisation des SMALPs enrichis en Piezo1 (**A**) Fractionnement des SMALPs par gradient de sucrose (suc) après ultracentrifugation, la hauteur supposée de l'homotrimère de Piezo1, qui est calculée à partir du diamètre du canal, étant indiquée par une flèche rose **(B)** Immunoblot des fractions de SMALPs après gradient de sucrose avec détection de Piezo1 par l'anti-Fam38A. (**C**) Profil de la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) à partir de l'injection des fractions de SMALPs F_{Suc}11-12-13 (**D**) Immunoblots des fractions de la SEC issues de la colonne Superdex incubés avec l'anti-Fam38A (membrane du haut) et l'anti-stomatine E5 (membrane du bas).*

Les fractions F_{SEC}2, F_{SEC}3 et F_{SEC}4 ont par la suite été observées en microscopie électronique en coloration négative (***Figure 36***). La Fraction F_{SEC}2 présente un très faible nombre de nanoparticules (n=24 pour 1.625 μm^2) d'une taille moyenne de 25.2 nm, dont quelques liposomes avec des tailles d'une centaine de nm (données non présentées). Les fractions F_{SEC}3 et F_{SEC}4 où des particules d'une taille moyenne respectivement de 30.6 (n=52 pour 1.625 μm^2) et de 18.7 (n= 85 pour 1.625 μm^2) nanomètres ont été détectées, dont certaines présentent une morphologie en croix caractéristique de la structure 3D de Piezo1 (miniature c de la ***Figure 36*** **A** en particulier).

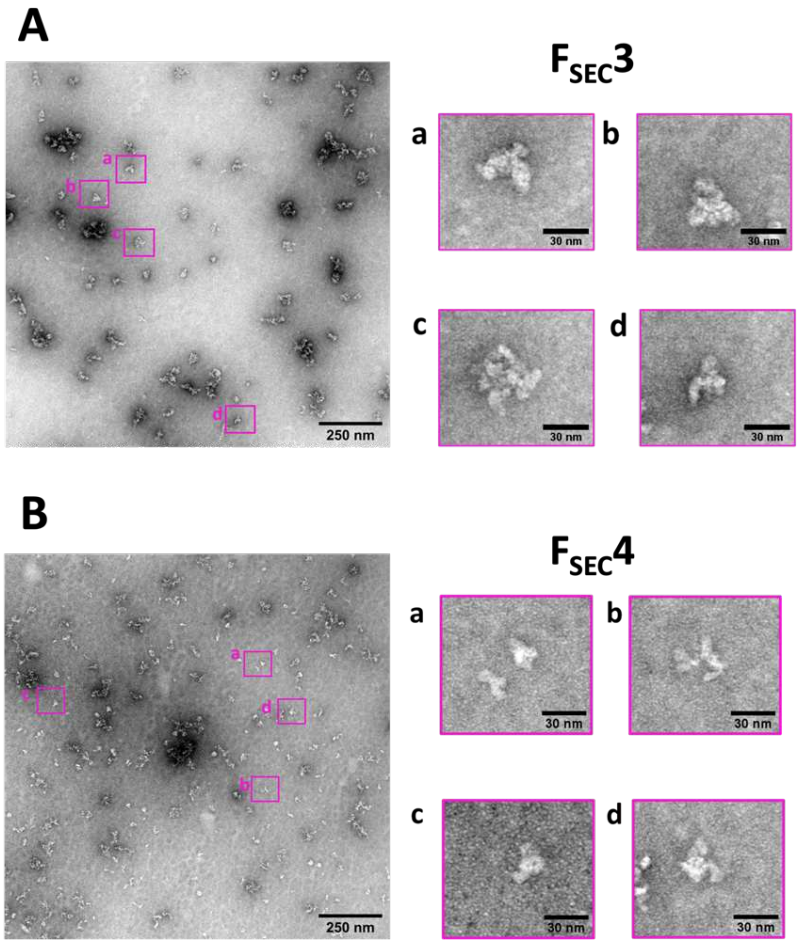


***Figure 36** : Image en coloration négative de microscopie électronique des fractions $F_{SEC}3$ (en **A**) et $F_{SEC}4$ (en **B**) après chromatographie d'exclusion de taille (SEC) caractérisées chacune par des nanoparticules de taille moyenne de 30 nm (miniatures a, b, c et d). Barre d'échelle des images en bas à droite.*

Les fractions $F_{SEC}3$ et $F_{SEC}4$ ont été poolées et immunoprécipitées avec un anti-stomatine couplé à des billes d'agarose, selon le protocole décrit dans le paragraphe « Patients et méthodes ». Les éluats (E1 et E2) ont été observés sur un gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent, montrant les bandes correspondant à différentes protéines immunoprécipitées (***Figure 37* A**). Dans l'éluat 2 (E2), en plus des chaines d'IgG, on observe une bande correspondant à la stomatine immunoprécipitée. La présence de cette dernière a été également confirmée par immunoblot anti-stomatine (***Figure 37* B**). Des bandes correspondant vraisemblablement à la bande 3 sont également présentes, ce qui était attendu, étant donnée l'interaction décrite entre la stomatine et la bande 3 (Genetet et al. 2017b). Des bandes de la taille des spectrines sont aussi

visibles, ainsi qu'une fine bande de taille supérieure qui pourrait correspondre à Piezo1. Un immunoblot avec un anti-Piezo1 (***Figure 37* C**) a également été réalisé afin de confirmer la présence de Piezo1. Cependant, les bandes supérieures à 250 kDa sont peu visibles probablement dû à la dégradation des SMALPs en sortie de colonne. La présence de Piezo1 dans les éluats a tout de même été confirmée ainsi que celle d'autres protéines par spectrométrie de masse (voir annexe page 163).

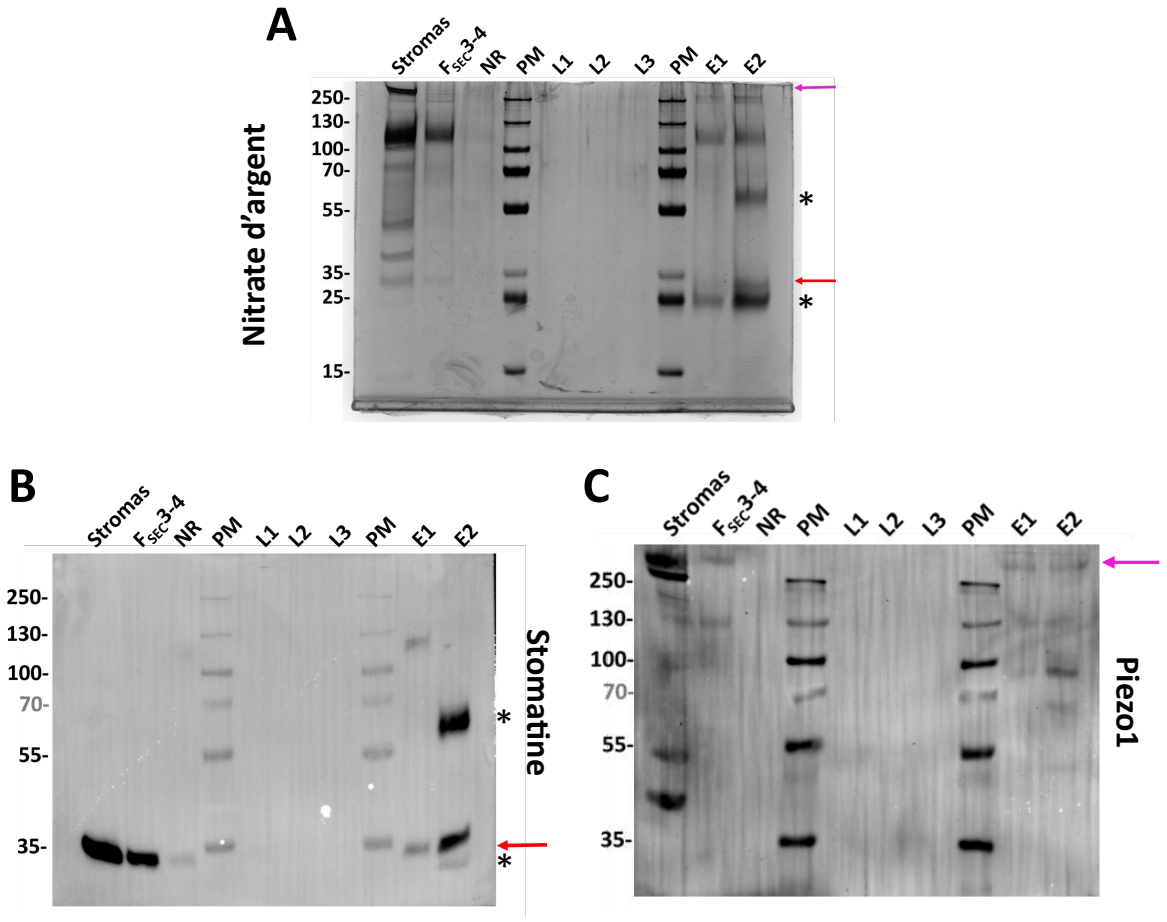


***Figure 37** : Immunoprécipitation des SMALPs enrichis en Piezo1 (F_{SEC}3-4) la fraction non retenue (NR) par l'anti-stomatine couplé aux billes d'agarose, les 3 lavages (L1-3) ainsi que les éluats (E1 et E2) ont été déposés sur 2 gels d'électrophorèse. (A) coloration au nitrate d'argent des dépôts précédemment décrits (**B**) Immunoblot avec un anti-stomatine (flèche rouge montrant la hauteur théorique de la bande spécifique à la stomatine) (**C**) Immunoblot avec un anti-Fam38A (flèche rose montrant la hauteur théorique de la bande spécifique à Piezo1). Les astérisques montrant les IgG (H et L)*

L'activation mécanosensible de Piezo1 dans les GRs décongelés témoins et OHSt est similaire

Piezo1, canal mécanosensible cationique non-sélectif peut être activé dans le GR par un choc hyposmotique. Afin de déterminer si la stomatine régule l'activité de Piezo1 dans les GRs, l'imagerie calcique de GRs individualisés a été réalisée sur les GRs témoins et OHSt.

Brièvement, les GRs chargés en Fluo-4 AM et immobilisés sur un puit à fond optique ont été placés sous l'objectif d'un microscope inversé à fluorescence, de manière à observer dans le champ une centaine de GRs. Le capillaire relié au système de perfusion a permis de délivrer les solutions de stimulation et des images ont été prises toutes les 2 secondes pendant 3 minutes par la caméra ainsi paramétrée. La fluorescence des GRs détourés sur le champ de l'objectif sur les cinq premières images de l'enregistrement F0 (***Figure 38*** **A**) a été rapportée à la fluorescence de chaque GR correspondant sur les images suivantes (***Figure 38*** **B**).

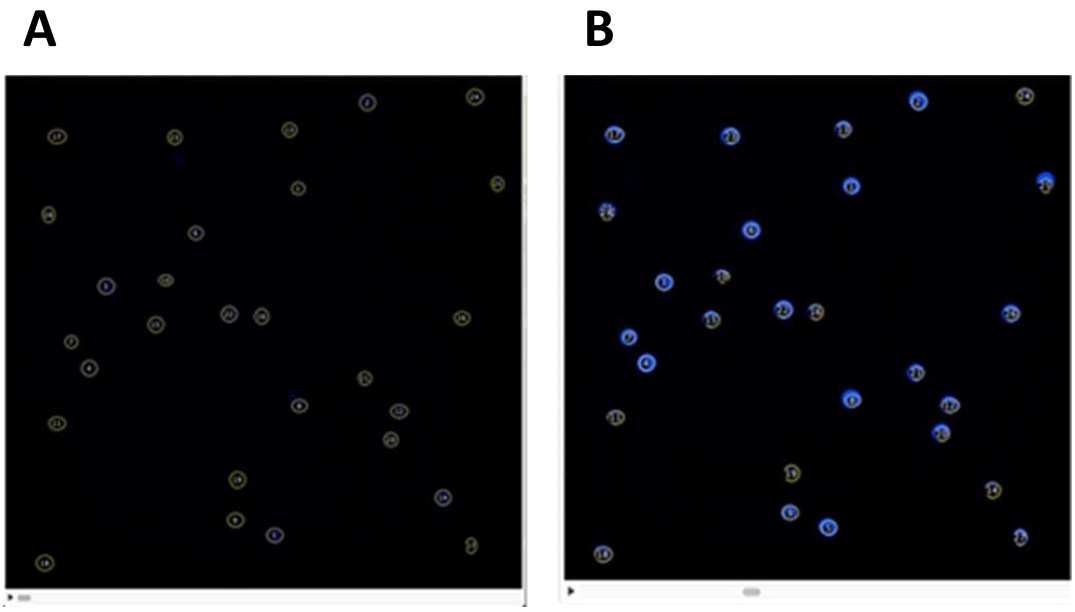


Figure 38 *: Image de microscopie à fluorescence montrant la fluorescence des GRs (contour d'intérêt délimité par un cercle jaune) chargés en sonde calcique Fluo-4-AM. (**A**) Fluorescence des GRs sous perfusion de tampon Tyrode isotonique (300 mOsms) au début de l'acquisition d'image (F0). (**B**) Fluorescence des GRs 6 secondes ($F_{t=36s}$) après l'arrêt de la perfusion de Tyrode isotonique et le début de la perfusion en tampon Tyrode hypoosmotique (220 mOsms).*

A la trentième seconde, la solution de Tyrode iso osmotique à 300 mOsms (traits pointillés) est délivrée par le système de perfusion et, 6 secondes après cette condition de perfusion qui ne change pas l'osmolarité du milieu, la fluorescence moyenne des GRs individualisés reste, comme attendue, constante, que ce soit pour les GRs témoins ($F_{t=36s}$ /F0 = 0.950) ou OHSt ($F_{t=36s}$/F0 = 0.976) (***Figure 39*** **A**).

En revanche, quand les GRs témoins sont soumis au choc hyposmotique, à 220 mOsms (traits pleins rouges), la fluorescence de la sonde dans les GRs individualisés augmente significativement $F_{t=36sec}$/F0= 1.251. De même, pour les GRs OHSt, la fluorescence de la sonde augmente également, $F_{t=36sec}$/F0= 1.298. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les deux phénotypes, indiquant que l'influx de Ca^{2+} après choc hyposmotique est similaire pour le GRs témoins et OHSt (***Figure 39*** **B**).

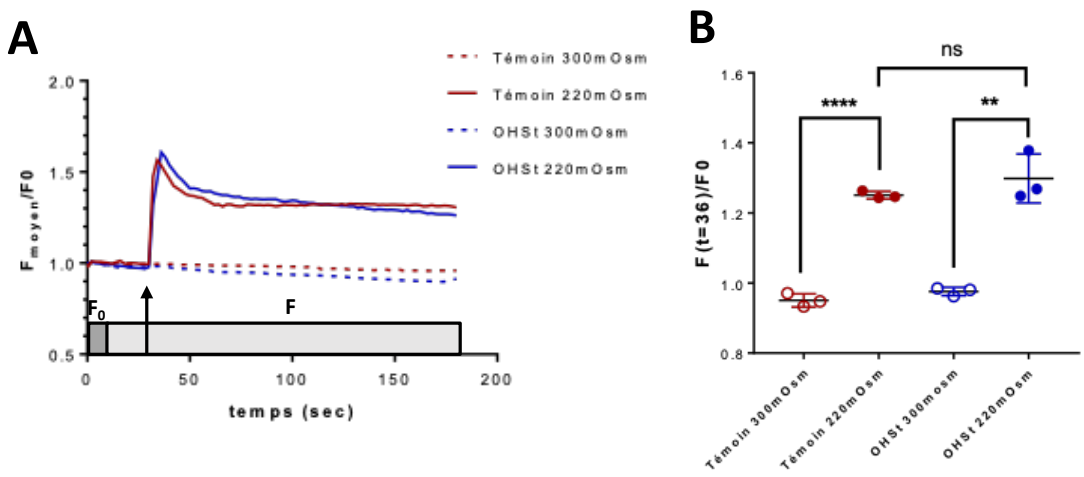


Figure 39 *: Mesure de l'induction de l'influx de Ca^{2+} dans les GRs après un choc hyposmotique par enregistrement de la fluorescence de la sonde sensible au Ca^{2+} présente dans les GRs en miscroscopie à l'aide d'une caméra. (**A**) Moyenne des cinétiques de fluorescence mesurée pour des populations d'au moins 300 GRs témoins (en rouge) et OHSt (en bleu) en condition iso osmotique (traits discontinus) et hyposmotique (traits pleins). (**B**) Moyenne des fluorescences à t =36 secondes en condition isotonique (300 mOsms, ronds vides) et en conditions hyposmotiques (220 mOsms, ronds pleins) pour les GRs de trois témoins (en rouge) et des trois patients OHSt (en bleu) réalisé trois fois pour chaque individu. Test statistique one-way ANOVA, ** p value <0.01, **** p value <0.001*

L'inhibition de l'influx de calcium par la toxine GsMTx4 est inefficace dans les GRs OHSt

Afin de prouver que l'influx de Ca^{2+} provient d'une activation spécifique de canaux ioniques mécanosensibles, les GRs témoins et OHSt ont été préalablement incubés pendant 20 minutes avec 2.5 µM de la mégatoxine GsMTx4. Ce peptide s'insère dans la bicouche lipidique et pénètre à l'interface des canaux ioniques mécanosensibles et de la membrane pour empêcher leur ouverture (Gnanasambandam et al. 2017).

Après une préincubation des GRs témoins avec la toxine, la fluorescence de la sonde calcique n'augmente après la stimulation hyposmotique (220 mOsms + GsMTx4, trait pointillé rouges), et reste à un niveau similaire à la condition non stimulée (300 mOsms, trait discontinus rouge) (***Figure 40*** **A**). Pour les GRs OHSt, la cinétique de fluorescence après stimulation hyposmotique et en présence de la toxine (220 mOsms, trait pointillé bleu) est similaire à celle en condition hyposmotique, sans toxine (220 mOsms, trait plein bleu) (***Figure 40*** **A**).

Au maximum de l'influx de Ca^{2+} pour la condition hyposmotique, soit 6 secondes après l'activation (t=36sec), la fluorescence relative de la sonde est de 1.276 pour les GRs témoins mais, en présence de la toxine, cette fluorescence relative est diminuée à 0.954, et redevient similaire à celle de la condition basale (***Figure 40*** **B**). Cependant, pour les GRs OHSt, la fluorescence relative en condition hyposmotique qui est de 1.345 à t=36sec n'est pas diminué en présence de la toxine, mais, au contraire, elle est plus forte ($F_{t=36sec}$/F0=1.589) (***Figure 40*** **B**). L'inhibition de l'influx de calcium observée après stimulation hyposmotique pour les GRs témoins en présence de la toxine GsMTx4 est donc inefficace pour les GRs OHSt.

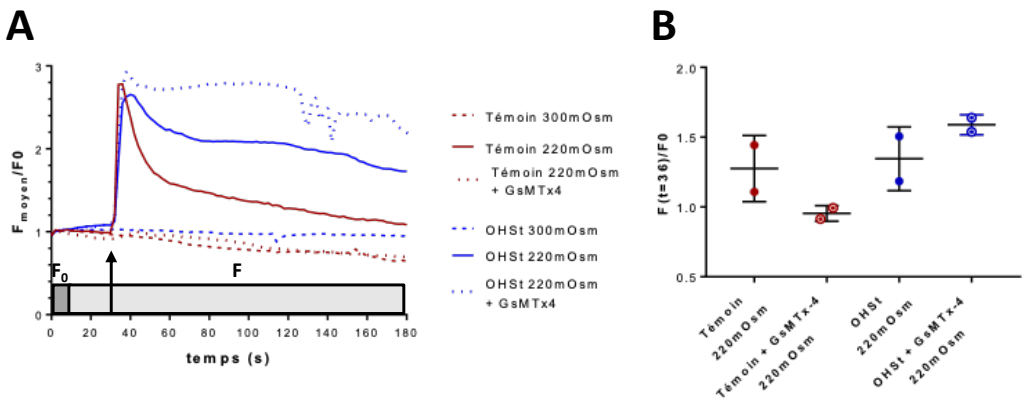


Figure 40 *: Inhibition de l'influx de calcium par la toxine GsMTx4 après un choc hyposmotique par enregistrement de la fluorescence de la sonde sensible au Ca2+ présente dans les GRs en microscopie à l'aide d'une caméra dans les GRs témoins et OHSt (**A**) Moyenne des cinétiques de fluorescence pour une population de GRs témoins (en rouge) ou OHSt (en bleu) en solution isotonique (300 mOsm, traits discontinus), après un choc hyposmotique (220 mOsms traits pleins) ou préalablement incubés avec 2.5 µM de GsMTx4 (220 mOsms + GsMTx4, traits pointillés). (**B**) Moyennes des fluorescences à t =36 secondes en conditions hyposmotiques (220 mOsms, ronds pleins) ou en condition hyposmotique en présence de la toxine (GsMTx-4 + 220mOsms, ronds pointés) pour les GRs de deux témoins (en rouge) et des deux patients OHSt (en bleu) réalisé une fois pour chaque individu.*

L'activation chimique de Piezo1 dans les GRs décongelés témoins et OHSt est significativement différente

Piezo1 peut également être activé spécifiquement par Yoda1, induisant une tension de l'hélice (aussi appelée bras) et donc l'ouverture du canal. Afin de déterminer une différence d'activité du canal dans les GRs témoins et OHSt, l'influx de calcium a été mesuré comme précédemment décrit, en remplaçant, dans la perfusion, le tampon Tyrode hyposmotique par un tampon Tyrode isotonique contenant 10 µM de Yoda1.

La cinétique de fluorescence de la sonde calcique Fluo-4-AM après l'activation de Piezo1 par Yoda1, est suivie pour les GRs témoins et OHSt (***Figure 41*** **A**). Pour les deux phénotypes, deux phases de vitesses d'influx de calcium ont été observées : une première phase lente à partir du début de la stimulation à la 80ème seconde, soit 50 secondes après le début de la stimulation, la deuxième phase est plus rapide avec une intensité de fluorescence semblant atteindre un plateau et se stabiliser à partir de la 120ème seconde, soit 1 minute et 30 secondes après le début de la stimulation. Celle-ci

concernerait d'avantage la capacité maximale des GRs à accumuler du calcium, qui comme attendu, est plus grande pour les GRs OHSt, qui ont un plus grand volume que pour les GRs témoins. Étrangement, cette deuxième phase semble débuter au même moment pour les deux phénotypes.

Pourtant, en comparant la première phase, l'influx de calcium dans les GRs OHSt (bleu) semble moins intense que pour les GR témoins (rouge). En effet, la médiane de fluorescence maximale de chaque GRs durant cette première phase ($Fmax_{t=30-80s}$) est significativement plus haute pour les GRs des deux premiers témoins, respectivement 2.743 et 2.522, que pour les GR des 2 patients OHSt, respectivement 1.303 et 1.718) (***Figure 41*** **B**). L'activation de Piezo1 semble donc moins efficace pour les GRs OHSt.

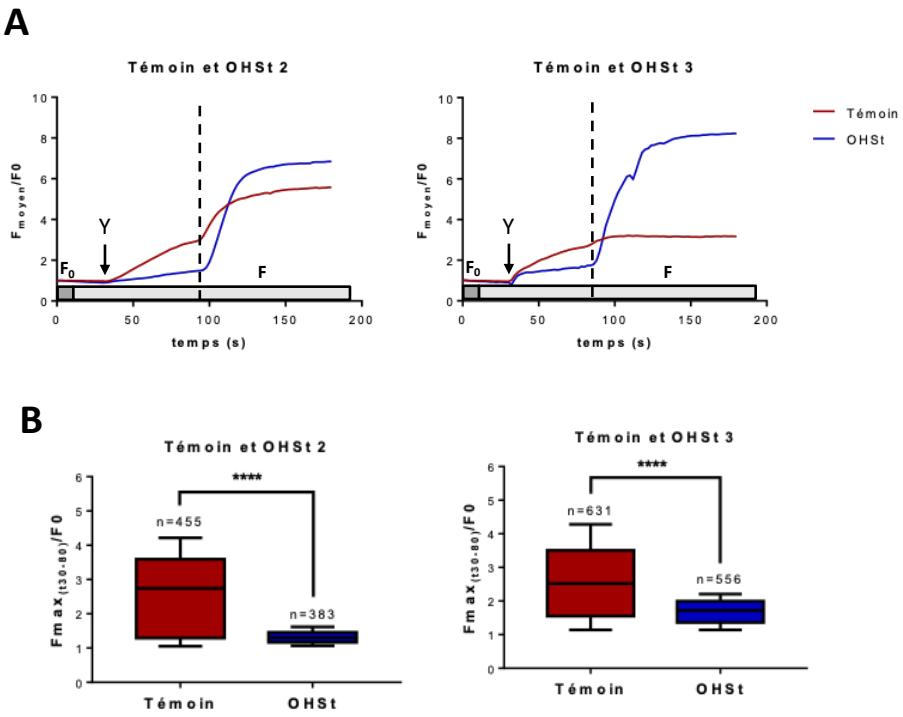


Figure 41 *: Activation de l'influx de calcium par 10 µM de Yoda1 dans les GRs témoins (rouge) et OHSt (bleu). (**A**) Moyenne des cinétiques de fluorescence pour des populations de GRs montrant 2 phases après l'application de Yoda1 (Y) séparé par un trait discontinu noir à la 90ème seconde pour les GRs d'un témoin vs ceux d'un patient OHSt (OHSt2, gauche) et à la 80ème seconde pour les GRs d'un autre témoin vs un autre OHSt (OHSt3, droite). (**B**) Médiane des fluorescences maximale au cours de la première phase (t= 30-80s) de chaque population de GRs témoins et OHSt (OHSt2, à gauche et OHSt3, à droite). Tests statistiques Man-Whitney, **** p value <0.001.*

L'activation chimique de Piezo1 dans les GRs décongelés témoins et OHSt induit la déformation des GRs en échinocytes

Les GRs témoins, soumis à l'activation de Piezo1 par Yoda1, ont une morphologie dite d'échinocytes. Cette morphologie est rapidement modifiée sous forme de sphérocytes (Cahalan et al. 2015). Quand les GRs témoins décongelés et réjuvénés sont soumis à l'activation chimique avec 10 µM de Yoda1, des échinocytes ont également été observés (flèches rouges, ***Figure 42*** **A**) et dénombrés 8 secondes après l'activation, puis 40 secondes après, 60 secondes après, à 2 minutes et 2 minutes 30 secondes après l'activation. Dans l'échantillon de GRs témoins décongelés et réjuvénés, les échinocytes apparaissent rapidement avec 37.8% dans l'échantillon 40 secondes après l'activation. La formation d'échinocytes atteint un maximum de 47.47% 60 secondes après le début de l'activation puis commence à former des sphérocytes. Les échinocytes disparaissent en chutant à 34.95% à 140 secondes et à 16.48% 2 minutes 30 secondes après l'activation (***Figure 42*** **B**).

Concernant les GRs OHSt, les échinocytes semblent se former plus lentement durant la première phase relative à l'influx de calcium, puisque 60 secondes après le début de l'activation, il n'y a que 3.92% d'échinocytes. Cependant, et contrairement aux GRs témoins, les échinocytes n'évoluent pas en sphérocytes puisqu'après 2 minutes 30 d'activation, il y a toujours 52.22% d'échinocytes. Cette tendance est confirmée avec la prise en lumière blanche et à la fin de la stimulation des GRs de chacun des phénotypes.

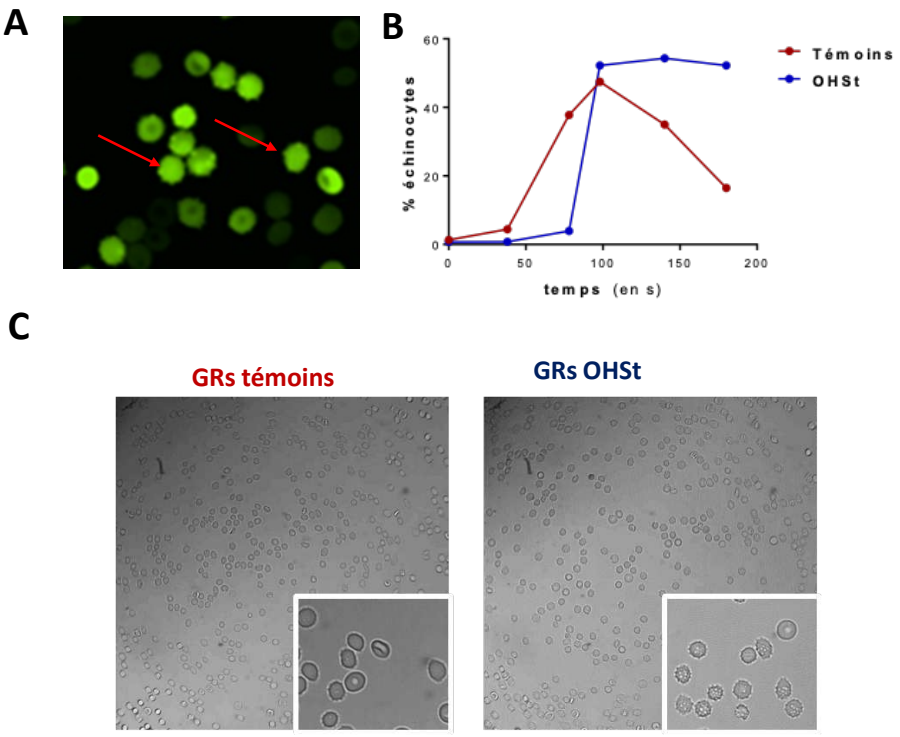


Figure 42 *: Formation des échinocytes liée à l'influx de calcium suite à l'activation par Yoda1 sur des GRs témoins et OHS (**A**) Image de microscopie à fluorescence des GRs marqués avec la sonde calcique Fluo4-AM 60 secondes après le début de l'activation, au maximum de présence d'échinocytes (indiqués par les flèches rouges) (**B**) Pourcentage d'échinocytes en fonction du temps après activation de Piezo1 par Yoda1 (**C**) Image en lumière blanche des GR témoin et OHSt après l'enregistrement de l'influx calcique*

Les mécanismes mis en jeu semblent associés à la déshydratation du GR provoquée par l'activation du canal Gardos. La fuite cationique observée pour les GRs OHSt compenserait la perte de potassium jusqu'à 60 secondes après l'activation. Après 60 secondes, le GR OHSt semble quand même se déshydrater. Cela suggère que d'autres ions que le Ca^{2+}, comme le Na^{+}, pourraient intervenir, Piezo1 n'étant pas un canal sélectif. Cela serait mesurable en électrophysiologie.

Cependant, étant donné la faible quantité de GRs OHSt congelés, de tels tests en électrophysiologie seront possibles dès que de nouveaux prélèvements seront disponibles. En attendant, nous avons décidé d'utiliser des cellules K562, en particulier les clones stom+ et stom- disponibles et amplifiables.

L'activation chimique de Piezo1 par Yoda1 dans les clones stom+ et stom- génère des courants similaires

Afin de déterminer si l'inactivation de Piezo1 dans les GRs déficients en stomatine (OHSt) est également observée dans les cellules K-562 invalidées pour l'expression de la stomatine (stom-), les courants ioniques ont été mesurés en électrophysiologie après co-transfection en transitoire du plasmide pcDNA3-Piezo1-FLAG (voir le paragraphe « patients et méthodes ») et de pGFP dans les cellules stom+ et stom-. Antérieurement, ces plasmides avaient été testés après transfection dans les cellules HEK-293, pour l'activation mécanosensible (par pression négative), également en électrophysiologie (voir annexe page 164).

24 à 48 heures après la co-transfection, les cellules stom+ et stom- sont immobilisées sur un puit IBIDI et les cellules GFP+ sont « empalées » à l'aide d'une micropipette en configuration « cellule-entière ». Les canaux potassiques sont bloqués par le Césium contenu dans la solution de la micropipette. Le protocole de rampe en voltage-clamp est enclenché avec des rampes de -120 mV à +80 mV en perfusant successivement la solution extracellulaire, puis la solution extracellulaire contenant 15 μM de Yoda1 et après stabilisation du signal, la solution extracellulaire contenant 15 μM de Yoda1 et 30 μM de Ruthenium Red (RR), inhibiteur de canaux cationiques (Coste et al. 2012). Les courbes I/V sont tracées pour chacune des conditions sur une cellule (***Figure 43*** **A**). Après activation de Piezo1 par Yoda1, le courant augmente pour des voltages extrêmes (courbe noire) en comparaison avec la condition basale (courbe gris clair). De plus le potentiel de réversion augmente à environ +10 mV, en cohérence avec les précédentes mesures d'activité de Piezo1 dans les HEK-293 (Coste et al. 2010). L'inhibition par le RR de Piezo1, provoque, malgré son activation par Yoda1, un retour du courant au niveau basal (courbe gris foncé).

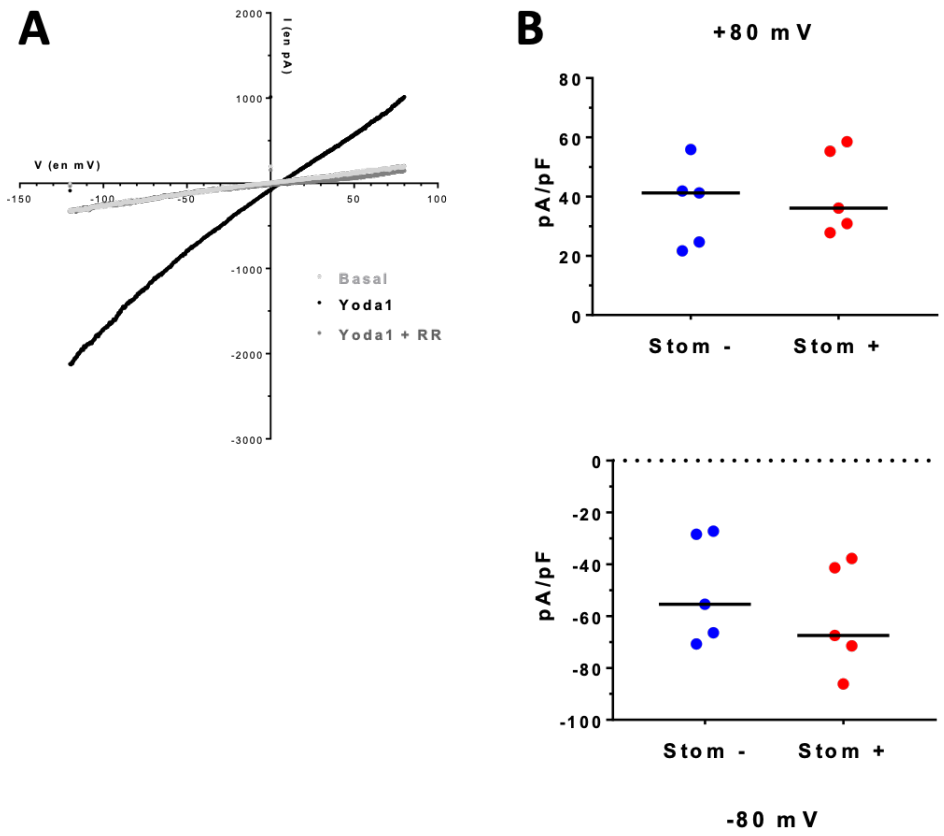


Figure 43 *: Enregistrement en configuration cellule-entière des courants induits par Yoda1 dans les cellules stom + et stom- (**A**) Courbes I/V entre -120 mV et +80 mV d'une cellule perfusée successivement avec une solution extracellulaire (basal, gris clair), avec 15 µM de Yoda1 (Yoda1, noir) et avec 15 µM de Yoda1 et 30µM de Ruthenium Red (Yoda1 + RR, gris foncé). (**B**) et (C) densité relative de courants des cellules stom- (bleu) et stom+ (rouge) répondante à l'inhibition par le RR à +80 mV et -80 mV respectivement*

Sur les cellules répondant à l'inhibition au RR, l'intensité des courants a été mesurée en déduisant l'intensité du courant résiduel obtenu après inhibition par le RR à -80 mV et +80 mV, de l'intensité du courant total induit par Piezo1. Les courants relatifs sont ensuite obtenus en faisant le rapport de cette différence de courant par la résistance membranaire (qui est fonction de la taille de la cellule). La densité moyenne de courant obtenue à -80 mV pour les cellules stom+ était de -60.84 pA/pF, similaire à celle obtenue pour les cellules stom-, -49.65 pA/pF (***Figure 43*** **B**). De même, à +80 mV la densité moyenne de courant obtenue pour les cellules stom+ était de 41.72 pA/pF similaire à celle obtenue pour les cellules stom- de 37.06 pA/pF (***Figure 43*** **B**).

Comme Piezo1 recombinant dans les cellules K562 transfectées n'a pas pu être clairement identifié au cours de notre étude, malgré l'utilisation de différents anticorps anti-Piezo1 et de différentes approches (immunoblot de lysats cellulaires et cytométrie en flux), et afin de vérifier que son niveau d'expression membranaire, comme pour les GRs, est similaire dans les cellules stom- et stom+, nous avons introduit un tag fluorescent dans la protéine recombinante Piezo1.

L'expression de la protéine recombinante Piezo1-mCherry dans les clones K-562 C4 (stom+) et C2 (stom-)

Piezo1 n'est pas exprimé à la membrane des cellules de la lignée K-562. Sur le plasmide pcDNA3.1 Piezo1-FLAG utilisé précédemment, un tag mCherry a été introduit (voir le paragraphe « patients et méthodes ») dans une boucle intracellulaire de la protéine comme décrit par Cox (Cox et al. 2016). La protéine recombinante Piezo1-mCherry obtenue après transfection, permet non seulement le tri des cellules transfectées sur la base de la fluorescence du tag mCherry mais aussi, après perméabilisation, sa détection avec un anticorps anti-mCherry.

Après transfection du plasmide Piezo1-mCherry et stabilisation dans les clones C2 (stom-) et C4 (stom+), l'expression de la protéine recombinante a été étudiée en immunoblot, en cytométrie en flux et en immunofluorecence.

Dans les cellules K562 stom+, l'expression de la protéine recombinante Piezo1-mCherry est vérifiée par immunoblot obtenu à partir de dépôts sur gel de lysats des cellules (WT, ou stom+ non transfectées (nt) ou stom+ transfectées). Après électrophorèse, transfert des protéines sur membrane et incubation de la membrane avec un anti-mCherry, deux bandes sont détectables uniquement dans la piste où a été déposé le lysat cellulaire de cellules transfectées. Une première bande d'un poids moléculaire apparent d'environ 185 kDa pourrait correspondre à un produit d'un clivage de Piezo1 tandis que la seconde, largement au-dessus, pourrait correspondre à la forme non-tronquée de Piezo1-mCherry (***Figure 44*** **A**).

En cytométrie en flux, l'expression de la protéine recombinante Piezo1-mCherry a été également analysée sur deux clones (stom+ et stom-) transfectés (***Figure 44*** **B**).

Sur le clone stom+, la MFI obtenue après incubation avec l'anti-mCherry puis l'anticorps secondaire couplé à l'AlloPhycoCyanine (APC), était de 527, valeur nettement supérieure à la MFI de 41, obtenue après incubations sans anticorps primaire. Sur le clone stom-, la MFI après incubation avec l'anti-mCherry puis l'anticorps secondaire couplé à l'APC était de 477 mais une population négative (18,1%) persistait malgré la sélection des cellules avec l'antibiotique.

En Immunofluorescence, les cellules ont été marquées avec un anti-stomatine couplé à un anticorps secondaire Alexa-Fluor488 (vert) et un anti-mCherry couplé à un autre anticorps secondaire Alexa-Fluor633 (rouge). Les cellules projetées sur une lamelle montée sur une lame dans un milieu de montage contenant du DAPI, ont été observées en microscopie confocale (***Figure 44*** **C**). Comme attendu, les cellules stom+ (***Figure 44*** **C**, 1ère ligne) expriment la stomatine et Piezo1-mCherry, majoritairement à la membrane de la cellule. Les cellules stom- (***Figure 44*** **C**, 2ème ligne) n'expriment pas la stomatine, comme attendu, mais expriment Piezo1-mCherry. Cependant, le marquage de la protéine recombinante ne semble pas être membranaire mais plutôt cytoplasmique.

La protéine recombinante est donc correctement exprimée dans les cellules stom+ mais ne semblent pas correctement adressée à la membrane d'un clone stom-.

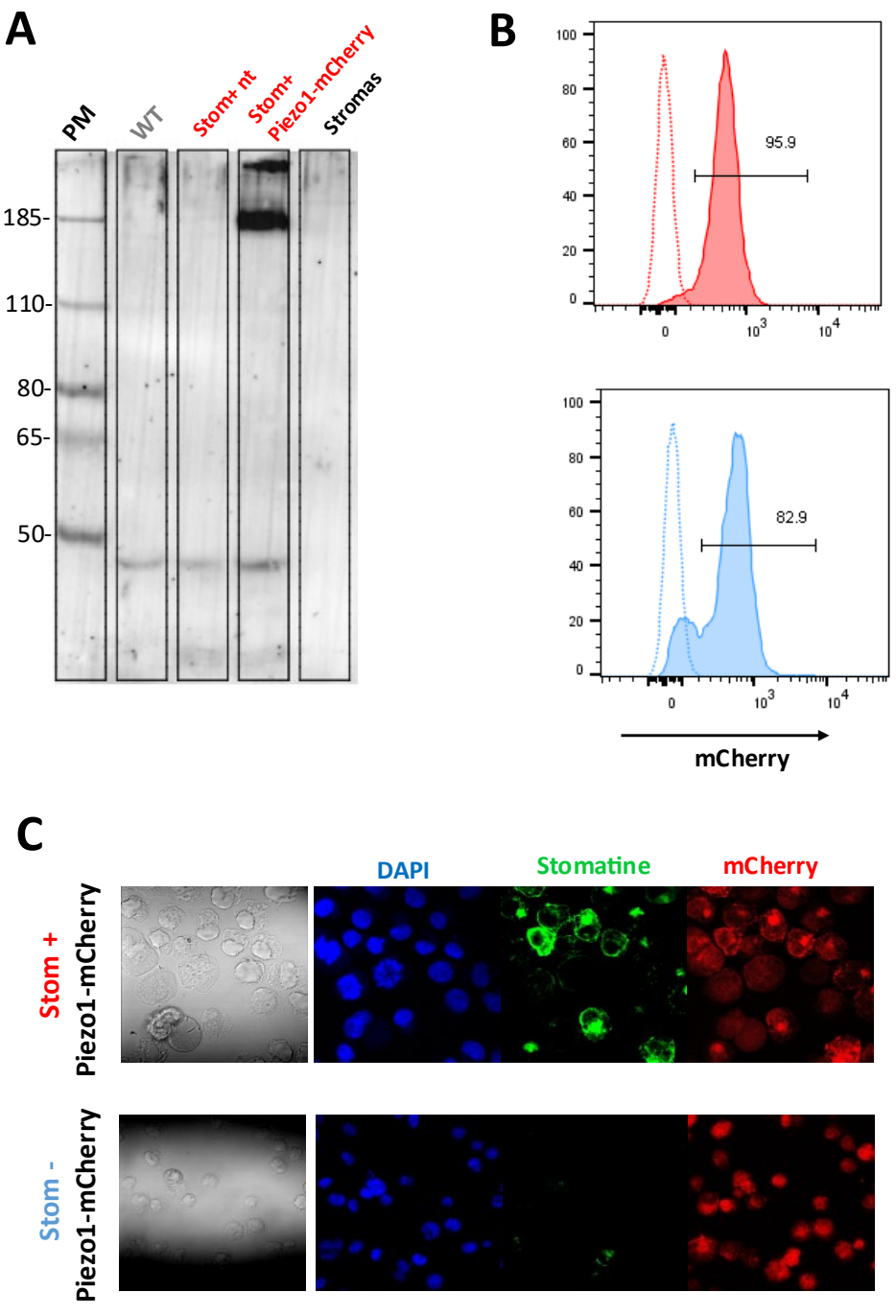


Figure 44 *: Expression et localisation de la protéine recombinante Piezo1-mCherry dans deux clones K-562 stom+ et stom-. (**A**) Immunoblot des lysats de cellules K-562 WT, du clone C4 stom+ non transfecté (stom+ nt), du clone C4 transfecté avec le plasmide pcDNA Piezo1-mCherry (stom+ Piezo1-mCherry) et les lysats de stromas de GRs témoins, incubé avec l'anti-mCherry. (**B**) Histogramme de cytométrie en flux des clones C4 (stom+, en rouge) et C2 (stom-, en bleu) après fixation, perméabilisation et incubation sans anticorps primaires (traits pointillés) ou avec l'anticorps anti-mCherry (trait plein). (**C**) Images d'immunofluorescence des clones stom+ et stom- transfectés Piezo1-mCherry après marquage avec les anticorps primaires anti-stomatine (vert) et anti-mCherry (en rouge). Les cellules ont été montées entre lame et lamelle dans du milieu de montage contenant du DAPI (bleu).*

Etude du complexe stomatine-Piezo1 dans les cellules K-562 transfectées Piezo1-mCherry par Proximity Ligation Assay (PLA) *in situ*

La proximité des protéines stomatine et Piezo1-mCherry a été testée par PLA *in situ* afin de déterminer si Piezo1 recombinant est localisé dans des domaines membranaires où s'exprime la stomatine endogène dans les cellules K-562 transfectées. Le contrôle positif du PLA pour les cellules K-562 a été le couple stomatine-Glut1, l'interaction de ces 2 protéines ayant été déjà décrite (Montel-Hagen et al. 2008).

Le PLA est utilisé dans le clone C4 transfecté selon 3 conditions : sans anticorps primaire (aucun), avec le couple d'anticorps anti-stomatine/anti-glut1 et avec le couple d'anticorps anti-stomatine/anti-mCherry. Les PLA ont été analysés en imagerie en flux (***Figure 45*** **A**) sur 20 000 cellules, après le marquage des noyaux des cellules avec le Hoechst (violet), ainsi qu'en microscopie confocale (***Figure 45*** **B**) après le montage entre lame et lamelles des cellules dans du milieu de montage contenant du DAPI (bleu) marquant le noyau.

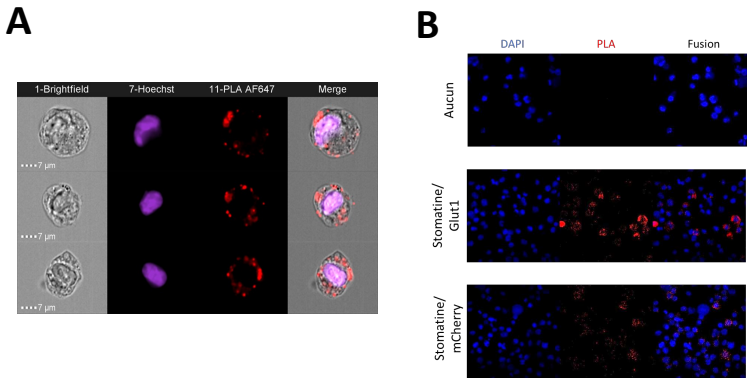
Après analyse des spots à la membrane des cellules stom+ en imagerie en flux (Amnis) (***Figure 45*** **C**, colonne 2 et 3 de la table), la réaction de PLA sans anticorps primaire montrait 1,01% de cellules PLA +, avec une moyenne de 0,63 spot par cellule PLA+. Ces résultats semblent similaires à ceux obtenus en microscopie confocale, avec 3.78% de cellules PLA+ avec une moyenne de 0.6 spots à la membrane des cellules PLA+, pour n=267 cellules acquises.

Pour la réaction de PLA avec le couple d'anticorps anti-stomatine/anti-Glut1, le pourcentage de cellules PLA+ obtenu en imagerie en flux (Amnis) était de 42.28% avec une moyenne de 11.2 spots/cellule PLA+. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus en microscopie confocale dont le pourcentage de cellules PLA+ était de 20.19% et une moyenne 6.47 spots par cellule PLA+ pour n= 229 cellules analysées.

Quand la réaction de PLA est réalisée avec le couple d'anticorps anti-stomatine/anti-mCherry et analysée en imagerie en flux (Amnis), le pourcentage de cellules PLA+ est de 38.58%, ce qui est similaire au pourcentage quand la réaction est faite avec le couple d'anticorps anti-stomatine/anti-Glut1. Cependant le nombre de spot par cellule PLA+ de

6.31 est nettement inférieur au contrôle positif. En microscopie confocale également, le pourcentage de cellules PLA+ dans la condition testée est également similaire au contrôle positif avec 24.84%, mais le nombre de spot est également nettement inférieur, avec 2.8 spots/cellule PLA+.

Ainsi, comme Glut1, la protéine recombinante-Piezo1 semble présente dans les domaines membranaires contenant la stomatine, puisque le pourcentage de cellules PLA+ est similaire. Cependant, tandis que la stomatine et Glut1, sont exclusivement membranaires, la protéine recombinante n'était pas localisée exclusivement à la membrane, comme cela a pu être observé dans les résultats d'immunofluorescence. Ce défaut de localisation de Piezo1-mCherry peut expliquer la diminution du nombre de spots/cellule PLA+ par rapport au contrôle positif stomatine-Glut1.



C

	Amnis		Microscopie	
Anticorps primaire	%cellules PLA +	Nombre de spots/cellule PLA+	%cellules PLA +	Nombre de spots/cellule PLA+
Aucun	1.01	0.64	3.78	0.6
Stomatine/ Glut1	42.28	11.12	20.19	6.47
Stomatine/ mCherry	38.58	6.31	24.84	2.8

Figure 45 *: PLA in situ réalisé sur le clone K562 stom+ (**A**) images d'imagerie en flux des cellules dites PLA+ caractérisées par la présence de spots rouges (PLA-AF647) et dont le noyau a été marqué au colorant Hoechst (violet). (**B**) Images de microscopie confocale des cellules après les réactions de PLA réalisées avec aucun anticorps primaire, avec les anti-stomatine et anti-Glut1 (Stomatine/Glut1) ou avec les anti-stomatine et anti-mCherry (Stomatine/mCherry). Le noyau des cellules est marqué au DAPI (bleu). (**C**) Table des résultats obtenus en imagerie en flux (Amnis) et en microscopie confocale après un PLA réalisé sans (aucun) ou avec les couples d'anticorps primaires anti-stomatine/anti-Glut1 et anti-stomatine/anti-mCherry. Le pourcentage de cellules PLA+ correspond à la proportion de cellules (identifiée par leur noyau) ayant un signal positif en AF647 pour l'Amnis ou ayant visuellement des spots pour la microscopie confocal. Le nombre de spots/cellule PLA+ correspond au nombre de spot déterminé par le logiciel IDEAS à l'Amnis ou Fiji en microscopie confocale par rapport au nombre de cellules PLA+.*

3. DISCUSSION DE L'AXE II

Expression de Piezo1 dans un contexte érythroïde

Depuis son identification en 2010 par Bertrand Coste et ses collaborateurs, le canal mécanosensible Piezo1 a été sujet à de très nombreuses études. Dans le GR, il a été identifié comme un acteur majeur de la régulation de l'hydratation de la cellule dans un contexte pathologique (Zarychanski et al. 2012).

En protéomique, durant l'érythropoïèse, une étude a déterminé le niveau d'expression de Piezo1 à chaque stade pour une érythropoïèse (Gautier et al. 2016) (***Figure 46***).

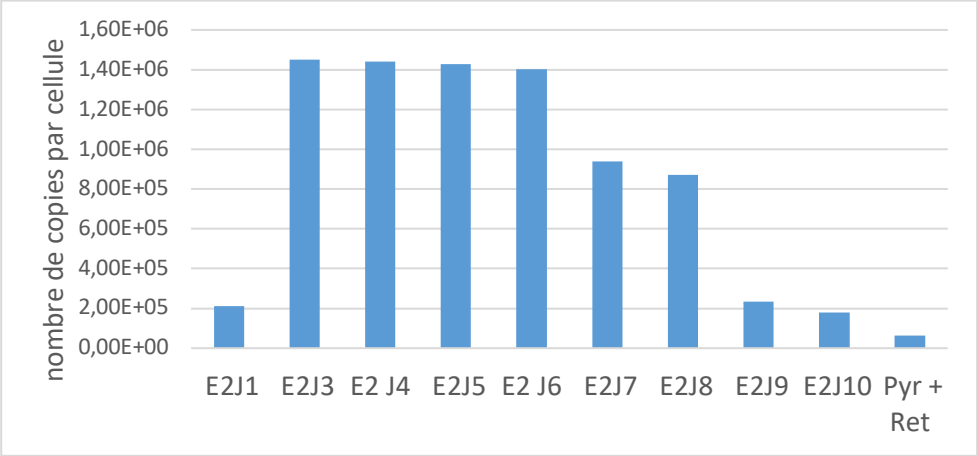


Figure 46 *: Histogramme représentant l'expression de Piezo1 au cours de la différenciation érythroïde de progéniteurs CD34+ pour une érythropoïèse. D'après Gautier EF et al., 2016*

Parce que le nombre de copies/GR de Piezo1 à la membrane des GR est très faible, environ 4000 copies, l'étude du niveau d'expression et de la localisation du canal est complexe (Bryk et Wiśniewski 2017).

Les outils de détection de Piezo1 sur le GR étant peu efficaces, des mises au point spécifiques nécessitant une grande quantité de matériel étaient requises. En Immunoblot, en utilisant un premier anticorps (anti-Fam38A), une bande de plus de 250 kDa correspondant à Piezo1 est détectée aussi bien pour les stromas de GRs témoins que pour ceux de GRs OHSt. En cytométrie en flux, un autre anticorps anti-Piezo1

(Novus) dont la spécificité a été validée par le fournisseur sur de cellules KO pour Piezo1 et dont l'incubation préalable avec un peptide spécifique bloque la reconnaissance du canal à la membrane par l'anticorps, a été utilisé sur les stromas de GRs témoins et OHSt. Après l'incubation des stromas de GRs témoins et OHSt avec cet anticorps et le marquage des membranes avec de la Phalloidine-AlexaFluor488, il n'y avait pas de différence entre le niveau d'expression de Piezo1 pour les deux phénotypes de GRs. Afin d'effectuer le test en cytométrie dans ces conditions, la quantité nécessaire de GRs est très importante puisqu'il faut pour chaque test au moins 20 µL de stromas correspondant à peu près 100 µL de culot de GRs.

En ce qui concerne l'expression de Piezo1 dans les cellules de la lignée K-562, aucun peptide correspondant à un fragment de Piezo1 n'a été identifié en spectrométrie de masse (Gautier et al. 2016). De plus, aucun anticorps anti-Piezo1 ou anti-Fam38A n'a permis la détection d'une protéine Piezo1 endogène à la membrane. Une transfection était donc nécessaire pour étudier le complexe membranaire et protéique autour du canal dans ces cellules. Toutefois, tous les anticorps testés ne reconnaissaient pas la protéine recombinante dans les cellules transfectées, que ce soit en immunoblot ou en cytométrie en flux. C'est pourquoi un tag mCherry a été intégré à la protéine, dans une boucle intracellulaire qui n'affecte pas la fonction du canal (Cox et al. 2016). Cependant, l'observation des deux bandes en immunoblot, dont une inférieure à 200 kDa, suggère la présence d'une protéine partiellement clivée dans la cellule stom+. Les analyses de cytométrie en flux permettent, quant à elles, de déduire que le niveau d'expression de la protéine recombinante est similaire dans les cellules stom+ et stom-. Cependant une population mCherry négative persistait dans les cellules transfectées stom-.

Pour l'étude de l'expression de Piezo1 endogène et recombinant, nous avons développé des outils et des protocoles qui se sont avérés très utiles pour l'étude du complexe stomatine-Piezo1.

Complexes membranaires stomatine-Piezo1 dans les cellules K562 et dans les globules rouges

Dans les cellules K-562, pour le clone stom-, après le marquage en immunofluorescence de la stomatine et de mCherry, il semble que la protéine ne soit pas correctement adressée à la membrane mais serait plutôt intracytoplasmique, au contraire de ce qui est observé avec le clone stom+. Afin de s'assurer que ce défaut n'est pas un effet « clone », il serait intéressant de transfecter tous les clones stom- avec le plasmide Piezo1-mCherry, ce qui permettrait de vérifier si la stomatine pourrait jouer un rôle dans l'adressage de Piezo1 à la membrane.

Sur le clone stom+, un test de PLA *in situ* a été mis au point afin de déterminer si la stomatine et Piezo1 appartiennent au même complexe en utilisant comme couple d'anticorps un anti-stomatine et un anti-mCherry. L'adaptation du PLA pour une analyse en imagerie en flux donne des résultats plus significatifs que les tests analysés en microscopie confocale. En effet, les avantages de l'imagerie en flux sont que le nombre d'évènements analysés est supérieur (20 000 vs <200), l'analyse est plus rapide et, de plus, il est possible, grâce aux masques membranaires, de compter les spots uniquement à la membrane. Concernant les résultats que nous avons obtenus dans cette étude, les pourcentages de cellules PLA+ étaient similaires pour le couple stomatine/Piezo1-mCherry et le contrôle positif stomatine/Glut1, ce qui atteste d'une proximité entre la stomatine et Piezo1-mCherry. Cependant, la diminution du nombre de spots/cellule PLA+ par rapport au contrôle positif stomatine/Glut1 pourrait résulter de la présence de Piezo1-mCherry non plus exclusivement à la membrane, mais également dans d'autres compartiments dont le réticulum endoplasmique, probablement lié à une surexpression de Piezo1 avec un déséquilibre stœchiométrique entre la stomatine endogène et Piezo1 recombinant. Pour vérifier que la stomatine pourrait contribuer à un meilleur adressage de Piezo1 à la membrane, un PLA sur des cellules surexprimant la stomatine (stom++) pourrait être réalisé. En effet, des études précédentes réalisée au laboratoire ont démontré que, lorsque la stomatine était surexprimée sur des cellules HEK-293 recombinantes transfectées avec la bande 3, le nombre de spots augmentait, mais pas le pourcentage de cellules PLA+ (Genetet et al. 2017b).

Dans les GRs, en raison du faible nombre de copies, et des anticorps commerciaux ne pouvant pas détecter le canal malgré la perméabilisation des cellules ou le démasquage des sites avec de l'acide citrique, la localisation de Piezo1 à la membrane dans notre étude fut complexe. La plupart des travaux sur sa localisation relèvent de modèles computationnels (Chong et al. 2019). Du fait de sa structure, en particulier ces trois longues hélices, Piezo1 serait localisés à des spots très précis de la membrane (Lin et al. 2019). Particulièrement, la courbure optimale de la membrane qui tend à optimiser l'activité de Piezo1 serait localisé dans les cavités/régions « fossettes » du GRs (Svetina, Švelc Kebe, et Božič 2019). *In vitro*, un Piezo1 tagué a été utilisé dans une stratégie de Knockin pour faciliter sa détection de Piezo1 dans les GRs de souris, permettant de déterminer sa localisation membranaire (Vaisey et al. 2022). Dans cette étude, grâce à l'imagerie 2D et 3D haute résolution, il a pu être en effet déterminé que Piezo1 n'interagissait ni avec la spectrine, ni l'actine, ni KCNN4, ni l'AE1.

Dans ces travaux de thèse, la validation de l'anticorps en cytométrie en flux sur les stromas de GRs témoins et OHSt a permis de transposer son utilisation au PLA *in situ.* La proximité de moins de 40 nm entre la stomatine et de Piezo1 a été montrée en imagerie en flux. La réaction n'a pas pu être réalisée sur les stromas de GRs OHSt en raison de la quantité trop importante d'échantillons nécessaire pour tester chaque condition.

Afin de renforcer ces résultats sur l'existence d'un complexe stomatine-Piezo1 dans un environnement natif et sans utiliser de système recombinant, des SMALPs co-enrichis en Piezo1 et en stomatine ont été produits et isolés. La microscopie électronique réalisée sur ces fractions a permis de visualiser de nombreuses nanoparticules de diamètre moyen de 18 et 30 nm, taille compatible avec l'homotrimère de Piezo1. Certaines de ses nanoparticules semblent même former des triples hélices caractéristiques de la structure du canal (Saotome et al. 2018). Après la purification de Piezo1 par immunoprécipitation de ces SMALPs avec un anti-Fam38A, cette technique permettra l'étude de l'environnement natif protéique mais aussi lipidique de Piezo1 endogène au sein du GR.

Impact de la déficience en stomatine sur l'activité de Piezo1 dans un contexte érythroïde

Les nombreuses mutations GOF touchant le gène de Piezo1 (***Figure 47***, violet) ont pour conséquence la déshydratation du GR (Albuisson et al. 2013; Zarychanski et al. 2012). Au contraire, il existe des mutations LOF de Piezo1 *(**Figure 47**,* rouge) qui provoquent chez les porteurs hétérozygotes ou homozygotes des malformations lymphatiques ou une dysplasie lymphatique généralisée (Fotiou et al. 2015). Bien qu'il y ait une perte de l'expression partielle ou complète de Piezo1 à la membrane des GRs, ces mutations ne provoquent pas d'anémie hémolytique, même si des stomatocytes sont observés sur les frottis des patients avec parfois une CCMH diminuée (Andolfo et al. 2013; Martin-Almedina, Mansour, et Ostergaard 2018; Vignes et al. 2022). Les modifications de l'activité de Piezo1 endogène pourraient donc affecter l'hydratation du GR, en particulier dans les conditions pathologiques décrites précédemment.

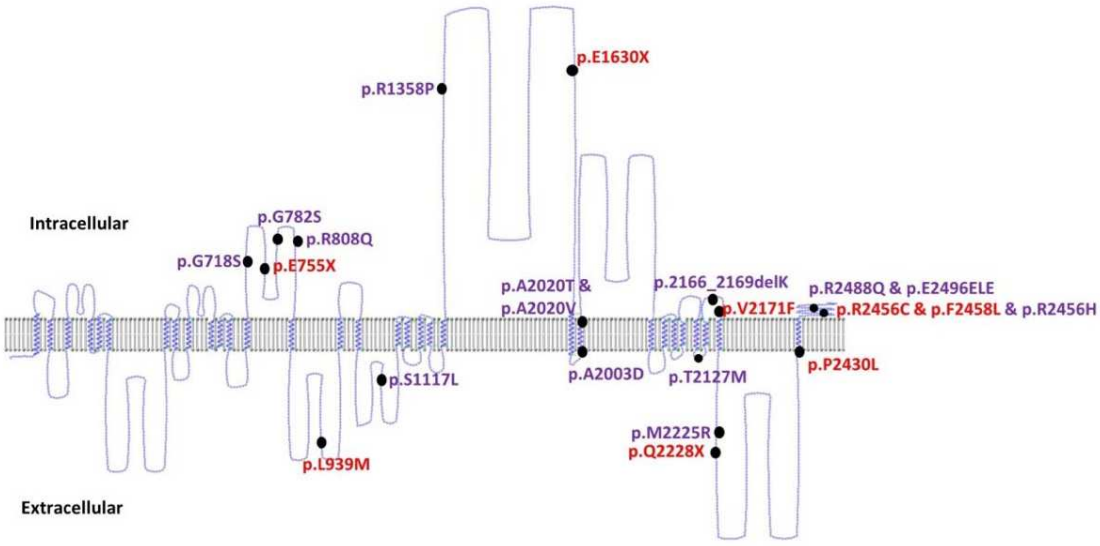


***Figure 47** : illustration de la localisation des mutations GOF (violet) et LOF (rouge) sur la protéine Piezo1 d'après Fotiou et al., Nature com 2015*

Dans cette étude, nous avons investigué les modifications de l'activité de Piezo1 en absence de stomatine dans un contexte érythroïde correspondant à un autre état pathologique au niveau des GR avec une hyperhydratation.

Dans les GRs, le choc hyposmotique induit une activation des canaux ioniques mécanosensible dont Piezo1, et il est possible de suivre l'influx de Ca^{2+} par imagerie calcique (Danielczok et al. 2017). Après décongélation et malgré la réjuvénation, l'activation mécanosensible (par choc hyposmotique) des GRs témoins et OHSt parait similaire en ce qui concerne l'influx de Ca^{2+}. En revanche l'inhibition des canaux ioniques mécanosensibles par la toxine GsMTx4 semble inefficace sur l'influx de Ca^{2+} dans les GRs OHSt. Il y aurait donc dans les GRs OHSt après choc hyposmotique, soit une fuite calcique indépendante des canaux ioniques mécanosensibles, soit une incapacité de la toxine à inhiber les canaux à cause des propriétés de la membrane des GRs OHSt. Pour être active, la toxine doit d'abord interagir avec la membrane, pénétrer le feuillet externe et se positionner à l'interface de ce feuillet et des canaux ioniques mécanosensibles (***Figure 48***) (Gnanasambandam et al. 2017).

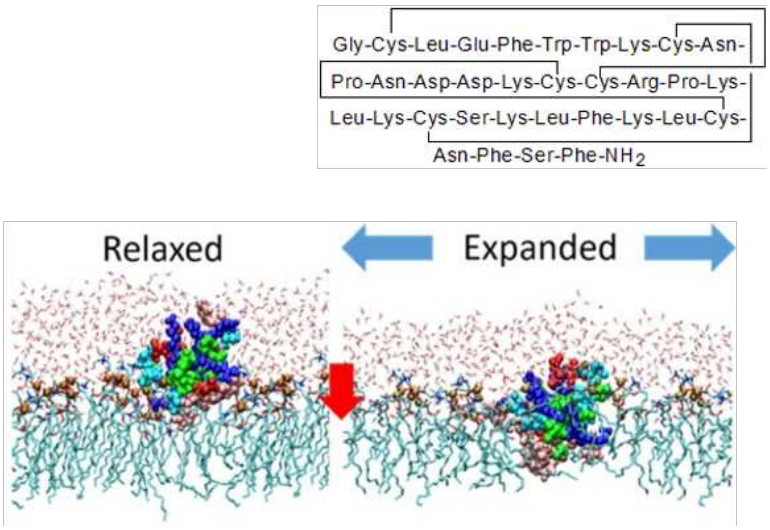


Figure 48 *: Structure du peptide GsMTx4 issu du venin d'araignée, (Gnanasambandam et al. 2017)*

D'autres inhibiteurs non spécifique de Piezo1 ont été utilisé afin d'inhiber les courants ioniques au travers de ce canal : le Rouge de Ruthenium (RR) et le gadolinium (Gd3+) (Coste et al. 2010; 2012). Pour vérifier si la différence observée avec le GsMTx4 dépend de l'inhibiteur ou d'une fuite calcique dans les GRs OHSt, il serait intéressant d'utiliser ces différents inhibiteurs pour tester, en imagerie calcique, l'inhibition de l'influx de calcium dans les GRs OHSt après stimulation par choc hyposmotique.

Afin de déterminer la part d'influx calcique spécifiquement attribué à Piezo1 quand il est activé, les GRs ont été stimulés chimiquement avec Yoda1, peptide permettant l'ouverture de Piezo1 (Syeda et al. 2015). Dans cette étude, la perte d'activité de Piezo1 a été constatée dans les GRs OHSt. Il semblerait également, au regard de la cinétique d'apparition des échinocytes, que le canal Gardos, médiant la déshydratation du GR serait moins efficace. Une étude cinétique de l'hydratation de GRs témoins et OHSt, en utilisant la sonde sodique CoroNa et un inhibiteur de Gardos, TRAM-34 a également été réalisée durant ces travaux de thèse (voir annexe page 160).

Afin de compléter cette étude, un modèle cellulaire permettant d'étudier les courants ioniques totaux générés à la suite de l'activation de Piezo1 a été utilisé. Les clones K-562 stom- et stom+ ont été analysés en patch-clamp en configuration cellule-entière. Après la transfection transitoire de Piezo1, dont l'activité mécanosensible avait été préalablement validée dans la même configuration, mais après stimulation par pression négative (voir annexe page 164), les courants ioniques ont été mesurés après activation avec Yoda1. Aucune différence n'a été détectée entre la densité de courant de cellules répondant au RR lorsqu'on compare les cellules stom+ et stom-. La surexpression de Piezo1 ne permettrait pas de constater de différence. Afin de conserver un rapport stœchiométrique entre Piezo1 et la stomatine plus proche de celui observé dans le GR où la stomatine est très fortement exprimée à la membrane contrairement à Piezo1, des cellules surexprimant la stomatine ont été générées après transfection et stabilisation du plasmide pCEP4 Stomatine (voir annexe page 165). Des travaux très préliminaires avec ces cellules surexprimant la stomatine ont révélé, dans des tests de patch-clamp, des courants ioniques très faibles mais la mortalité de ces cellules était très élevée.

Dans les cellules K562 stom+ et stom-, l'activation mécanique par pression négative n'a pas pu être abordée dans ces travaux. Cependant, si l'activation par Yoda1 permet bien d'observer des cinétiques d'activation, celles de la désactivation du canal ne peut pas être déterminée en présence de l'agoniste.

Or pour les Xérocytoses associées à des mutations GOF de Piezo1, l'augmentation de l'activité est liée à une désactivation inefficace qui ne peut être observée qu'après un choc mécanique (Bae et al. 2013).

Après enregistrement de courants générés par ce type de stimulation, des paramètres sur l'énergie nécessaire (intensité de la pression) et sur la cinétique du passage de l'état ouvert à l'état fermé peuvent être relevés sur la courbe de l'intensité des courants en fonction de la pression de la micropipette exercée à la membrane. Il serait intéressant pour les cellules stom- de regarder un éventuel changement de ces paramètres en comparaison avec des stom+.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. EXPRESSION DE LA STOMATINE DANS UN CONTEXTE ERYTHROÏDE

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser deux modèles cellulaires afin d'étudier l'interaction de la stomatine (ou bande 7.2b) avec les canaux ioniques mécanosensibles dans un contexte érythroïde : les GRs et les cellules de la lignée érythroleucémique K-562.

Concernant **les GRs** il existe deux pathologies érythrocytaires associées à la déficience en stomatine : la stomatocytose héréditaire à hématie hyperhydratée (OHSt) et la CryoHydroCytose de type II (CHC II). Pour cette dernière, les symptômes liés à la mutation de Glut1 affectent également le cerveau. En effet, en plus des troubles hématologiques liées à l'anémie hémolytique, les patients CHC II sont également atteints de troubles neurologiques. Les GRs de patients OHSt constituent un modèle plus approprié à l'étude du rôle de la stomatine sur l'activité des canaux PANX1 et Piezo1, car la déficience en stomatine n'affecte que les GRs matures et non d'autres cellules ou tissus, et les symptômes concernés ne sont liés qu'à des troubles érythrocytaires.

Pour cette membranopathie du GR avec déficience en stomatine, le gène *STOM* codant pour la stomatine n'est pas muté mais la pathologie est associée à des mutations sur le gène *RHAG* codant pour la glycoprotéine associée au Rh, protéine transporteuse d'ammoniac (Bruce et al. 2009). Il n'y a pas de site d'interaction connu de la stomatine et de la protéine RhAG, mais la disparition de la stomatine serait probablement associée à la perte d'une partie de la membrane contenant cette protéine au cours de l'énucléation. En effet, la stomatine est présente à la membrane des progéniteurs érythroïdes, dans la moelle osseuse des patients OHSt (Fricke et al. 2005).

Des immunoblot sur des membranes de GRs OHSt ont confirmé la persistance de marqueurs d'organelles : mitochondrie, reticulum endoplasmique et lysosome (respectivement VDAC1, la calreticuline et LAMP2) (Stevens-Hernandez et al. 2022), ce qui attesterait d'un retard de maturation des GRs OHSt. La stomatine jouerait donc également un rôle dans la vésiculation inefficace des réticulocytes de patient OHSt, ce qui entrainerait un retard dans la maturation en GR humain (Ulrich Salzer et al. 2008; Wilkinson et al. 2008).

Tandis que le KO de la stomatine chez la souris n'aboutit à aucun désordre de l'érythropoïèse (Zhu et al. 1999), le cas d'un enfant présentant un épissage aberrant sur le gène STOM a été reporté (Argent et al. 2004). Ce phénotype aboutit à une absence de la stomatine sur la membrane des GRs ainsi que de nombreux défauts d'érythropoïèse.

Dans les **cellules de la lignée K-562** WT, la stomatine est exprimée de manière endogène, comme démontrée précédemment en protéomique, comptant plus de $2x10^6$ copies/cellule (Gautier et al. 2016). Dans notre étude, nous avons également confirmé par cytométrie en flux l'expression de la stomatine dans les cellules K-562 en utilisant l'anticorps anti-stomatine précédemment validé sur les membranes de GRs déficients en stomatine.

Avant d'invalider l'expression de la stomatine par CRISPR Cas9, nous avons vérifié, sur le caryotype des cellules K-562, que le gène était porté par seulement une paire de chromosome (Naumann et al. 2001). Nous avons également observé que le gène *STOM* est localisé sur le chromosome Philadelphia, mais en amont du gène BCR/Abl associée à la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) et à l'origine de la lignée cellulaire K-562 (P. G. Gallagher et al. 1993; Lozzio et Lozzio 1975).

Après l'invalidation de la stomatine, par CRISPR-Cas9, les cellules transfectées ont été stabilisées, puis un clonage de ces cellules par dilution limite a permis la génération de clones stom- et stom+. La taille des cellules des clones stom-, l'apoptose et la prolifération n'est pas altérée par la déficience en stomatine (voir Annexe page 150). Cependant, la stomatine est connue pour être localisée dans les radeaux lipidiques ou microdomaines enrichis en cholestérol (U. Salzer et Prohaska 2001), tout comme le ganglioside GM1 qui permet de suivre la formation de ces radeaux *in vitro* par immunofluorescence au niveau cellulaire. Des résultats préliminaires sur la présence de radeaux lipidiques dans nos clones stom+ et stom- semblent indiquer que la déficience en stomatine affecterait ces radeaux, puisque des différences significatives sont observées sur le nombre de spots et l'intensité de fluorescence associée au marquage

du GM1 (voir Annexe page 153). Ces résultats seront à mettre en relation avec d'éventuelles modifications de l'expression, de l'adressage à la membrane, de l'assemblage et l'activité de complexes faisant intervenir des partenaires de la stomatine.

2. Complexe proteique d'interaction de la stomatine avec Pannexine1 (PANX1) ou Piezo1

Il a été démontré antérieurement aux travaux de cette thèse et dans des contextes non-érythroïdes que les canaux ioniques mécanosensibles PANX1 recombinants et Piezo1 interagissent respectivement avec la stomatine recombinante et STOML3, deux protéines de la famille des stomatines (Zhan et al. 2012; Poole et al. 2014). Par ailleurs, d'autres canaux ioniques ont été décrits comme interagissant avec des homologues de la stomatine. C'est le cas de MEC-4/MEC-10 chez le vers *C elegans* et ASIC-3 dans les neurones qui interagissent avec et sont régulés par les homologues de la stomatine MEC-2 et STOML3 respectivement (Huang et al. 1995; Wetzel et al. 2007). Il a ainsi été décrit une conservation du système de mécanotransduction chez le nématode *C. elegans* et chez les mammifères (Cheng, Jiang, et Chen 2018) (***Figure 49***). Les interactions stomatines-canaux ioniques peuvent donc potentiellement être associées à une régulation mécanosensible des flux ioniques dans différents organismes. Dans notre étude, la présence à la membrane du GR des deux canaux mécanosensibles PANX1 et Piezo1 nous a conduit à considérer, dans un premier temps, l'existence de complexes protéiques potentiels entre la stomatine érythrocytaire et ces deux canaux.

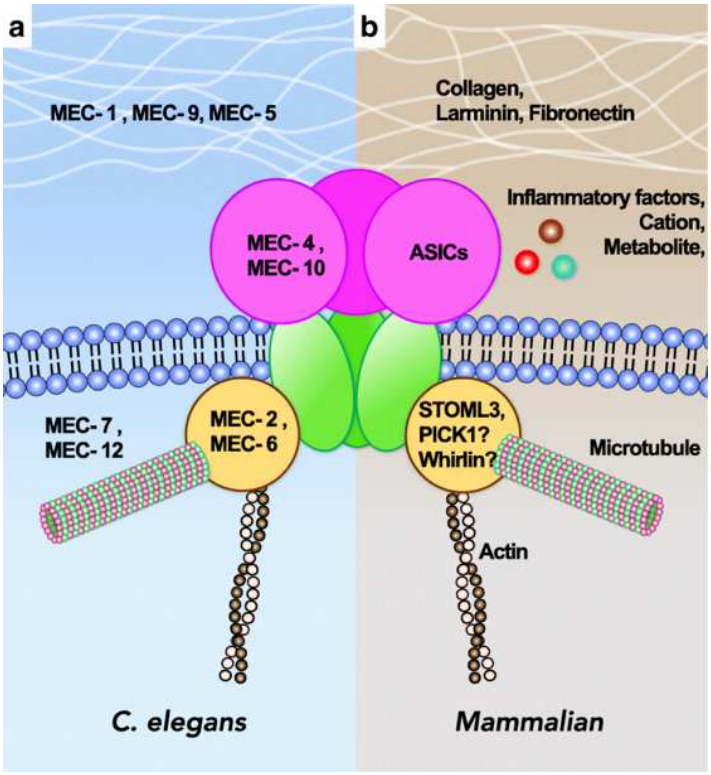


***Figure 49** : Conservation du système de mécanotransduction à force appliquée au cytosquelette chez le nématode C. elegans et chez les mammifères. Figure extraite de (Cheng, Jiang, et Chen 2018)*

Dans notre étude, nous avons utilisé le PLA *in situ* pour étudier la proximité des canaux ioniques mécanosensibles PANX1 et Piezo1 à la stomatine, dans les GRs et les cellules de la lignée érythroïde K-562. L'analyse par imagerie en flux a permis de quantifier, pour la première fois sur les GRs et les stromas, le pourcentage d'évènements positifs pour un nombre d'évènements supérieur à 5 000, ce qui n'était pas possible par l'analyse d'image de la microscopie confocale. Sur les cellules K-562, nous avons, en plus du pourcentage d'évènements positifs, quantifié le nombre de spots par cellules sur les évènements positifs, ce qui pourrait constituer un bon outil pour étudier l'adressage à la membrane des protéines en interaction avec la stomatine, dans un contexte où ces protéines partenaires de la stomatine sont surexprimées et qu'il est possible de moduler le niveau d'expression de la stomatine.

Néanmoins, le PLA, qui prouve une proximité inférieure à 40 nm entre les protéines étudiées, ne permet pas de conclure à une interaction directe de la stomatine avec PANX1 ou Piezo1.

La question d'une interaction directe se pose davantage pour l'interaction stomatin/Piezo1 que stomatin/PANX1. En effet, des études précédentes avaient pu démontrer *in vitro* une interaction entre l'extrémité C-terminale de PANX1 et celle de la stomatine (Zhan et al. 2012). Dans un complexe membranaire, une interaction directe peut aussi être mise en évidence par la nécessité d'exprimer certains partenaires pour la mise en place de l'ensemble du complexe à la membrane.

Aussi, lors de la transfection des cellules K-562 avec un plasmide Piezo1-mCherry, nous avons suivi l'expression et la localisation du canal dans un contexte érythroïde, avec des cellules stom+ et stom-. Or, dans des expériences préliminaires, la protéine Piezo1-mCherry recombinante semblait, dans un clone stom-, être maintenue dans le compartiment intracytoplasmique plutôt qu'exprimée à la membrane. Un tel défaut d'adressage du canal en absence de stomatine, si celui-ci s'avère être reproduit ultérieurement sur l'ensemble de nos clones stom-, pourrait renforcer l'hypothèse d'une interaction directe stomatine-Piezo1.

Dans le cas d'une interaction directe entre la stomatine et un canal ionique, le modèle de force appliquée au cytosquelette pourrait expliquer les modifications d'activité observées en absence de stomatine. En effet, la stomatine érythrocytaire interagit avec l'actine dans le GR (Rungaldier et al. 2013; Wilkinson et al. 2008). La stomatine érythrocytaire pourrait jouer alors un rôle de relai mécanosensible entre le cytosquelette de spectrine et d'actine. Ce mécanisme moléculaire de régulation a été observé pour les canaux ioniques ASICs chez les mammifères, et MEC-4 et MEC-10 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (***Figure 49***).

3. REGULATION DE L'ACTIVITE DES CANAUX IONIQUES MECANOSENSIBLES PAR LA STOMATINE DANS UN CONTEXTE ERYTHROÏDE

Précédemment à cette thèse, l'activité des canaux MEC-4/MEC-10 et ASIC3 a été investiguée dans un contexte non-érythroïde en présence de stomatines, respectivement MEC-2 et STOML-3 (Goodman et al. 2002; Brand et al. 2012). Quand la stomatine (ou bande 7.2b) est transfectée dans les cellules exprimant les ASICS, son

interaction avec les différentes sous-unités (ASIC1a, ASIC2a ASIC3) entraine des effets différents sur leur activité mesurée par électrophysiologie en configuration « cellule entière » (Price et al. 2004). Alors que dans les cellules COS transfectées, la stomatine recombinante inhibe intégralement les courants générés par la diminution du pH extracellulaire des ASIC3, pour les canaux ASIC1a et ASIC2a, la stomatine accélère la désensibilisation, sans diminution de l'intensité du courant.

Dans nos investigations, l'activité des canaux ioniques mécanosensibles PANX1 et Piezo1 a été étudiée, par un panel de méthodes permettant la mesure de flux ioniques, comprenant la bioluminescence pour la quantification du relargage d'ATP, la cytométrie en flux pour l'évaluation de la perméabilité à des molécules anioniques ou cationiques fluorescentes, l'imagerie calcique en microscope pour une quantification relative des flux d'ions Ca^{2+} intracellulaire et l'électrophysiologie.

Dans les GRs décongelés, malgré une réjuvénation, l'activation des canaux ioniques mécanosensibles par choc hypoosmotique n'a pas permis d'observer des différences d'activité entre les GRs témoins (stom+) et OHSt (stom-). La fuite cationique ainsi que l'augmentation de la fragilité osmotique observée dans les GRs OHSt pourrait masquer des différences de flux ioniques à travers ces canaux. Comme alternatives au choc hyposmotique, nous avons utilisé des stimulations (potassium extracellulaire pour la PANX1 et Yoda1 pour Piezo1) permettant une ouverture de ces canaux similaire à celle obtenue par activation mécanique.

Dans le GR, l'activation de la PANX1 a été décrite selon 2 modes : l'ouverture à faible conductance, de quelques dizaines de pS et ne permettant le passage que d'anions tels que le chlore et l'ouverture à large conductance de l'ordre de plusieurs centaines de pS permettant le passage non sélectif d'espèces ioniques. Ce 2ème mode d'activation est permis à la fois par des stimuli mécaniques et par le K^+ extracellulaire (Wang, Jackson, et Dahl 2018) et conditionne le passage d'ATP, de carboxyfluoresceine et de TO-PRO-3.

Pour l'activité de Piezo1, un agent chimique, Yoda1 a été décrit comme activant spécifiquement Piezo1 (Syeda et al. 2015). Cette molécule s'insère dans le bras du

canal générant une tension suffisante à l'ouverture du pore. Ce mouvement est le même que celui décrit pour une activation mécanique (Botello-Smith et al. 2019).

Pour ces deux activations non mécaniques mais activant similairement les canaux mécanosensible Piezo1 et PANX1, notre étude a montré une diminution de l'activité de ces canaux en absence de stomatine.

Dans les cellules K-562, l'activité mécanosensible du canal PANX1 mesurée par l'entrée de TO-PRO-3 est diminuée pour les cellules stom- en comparaison avec les cellules stom+, confirmant les résultats observés sur les GRs.

Contrairement à nos travaux démontrant le rôle de la stomatine sur l'activité de PANX1 dans les GRs, nos études sur l'activité de Piezo1 ne nous permettent pas actuellement de clairement trancher sur l'impact de la stomatine. En dehors de la stimulation par choc osmotique sur GRs décongelés qui ne semblent pas efficace, ni pour les mesures d'activité de PANX1 ni pour celles de Piezo1, nous avons utilisé une simulation chimique de Piezo1 avec Yoda1. Si nos premiers résultats, encore préliminaires, utilisant cet agoniste en imagerie calcique sur les GRs témoins et OHSt semblent révéler des différences dans l'activation du canal (en particulier en termes de cinétique et d'amplitude), il nous parait évident que ce type de d'activation présente certaines limites. En effet, Yoda1 permet d'obtenir une ouverture de Piezo1, mais la fermeture rapide du canal ne peut pas être étudiée avec cet agoniste qui pénètre durablement au niveau de la protéine. Or, Piezo1 est un canal mécanosensible dont l'ouverture est transitoire et c'est précisément le retour à l'équilibre par fermeture du canal qui se trouve ralenti dans les Xérocytoses caractérisées par des mutations de Piezo1 (Bae et al. 2013).

L'utilisation d'une stimulation par pression en électrophysiologie sur nos cellules K-562 stom+ et stom- exprimant Piezo1 recombinant serait peut-être plus adaptée à l'étude du rôle de la stomatine sur l'activation de Piezo1. La stomatine serait alors plutôt impliquée dans des mécanismes d'activation rapide.

4. IMPLICATION DES LIPIDES DANS LES COMPLEXES STOMATINES-CANAUX IONIQUES MECANOSENSIBLES ET LEUR ACTIVITE

De nombreuses études sont en faveur du modèle d'activation des canaux ioniques mécanosensibles dépendante des forces appliquées à la membrane uniquement (Cox, Martinac, et Navis 2017). Pour l'équipe de Martinac, l'environnement membranaire à lui seul suffirait à l'activation des canaux tels que les MscL ou Piezo1. Ainsi, des courants ioniques induits par la pression sur des bourgeons de membrane dépourvus de cytosquelette ont été enregistrés (Cox et al. 2016), semblant mettre le squelette membranaire hors-jeu.

Dans ce contexte, l'implication de la stomatine dans la modulation des canaux ioniques pourrait être questionnée.

Dans les cellules neuronales et les cellules HEK-293 transfectées, l'homologue de la stomatine, STOML-3 participe à la rigidification de la membrane améliorant les courants induits par pression mécanique à la membrane et donc potentialise l'activité des canaux ioniques mécanosensibles (Qi et al. 2015).

De plus, la stomatine érythrocytaire est localisée, comme la MEC-2, dans les radeaux lipidiques également appelés microdomaines enrichis en cholestérol (Huber et al. 2006; Snyers, Umlauf, et Prohaska 1999). Ces domaines ont été caractérisés après fractionnement des membranes de GRs en gradient de densité (U. Salzer et Prohaska 2001) et la localisation de ces domaines semblent être conditionnés par la présence de la stomatine. Cette méthode a pu déterminer notamment la délocalisation du co-transporteur polypeptidique de sodium taurocholate ou du transporteur Glut1 dans des systèmes de KnockDown ou de surexpression de la stomatine (Appelman et al. 2020; Yan et al. 2018).

Les canaux ioniques mécanosensibles PANX1 et Piezo1 en interaction avec la stomatine pourrait être localisés dans ces microdomaines, et la perturbation de ces derniers pourraient avoir des effets sur la localisation de ces canaux ioniques à la membrane et, par conséquence, sur leur fonction.

Le Méthyl-β-cyclodextrine (MBCD) est un agent permettant la déplétion du cholestérol à la membrane et affectant par conséquent les microdomaines (Zidovetzki et Levitan 2007). Il a permis d'identifier le cholestérol comme un lipide clé pour la stabilisation et la fonctionnalité de canaux ioniques mécanosensibles. Or, plusieurs sites de liaison au cholestérol sur le canal Piezo1 recombinant ont été identifiés (Buyan et al. 2020). La présence du cholestérol dans les complexes membranaires contenant Piezo1 pourrait par ailleurs être vérifiée par des études lipidomiques sur les SMALPs produits lors de cette thèse. De plus, les stomatines contiennent également un motif consensus de reconnaissance/ interaction avec le Cholesterol (**C**holesterol **R**ecognition/interaction **A**mino acid **C**onsensus, **CRAC**) dans leur domaine intramembranaire (Lapatsina et al. 2012). Par ailleurs, une publication récente indique que l'interaction entre STOML-3 et Piezo1 pourrait se faire par l'intermédiaire du cholestérol (Qi et al. 2015).

Dans notre étude, les cellules stom+ transfectées avec Piezo1-mCherry pourrait être traitées avec cet agent réducteur du cholestérol, le MBCD, avant la réalisation d'un PLA, afin d'observer de potentielles différences entre les cellules traitées ou non. De même, PANX1 étant également localisée dans les radeaux lipidiques, un PLA sur les cellules stom+ traitées ou non avec la MBCD pourrait également être réalisé. Des différences dans le pourcentage des cellules PLA+ ou dans le nombre de spots par cellule pourrait traduire un éloignement des protéines.

Enfin, le cholestérol a été démontré comme pouvant également affecter l'activité des canaux ioniques mécanosensibles, notamment Piezo1 (Ridone et al. 2020). Un traitement des cellules avec la MBCD pourrait donc être réalisé afin de mesurer l'impact du cholestérol sur l'activité de la PANX1 et sur l'activité de Piezo1, en utilisant les tests fonctionnels décrits dans cette thèse, à savoir le relargage d'ATP et la perméabilité aux sondes pour PANX1 et l'imagerie calcique de GRs individualisés pour Piezo1.

5. INTERACTIONS FONCTIONNELLES ENTRE LA PANX1 ET PIEZO1 DANS LE GR ?

Le GsMTx-4 extrait du venin de tarentule *Grammostola spatulata* est un peptide qui, se logeant dans la membrane lipidique, inhibe l'activité des canaux mécanosensibles

notamment Piezo1 (Suchyna 2017), mais aussi probablement PANX1, vraisemblablement de manière indirecte (Cinar et al. 2015).

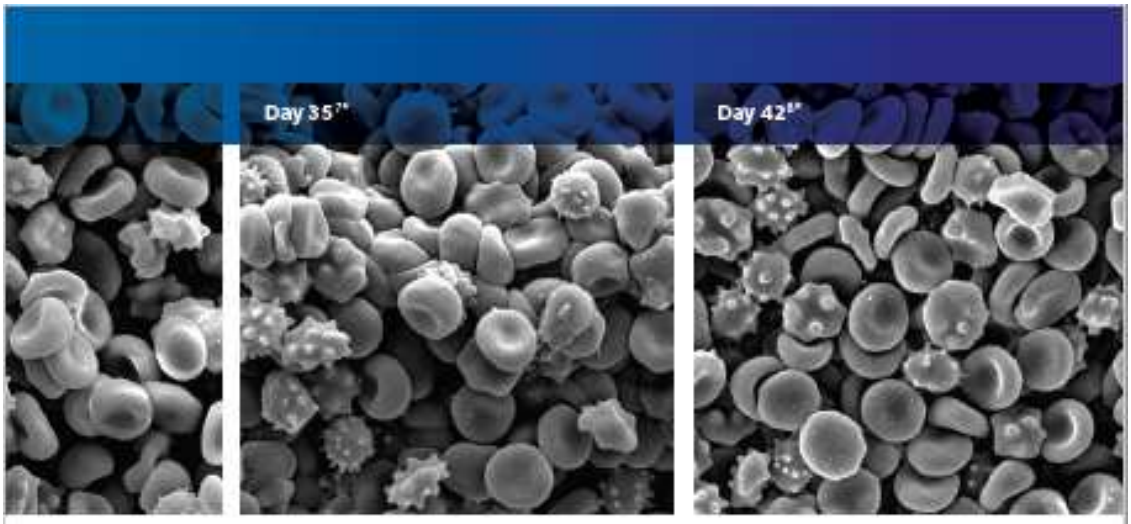
Dans notre étude, des travaux préliminaires sur le relargage d'ATP par les GRs ont également confirmé l'efficacité de cet inhibiteur sur l'activité de la PANX1 de GRs témoins (voir annexe page 166).

Cependant, nous avons montré que ce peptide n'est pas efficace dans l'inhibition de l'activité de Piezo1 dans les GRs OHSt. Or, il serait intéressant de tester l'affinité de l'inhibiteur pour les membranes de GRs OHSt. En effet, si PANX1 de la membrane des GRs OHSt se trouve inhibée par le GsMTx-4, cela pourrait nous informer sur une inhibition spécifique de PANX1. Cette situation ne serait pas, par ailleurs, en faveur d'une impossibilité de fixation de l'inhibiteur sur la membrane des GRs déficients en stomatine, une des hypothèses évoquées précédemment pour la non-inhibition de Piezo1 dans les GRs OHSt. En revanche, une absence d'inhibition de la PANX1 des GRs OHSt ne permettrait pas d'invalider cette hypothèse mais pourrait renforcer une relation d'interdépendance fonctionnelle entre Piezo1 et PANX1.

Puisque ces deux canaux mécanosensibles du GR sont tous deux en interaction avec la stomatine et vraisemblablement aussi avec le cholestérol, il est envisageable qu'il existe un lien physique et fonctionnel qu'il sera intéressant d'investiguer à l'avenir. Cependant, certains de nos travaux préliminaires montrent que l'activation spécifique de Piezo1 par son agoniste Yoda1 ne déclenche que très peu de relargage d'ATP (voir Annexe page 166), en accord avec l'étude récente de l'équipe de Coste (Desplat et al. 2021). Ces résultats suggèrent que cette dépendance fonctionnelle nécessiterait plutôt une déformation mécanique de la membrane et/ou pourrait éventuellement impliquer d'autres canaux ioniques mécanosensibles du GR qui resteraient à identifier.

ANNEXES

FICHE PRODUIT REJUVESOL



rejuvesol Red Blood Cell Processing Solution
restores 2,3-DPG and ATP in stored RBCs to fresh levels.[14]

rejuvesol solution is:

- A sterile, non-pyrogenic solution of sodium pyruvate, inosine, adenine, dibasic sodium phosphate, and monobasic sodium phosphate.[14]
- Designed for the extracorporeal rejuvenation of a unit of RBC concentrate.[14]
- Now approved for immediate transfusion of leukoreduced CPD/AS-1 and CP2D/AS-3 stored Red Blood Cells.



Important Safety Information: rejuvesol Solution is not for direct administration to patients. For in vitro processing of stored RBCs. Rx only. After rejuvenation, RBC must either be washed prior to transfusion or glycerolized and frozen. For details see Package Insert, call 1-800-299-3411 or visit http://www.rejuvesol.com. You are encouraged to report negative side effects of Rx drugs to the FDA. Visit MedWatch4 or call-1-800-FDA-1088. rejuvesol™ is a trademark of Biomet Biologics. Manufactured for Citra Labs, LLC, 55 Messina Drive, Braintree, MA 02184, USA.

References

1. Scanning Electron Microscopic (SEM) pictures of fresh and stored RBCs. **Fresh-day 1:** Whole blood (WB) sample in EDTA was collected on the same day from a different donor that the stored RBCs were processed. **Day 42:** RBCs were stored at 1-6 °C for 42 days as CPD/AS-1 (pre-storage leukocyte-reduced). Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, PA. August 2014 (Unpublished data from bench research).
2. Department of Health and Human Services. The 2011 national blood collection and utilization survey report. Washington, DC: DHHS, 2013
3. Kim-Shapiro DB, et al. Transfusion. 2011;51(4):844-851
4. Day 2: SEM Photo of Leukocyte-Reduced (LR) RBC (CPD/AS-1), derived from 500 mL of Whole blood (WB), and stored @ 1-6 °C for 2 days
5. Day 14: SEM Photo of LR-RBC (CPD/AS-1), derived from 500 mL of WB, and stored @ 1-6 °C for 14 days
6. Day 21: SEM Photo of LR-RBC (CPD/AS-1), derived from 500 mL of WB, and stored @ 1-6 °C for 21 days
7. Day 35: SEM Photo of LR-RBC (CPD/AS-1), derived from 500 mL of WB, and stored @ 1-6 °C for 35 days
8. Day 42: SEM Photo of LR-RBC (CPD/AS-1), derived from 500 mL of WB, and stored @ 1-6 °C for 42 days
9. Doctor A, et al. Semin Perinatol. 2012;36(4):248-259
10. Kim-Shapiro DB, et al. Transfusion. 2011;51(4):844-851
11. Kor DJ, et al. Biorn J Basic Med Sci. 2009; 9(suppl 1):21-27
12. Hess JR. Transfus Apher Sci. 2010;43(1):51-59
13. Valeri, CR, et al. Surg., Gyn, & Obs 1988;166:33-46.
14. rejuvesol Solution IFU FL7000 12/15
15. LR-RBC (CPD/AS-1) that were treated on Day 42 with rejuvesol® Red Blood Cell Processing Solution (50 mL), incubated for 60 minutes in a water bath at 37 °C, washed using Haemonetics model ACP 215, and re-suspended in 0.9%, NaCl, 0.2% Dextrose solution.

* SEM images series (references 4-8 and 15) were prepared from a single unit. Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, PA. August 2014 (Unpublished data from bench research).

ZIMMER BIOMET
Your progress. Our promise.™

CARACTERISATION CELLULAIRE DES CLONES STOM+ ET STOM-

Les clones de cellules K-562 ont été analysés pour des caractéristiques pouvant être affectées par la déficience en stomatine : le volume des cellules et la prolifération des cellules. Ces deux analyses ont été obtenues par le compteur CASY.

Les cellules non transfectées WT ont un volume de 3035 fL, similaire au volume moyen des clones stom+ (3230 fL) et stom – (3060 fL) (***Figure 50***).

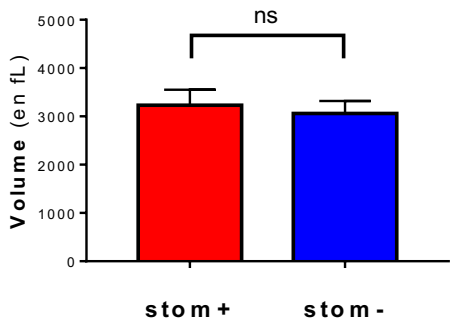


Figure 50 *: Volume cellulaire des clones K-562 stom+ et stom-, n=3, test statistique t-test, ns, non significatif*

Après avoir resuspendu, sur une plaque de 12 puits dans 1mL de milieu, $1x10^5$ cellules K-562 C4 (stom+) et C2 (stom-), ces cellules ont été mises en culture comme décrit dans le « patients et méthodes ». Un comptage est effectué tous les jours pendant 5 jours, en prélevant 50 µL de suspension cellulaire pour analyse au CASY (**Figure 51**). Aucune différence significative entre la prolifération des cellules stom+ et celle des cellules stom- n'a été détectée.

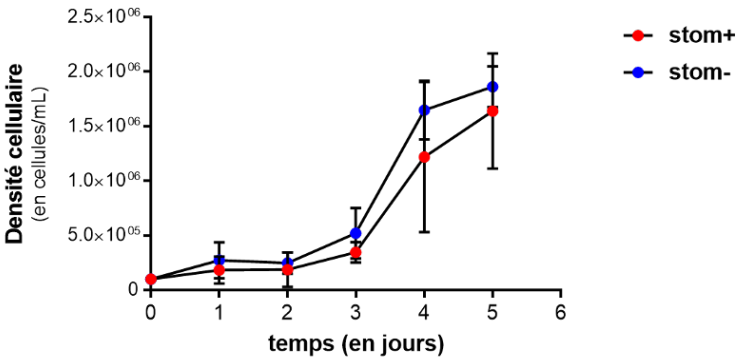


Figure 51 *: Prolifération des cellules K-562 stom+ et stom- sur 5 jours par comptage des cellules viables au CASY. n=3*

MICRODOMAINES DANS LES CELLULES STOM+ ET STOM-

Piezo1 a été décrit comme étant localisé dans les radeaux lipidiques également appelés microdomaines enrichis en cholestérol et ces microdomaines participeraient à l'activité du canal (Ridone et al. 2020). Afin de déterminer une éventuelle perturbation de ces domaines en absence de stomatine et l'impact potentiel sur la localisation de Piezo1 (et par conséquent sur sa fonction), les radeaux lipidiques ont été marqués avec la sous-unité β de la toxine du Cholera (CTB). Ce peptide se lie au ganglioside GM1, marqueurs des radeaux lipidiques (van Heyningen 1974).

$1x10^6$ cellules des clones K-562 stom– ou stom+ ont été lavées par centrifugation (1200 rpm, 5 minutes à température ambiante). Le CTB couplé à l'AlexaFluor594 (Thermofisher) et dilué au 1/250 dans du PBS est incubé pendant 20 minutes dans la glace avec les cellules. Après deux lavages par centrifugation, les cellules sont incubées avec un anti-CTB à 1/50 dans une solution de PBS-BSA 0.2% pendant 30 minutes à température ambiante, selon un protocole précédemment décrit par (Mrówczyńska et al. 2012). Après deux autres lavages par centrifugation, les cellules sont fixées dans du PBS-formaldéhyde 4% et le noyau est marqué avec du Hoescht au 1/1 000 avant analyse en imagerie en flux (***Figure 52*** **A**).

La MFI du CTB localisée à la membrane des cellules a été analysée après application du masque « membrane » sur le logiciel IDEAS. Sur ce même masque le nombre de spots par cellules est dénombré par le même logiciel après application du masque spots (**Figure *52* B**).

La MFI membranaire du CTB pour le clone stom- est de 186, ce qui est significativement supérieur à celles du clone stom+, 92.38 (***Figure 52*** **C**). De plus, le nombre de spot par cellules est également significativement supérieur pour le clone stom- avec 36.54 spots/cellules en comparaison avec le clone stom+, 24.98 spots/cellules.

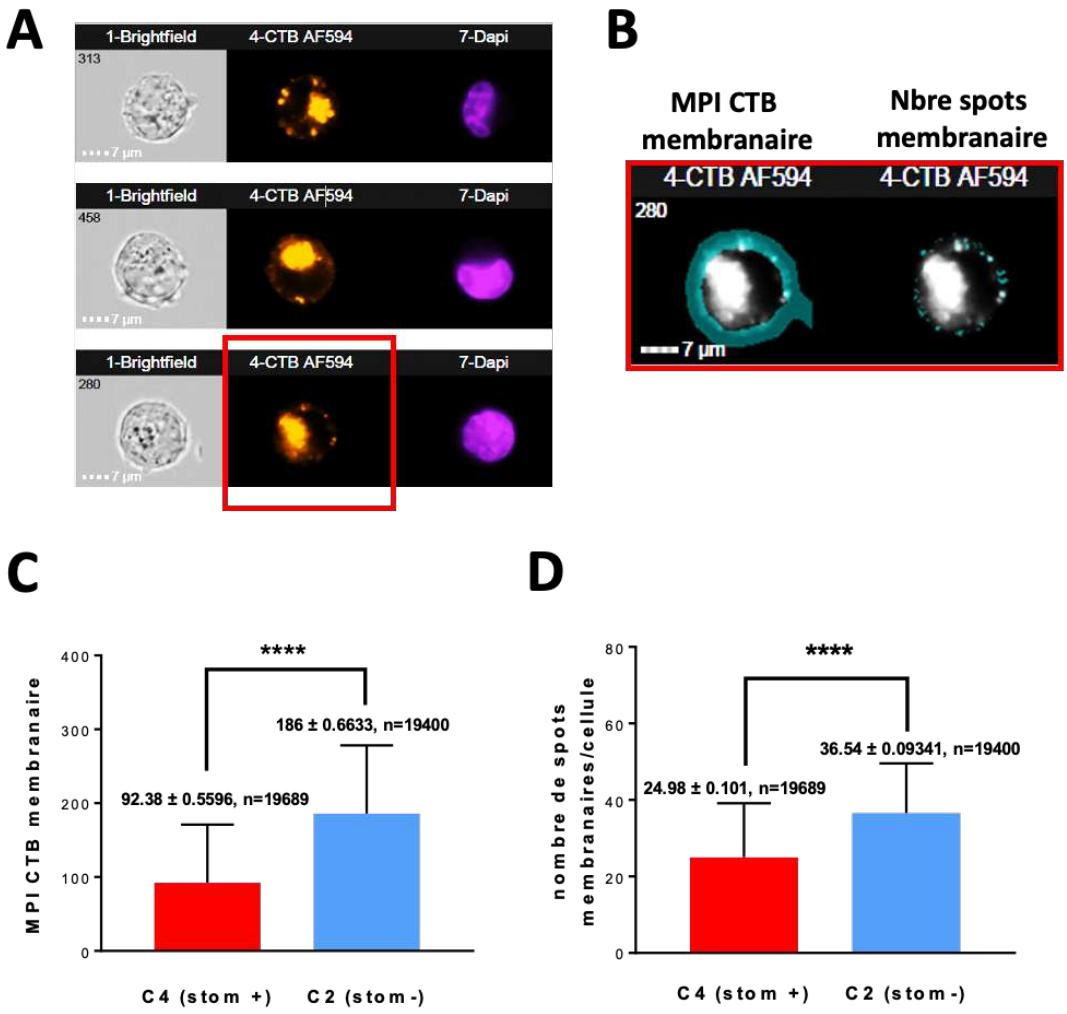


Figure 52 *: Caractérisation des microdomaines par marquage du ganglioside GM1 dans les cellules stom+ et stom-. (**A**) Les cellules K-562 ont été analysées en imagerie en flux après le marquage avec la CTB couplé à l'AlexaFluor 595 (CTB AF594, orange) et marquage du noyau au Hoechst (DAPI, violet). (**B**) Avec le logiciel IDEAS, un masque inclusif de la membrane est appliqué pour chaque cellule permettant de mesurer la MFI du CTB AF594 (gauche) et de calculer le nombre de spot (droite) uniquement à la membrane. Comparaison de la MFI du CTB AF594 (C) et du nombre de spots (D) membranaire des cellules stom+ (rouge) et stom- (bleu) après analyse de 20 000 cellules. Tests Mann-Whitney, **** p value > 0.001*

TRANSFECTION DU PLASMIDE PMELUC DANS LES CLONES STOM+ ET STOM-

Afin de déterminer l'ATP relargué par la PANX1 dans les cellules K-562 stom+ et stom-, un plasmide contenant une séquence codant pour la luciférase a été transfecté. La luciférase est combinée à une ancre GPI qui est adressé à la membrane, sur le feuillet externe des cellules. Afin de détecter l'expression de cette protéine dans les cellules, un tag myc est également intégrée à cette protéine (***Figure 53***).

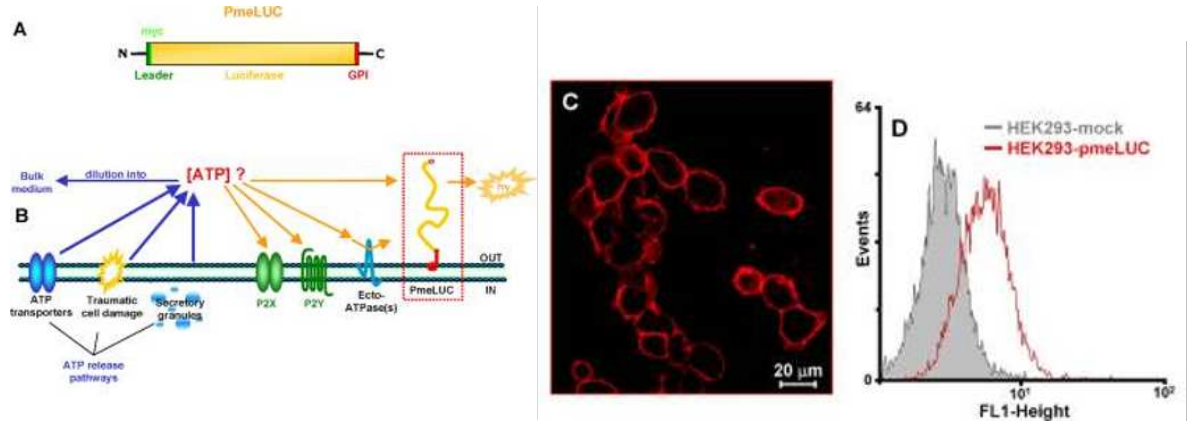


Figure 53 *: transfection du plasmide pmeLUC (A) codant pour la luciférase permettant la détermination de l'ATP extracellulaire à la membrane (B) Après transfection des cellules HEK-293, la protéine recombinante est détectée avec un anticorps anti-myc en immunofluorescence (C) et en cytométrie en flux (D)(Pellegatti et al. 2005)*

$1x10^6$ cellules de chaque clone C4 (stom+) et C2(stom-) ont été resuspendues dans 100 µL de solution de nucleofection (Nucleofector) et ont été transfectées avec 2 µg de pmeLUC par le système AMAXA programme T-9 pour les cellules K-562 puis remisen en culture dans 1 mL de milieu. 24 heures après la transfection, 800 µg/ml de généticine est ajouté au milieu et maintenu pendant 3 semaines pour stabiliser l'expression de la protéine et expandre le nombre de cellules.

L'expression de pmeLUC est analysée 48heures après la transfection en cytométrie en flux. $1x10^6$ cellules transfectés de chaque phénotype ont été lavées par centrifugation, et les sites non spécifiques ont été bloqués en incubant les cellules dans 1 mL de PBS-BSA 2% pendant 1 heure à 37°C. après une centrifugation ayant permis d'enlever le surnageant des cellules, l'anticorps anti-cmyc (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/200 dans 1 mL de PBS-BSA 0,5% a été incubé pendant 1 heure à 37°C. Après 2 lavages ayant permis de retirer l'anticorps non lié,

les cellules ont été incubées avec un anti-IgG de souris couplé au BV421 (BD horizon) pendant 20 minutes à température ambiante. Après 2 lavages par centrifugation dans 1 mL de PBS, les cellules sont analysées en cytométrie en flux en utilisant le laser Pacific Blue (***Figure 54***).

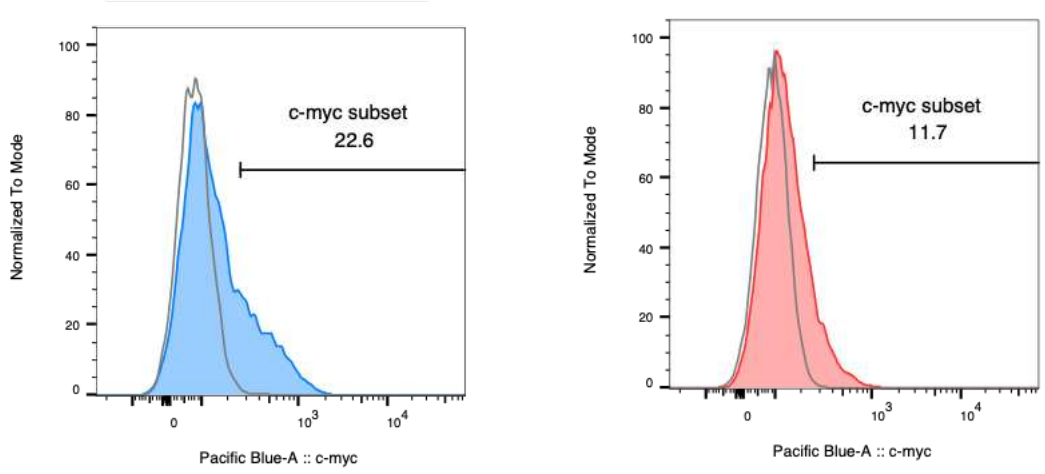


Figure 54 *: Expression de la protéine recombinante GPI-luciférase cmyc 48 heures après la transfection du plasmide PmeLUC dans les cellules K-562 stom+ (rouge) et stom-(bleu) analysée en cytométrie en flux après marquage avec un anticorps anti-cmyc puis un anticorps secondaire anti-IgG de souris, couplé à BV421.*

Après trois semaines de stabilisation et d'expansion en maintenant la geneticine à 0.8mg/ml dans le milieu de culture, les cellules ont été triées. Le tag myc a été marqué pour $1x10^7$cellules de chaque clone, comme précédemment décrit pour la cytométrie en flux. Pendant le dernier lavage, les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de PBS-BSA. Les cellules sont triées sur la base de la fluorescence Pacific-Blue par un trieur MA-900 (Sony).

Parmi les cellules viables, 18,92% de cellules stom+ était c-myc positives et 57,65% parmi les cellules stom- (données non présentées). A la fin du tri, 291 201 cellules stom+ et 907 341 cellules stom – ont été récupérées et remise en culture à une densité cellulaire de $5x10^5$ cellules/mL dans du milieu complet comme décrit dans le matériel et méthode.

Malgré plusieurs tests fonctionnels de bioluminescence, aucun signal de luminescence n'a pu être détecté après l'ajout de luciférine et d'ATP en concentration croissante comme décrit dans le protocole de Pellegratti (Pellegatti et al. 2005).

MARQUEURS D'APOPTOSE DES GRS TEMOINS ET OHST

L'exposition de la PS est analysée en marquant les GRs témoins et OHSt à hématocrite de 0,1% avec de lactadhérine FITC (Haematologica) diluée à 1/100 dans du tampon Krebs.

Pour les GRs témoins l'exposition de la PS est en moyenne de 0.41%, valeur significativement inférieure à celle obtenue pour l'exposition de la PS des GRs OHSt, 3.01%. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà observé par Boas pour les anémies hémolytiques (Boas, Forman, et Beutler 1998).

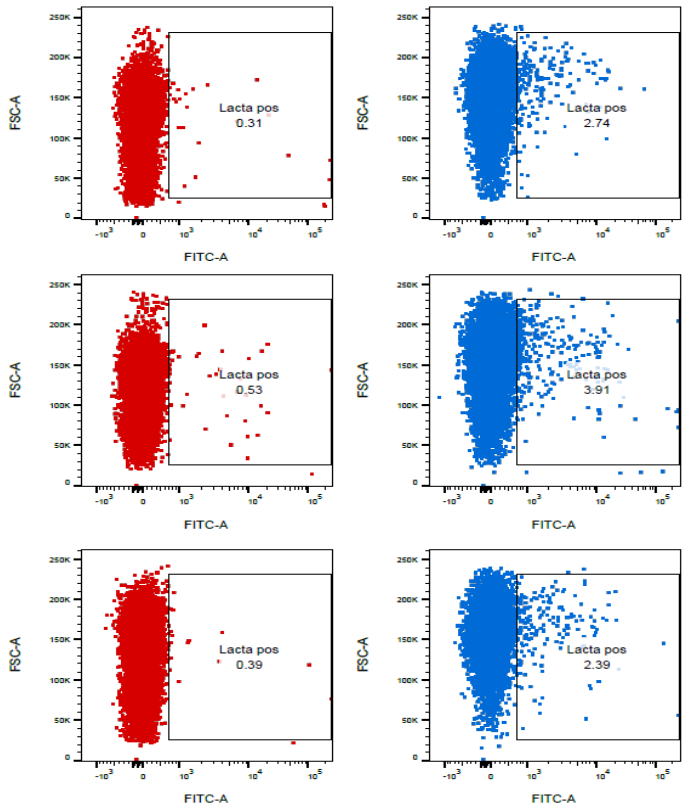


Figure 55 *: Exposition de la Phosphatidyl-Sérine (PS) de GRs de 3 Témoins (rouge) et de 3 OHSt (bleu) après marquage à la lactadhérine-FITC*

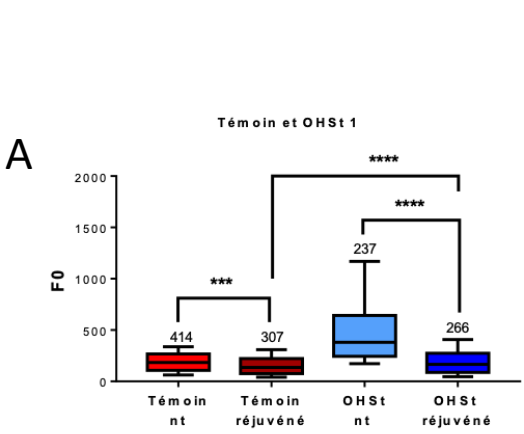
CA^{2+} INTRACELLULAIRE A L'ETAT BASAL DE GRS TEMOINS ET OHST AVANT ET APRES REJUVENATION

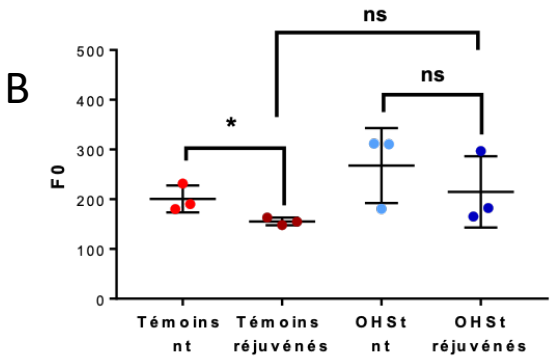
Le calcium intracellulaire est mesuré après chargement des GRs avec la sonde Fluo4-AM comme décrit dans le paragraphe « Patients et Méthodes » *Mesure du calcium intracellulaire*

par imagerie calcique. Les intensités de fluorescences brutes sont celles enregistrées sur la 1ère image, avant la stimulation (***Figure 56* A**).

Le niveau de fluorescence de la sonde calcique dans 3 GRs témoins réjuvénés (155.4, rouge écarlate) est significativement inférieur à celui des GRs non réjuvénés (200.6, rouge vif). De plus, le niveau de fluorescence de la sonde calcique dans les GRs des 3 patients OHSt après réjuvénation (214.8, bleu marine) est également inférieur à celui des GRs OHSt non réjuvénés (267.7, bleu ciel). Cependant cette diminution n'est pas significative (**Figure 56 B**).

En effet, la diminution de cette fluorescence pour les GRs OHSt (-19.8%) est inférieure à celle des GRs témoins (-22.5%), indiquant que le calcium accumulé dans les GRs OHSt n'a pas été complètement évacué de la cellule lors de la réjuvénation et reste supérieur à celui de GRs témoins (***Figure 56* C**).





C

	Témoin nt	Témoin réjuvéné	OHSt nt	OHSt réjuvéné
C&O1	190.3	163.3	310.75	182.3
C&O2	180.25	148.15	180.55	165.3
C&O3	231.3	154.8	311.75	296.85
Mean	**200.6 ±27.04**	**155.4 ±7.59**	**267.7 ±75.46**	**214.8 ±71.55**
	↘ 22.5%		**↘ 19.8%**	

***Figure 56** : Fluorescence de la sonde calcique dans des populations de GRs Témoins (rouge) et OHSt sans (nt) ou avec traitement de jouvence (réjuvéné). (**A**) Fluorescence de la sonde calcique pour une population de GR de deux individus (Témoin1 et OHSt 1) (**B**) Moyenne de fluorescences de la sonde calcique des GRs provenant des 3 Témoins avant (rouge vif) et après réjuvénation (rouge écarlate), ainsi que pour les GRs des 3 patients OHSt avant (bleu ciel) et après réjuvénation (bleu marine). (**C**) Table montrant la diminution de la fluorescence de la sonde calcique pour les 3 témoins et les 3 patients OHSt après réjuvénation. Tests statistiques one way ANOVA, ns non significatif, * p value < 0.05, *** p value < 0.005, ****p value < 0.001.*

INFLUX DE CA^{2+} APRES STIMULATION HYPOSMOTIQUE DANS LES GRS TEMOINS ET OHST DECONGELES SANS REJUVENATION.

L'influx de Ca^{2+} a également été mesuré tel que décrit dans « Patients et Méthodes ». *Mesure du calcium intracellulaire par imagerie calcique,* sans réjuvénation préalable des GRs (***Figure 57***). Pour les GRs témoins, à t=36 secondes, la moyenne de fluorescence après stimulation hyposmotique (Témoin 220mOsm, 1.461) est significativement supérieure à celle de la condition isotonique (Témoin 300 mOsm, ronds vides rouges, 0.980). Cependant, pour les GRs OHSt, l'influx de Ca^{2+} est également supérieure pour la condition hyposmotique (OHSt 220 mOsms, ronds pleins bleus, 1.593) mais pas significativement par rapport à la condition isotonique (OHSt 300 mOsms, ronds vides bleus, 0.944). Le niveau de calcium intracellulaire accumulé pendant le stockage des GRs OHSt pourrait être trop important et indiquant une saturation du contenu intracellulaire de Ca2+ après décongélation. Il ne serait donc plus possible pour les GRs OHSt décongelés de faire rentrer efficacement du Ca^{2+} même après un choc hypoosmotique.

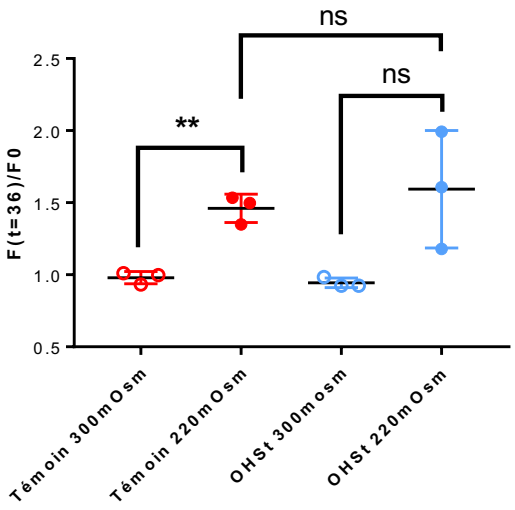


Figure 57 *: Activation de l'influx de Ca^{2+} dans les GRs décongelés non-réjuvénés témoins et OHSt avant (300mOsm) et après un choc hypoosmotique (220mOsm.*

MESURE DU SODIUM INTRACELLULAIRE

Piezo1 est un canal cationique non-sélectif, c'est-à-dire qu'après activation de ce dernier, le Ca^{2+} tout comme le Na^+ peut entrer dans la cellule. De plus, le Na^+ est maintenu à de faibles concentrations intracellulaire dans le GR humain car sa membrane est imperméable à cet ion. Le Na^+ intracellulaire peut par ailleurs être expulsé de la cellule par la pompe Na/K ATPase quand la concentration de Na^+ augmente. Enfin, la concentration intracellulaire de Na^+ est également un bon indicateur de l'état d'hydratation du GR.

Le contenu intracellulaire en sodium du GR peut être suivi par spectrofluorimétrie en suivant la fluorescence de la sonde sodique CoroNa green AM (Thermofisher). La longueur d'onde d'excitation de cette molécule est λ_{ex} = 492 nm et sa longueur d'onde d'émission λ_{em} = 516 nm. Sa constante de dissociation au Sodium est K_D = 80 mM.

Les GRs réjuvénés ont été resuspendus à 0.1% d'hématocrite dans 8 mL de PBS et chargés avec 10 µM de la sonde sodique CoroNa pendant 30 minutes à 37°C. Après deux lavages par centrifugation de 450 g pendant 5 minutes à température ambiante, les GRs sont resuspendus dans 5 mL de tampon Tyrode (en mM 135 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 5 glucose, +/-1.5 $CaCl_2$ ou +/-1 EDTA et 1 $MgCl_2$, pH7.4, 300 ± 5 mOsm). Le canal Piezo1 est stimulé par injection de Yoda1 à 10 µM dans la cuve du spectrofluorimètre (MOS 200 de BioLogic) contenant les GRs maintenus en suspension par agitation magnétique et la cinétique de variation de fluorescence est suivie par l'intermédiaire du Logiciel Biokine de BioLogic.

Sans calcium dans le tampon (+1 mM d'EDTA ($\varnothing Ca^{2+}$)) après activation de Piezo1 dans des GRs témoins avec Yoda1, le Na^+ entre rapidement dans la cellule cependant cette vitesse ne peut être calculé en spectrofluorimétrie. La hauteur de ce pic, correspondant à l'amplitude du signal a été calculé et semble ne pas varier même pour la condition avec la toxine GsMTx4 inhibant les canaux mécanosensibles (***Figure 58***, graphiques de gauche). La cinétique de la diminution de fluorescence et donc de sortie du Na^+ est mesurée et pourrait correspondre en partie à l'activité de la pompe Na/K ATPase,

puisqu'elle est ralentie en présence d'ouabaïne, l'inhibiteur de la pompe (donnée non présentée).

Avec du calcium dans le tampon (+Ca^{2+}), après activation avec Yoda1, en plus du pic correspondant à l'entrée de Na^+ par Piezo1 puis à la sortie de Na^+ par la Na/K ATPase, une phase lente d'une vitesse de $3x10^{-3}$secondes^{-1} d'augmentation de Na^+ est observée. Cette phase a été entièrement annihilée par la pré-incubation des GRs avec TRAM-34, l'inhibiteur de Gardos et très ralentie $4x10^{-3}$secondes^{-1} et partiellement réduite avec une amplitude de 29mV quand les GRs sont pré-incubés avec GsMTx4 inhibiteur de Piezo1. Cette deuxième phase correspondant également à la cinétique d'apparition des échinocytes liés à la déshydratation du GR et pourrait donc correspondre à l'activité du canal Gardos (**Figure 58** A, graphiques de droite).

Le suivie de la fluorescence de la sonde sodique CoroNa en spectrofluorimétrie pourrait donc constituer un bon outil pour le suivi de l'activité de Gardos dans les GRs témoins et de patients présentant des troubles de l'hydratation du GR.

Dans notre étude, nous avons étudié cette deuxième phase pour les GRs décongelés et réjuvénés d'un patient OHSt et d'un témoin (**Figure 58 B**), 3 fois. Pour les GRs OHst (rouge), la 2ème phase est plus ralentie et significativement moins intense que pour les GRs témoins (bleu). De plus, après inhibition de Gardos par TRAM-34, la deuxième phase est significativement moins intense pour les GRs témoins, mais n'a pas d'effet sur les GRs OHSt, l'intensité sans inhibiteur étant déjà très basse (**Figure 58 C**).

Nous avons donc deux hypothèses à la diminution de l'activité de Gardos dans les GRs OHSt : 1) Piezo1 qui n'est que faiblement activé, le calcium entrant ne serait pas suffisant à l'activation du canal Gardos 2) L'activité de Gardos est masquée par la fuite cationique des GRs OHSt.

Cependant, des échinocytes ont été tout de même observés pour les GRs OHSt, et sont maintenus contrairement aux GRs témoins, et aucune modification de la fluorescence de la sonde sodique ne corrèle avec la formation d'échinocytes. La formation des échinocytes semble indépendante de la concentration de sodium dans le GRs.

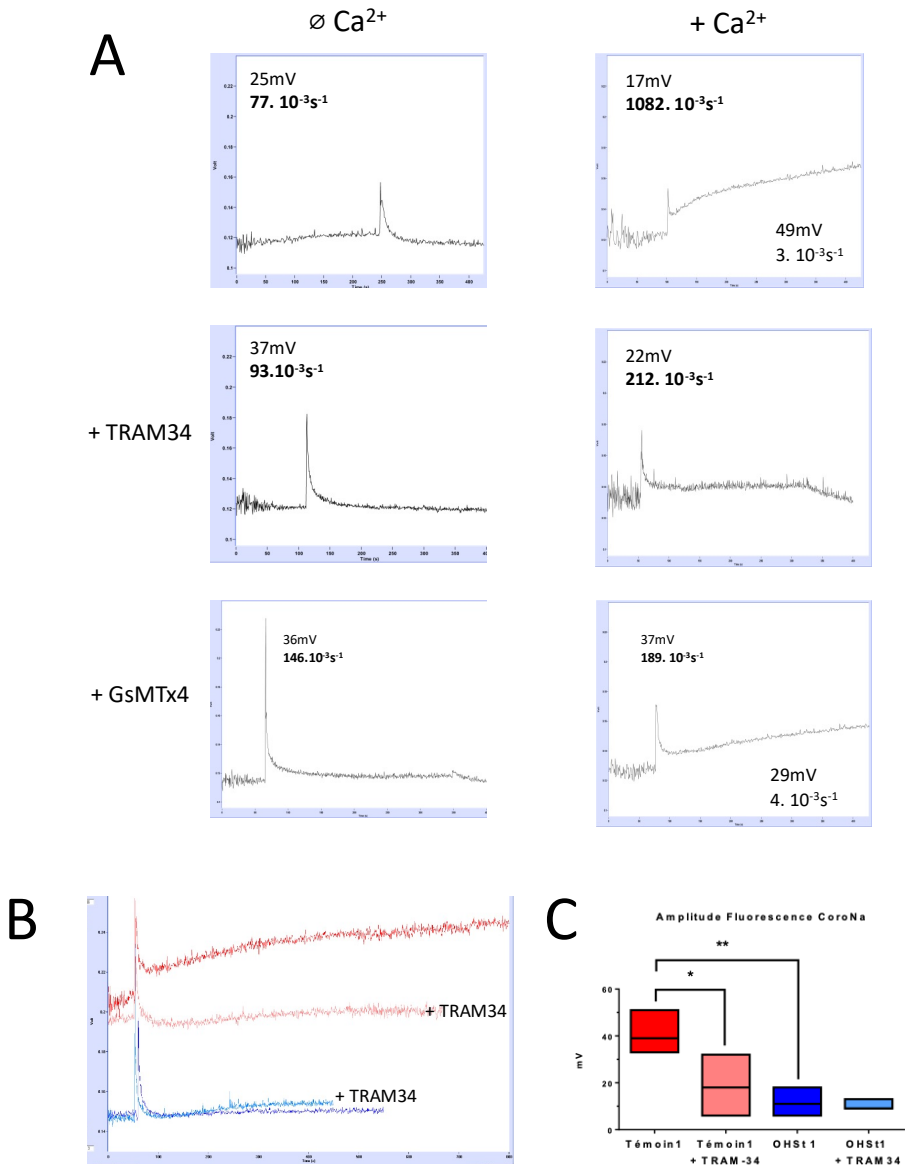


Figure 58 *: Cinétique de la concentration de Na^+ intracellulaire dans les GRs après activation de Piezo1 avec Yoda1dans les GRs témoins (rouge) et OHSt (bleu). En présence de calcium le canal Gardos est inhibé en présence de l'inhibiteur TRAM-34 pour les GRs témoins et OHSt (rouge pâle et bleu pâle).*

IDENTIFICATIONS DES PROTEINES APRES IMMUNOPRECIPITATION DES SMALPS ENRICHIS EN PIEZO1

Les élutions obtenues après immunoprécipitation avec un anti-stomatine des SMALPs enrichis en Piezo1 (voir « Patients et Méthodes » et « résultats ») ont été analysées en spectrométrie de masse. Les résultats de la protéomique par la plateforme 3P5 de l'Institut Cochin ont permis d'identifier des peptides provenant de protéines membranaires du GR. Les protéines présentant plus de 10 copies de peptides ont été représentées sur la **Figure 59**. Les protéines les plus abondantes sont les spectrines (SPTB1 et SPTA1 _HUMAN) et l'ankyrine (ANK1_HUMAN). Piezo1 est également présent dans les élutions (flèche rouge discontinue).

La comparaison du profil de protéomique des éluats obtenus avec un anti-stomatine ou avec un isootype contrôle pourrait renforcer l'hypothèse de la co-existence sur un même complexe de la stomatine et de Piezo1.

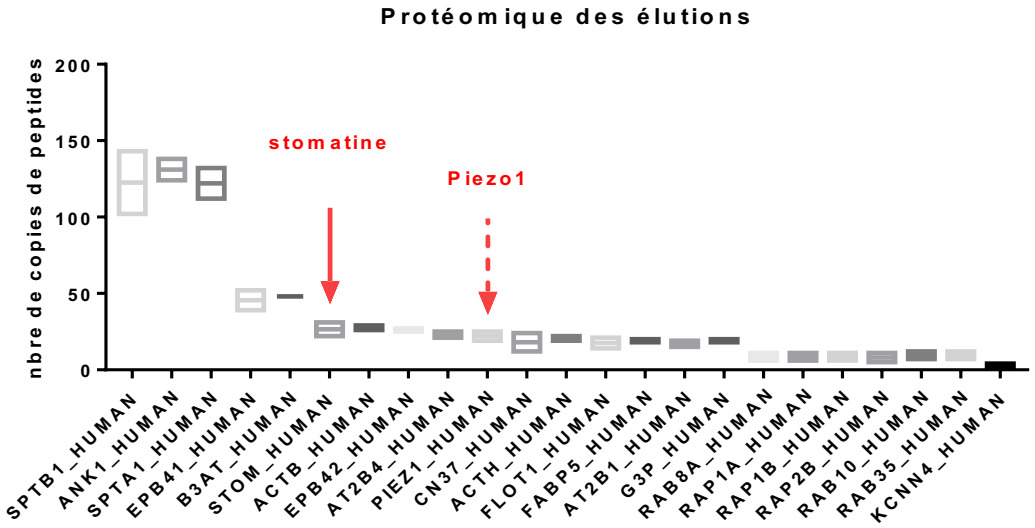


Figure 59 *: Protéomique obtenue par spectrométrie de masse sur les élutions après immunoprécipitation avec un anti-stomatine des SMALPs enrichis en Piezo1*

TEST DE LA TRANSFECTION DE PIEZO1-FLAG PAR ENREGISTREMENT DES COURANTS EN CONFIGURATION « CELLULE-ATTACHEE » APRES STIMULATION PAR PRESSION NEGATIVE.

Les cellules HEK-293 ont été transfectés avec 2µg de plasmide pcDNA3.1 Piezo1-FLAG et 0.05 µg de pGFP dilué dans la solution de JET-PEI selon les recommandations du fournisseur.

48 heures près la transfection, une cellule GFP+ a été patché en configuration « cellule-attachée » et un protocole de pression successive 200 msec, par pallier de -5 mmHg a été appliqué (**Figure 60 A** graphique du bas) et l'intensité est enregistrée (**Figure 60 A** graphique du haut). Une courbe de la pression appliquée en fonction de l'intensité maximale est produite avec le logiciel Clampfit (**Figure 60 B**).

Suite à la régression linéaire (les points assemblés formant une sigmoïde de Boltzmann inversée), des paramètres sur l'activation de Piezo1 ont été relevés. Notamment la pente de la courbe correspondant à la cinétique relative de désactivation du canal était de 14.16 et la P50 correspondant à la pression nécessaire pour avoir la moitié du courant maximal est de -58.95 mmHg. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Coste et al, 2015, indiquant que le plasmide transfecté code pour une protéine fonctionnelle dans les cellules HEK-293.

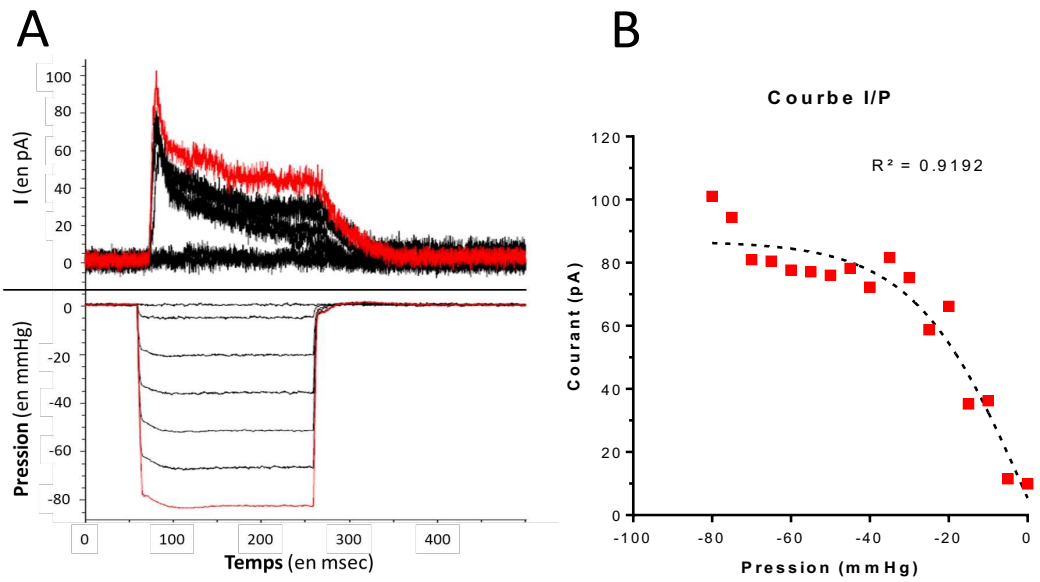


***Figure 60** : courant enregistrés dans une cellule HEK-293 co-transfectée avec un plasmide Piezo1 et un plasmide GFP, en configuration « cellule attachée » après un protocole paliers de 200msec de pression négative de -5 mmHg de 0 à -85 mmHg (**A**). Courbe du maximum de densité de courant en fonction de la pression (I/P) et régression sigmoïde de Boltzmann (trait noir discontinu) permettant le calcul de la pente et de la P50 (**B**).*

ACTIVATION DE PIEZO1 DANS LES CELLULES SUREXPRIMANT LA STOMATINE (STOM++)

La transfection de $1x10^6$ cellules K562 WT avec 2 µg de plasmide pCEP4-stomatine été réalisée selon le protocole d'AMAXA décrit dans le « Patients et Méthodes ». 24 heures après la transfection, 0.5 mg/ml d'hygromycine a été ajoutée à 1mL de suspension cellulaire afin de sélectionner les cellules transfectées. Après trois semaines de sélection en maintenant l'antibiotique dans le milieu de culture à 0.5mg/ml, l'expression de la stomatine est vérifiée en cytométrie en flux (voir « Patients et Méthodes »). La MFI obtenue après incubation des cellules avec l'anti-stomatine et un anticorps secondaire couplé à l'APC anti-IgG de souris est de 716 pour les cellules stom++ et 215 pour les cellules WT stom+, montrant une expression de la stomatine plus élevée dans les cellules transfectées (Figure 61A).

Après transfection en transitoire du plasmide pDNA3.1 Piezo1-FLAG, les cellules stom++ ont été analysées en électrophysiologie après activation de Piezo1 par Yoda1 (voir « Patients et Méthodes »). La densité moyenne de courant enregistré des cellules stom++ sensible au RR après activation de Piezo1 est significativement plus faible à – 80 mV (-22.54 pA/pF) et à + 80 mV (13.39 pA/pF) que pour les cellules stom+ (respectivement -60.84 et 41.72 pA/pF) (Figure 61B). Piezo1 est donc moins actif dans les cellules surexprimant à la fois la stomatine et Piezo1.

Cependant, les cellules stom++ après la deuxième transfection, ne proliféraient plus. La diminution de l'activité observée pourrait être liée à une viabilité diminuée de ces cellules.

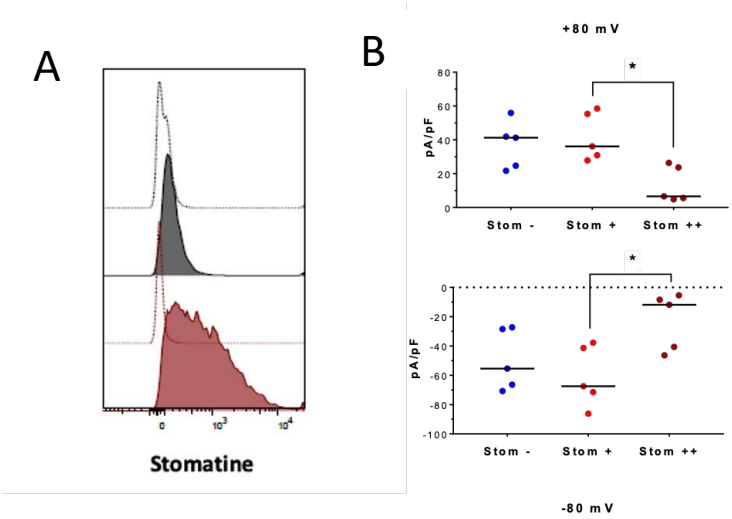


Figure 61 *: Expression de la stomatine et activité de Piezo1 recombinant par mesure en électrophysiologie dans les cellules transfectées et stabilisées avec un plasmide pcEP4-stomatinepermettant la surexpression de la stomatine*

EFFET DE L'ACTIVATION DE PIEZO1 SUR LE RELARGAGE D'ATP DANS LES GRS

Des études ont décrit une activité coordonnée des canaux PANX1 et Piezo1 dans divers types cellulaires. Après l'activation mécanosensible de Piezo1, l'influx de calcium activerait la PANX1 qui à son tour serait responsable du relargage d'ATP. L'étude de Cinar et al en 2015 dans les GRs a décrit ce phénomène après un stimuli mécanique (passage des GRs au travers d'un microcapillaire en PDMS). Le relargage d'ATP dans cette condition était inhibé par la toxine GsMTx4, bloquant l'ouverture de Piezo1 et donc l'influx de calcium.

Dans nos travaux le relargage d'ATP a été mesurée en bioluminescence (voir « Patients et Méthodes ») après activation mécanosensible (stimulation hyposmotique Δ60 mOsms) et chimique (Yoda1 à 10 μM) de Piezo1. De plus des inhibiteurs connus de Piezo1, GsMTx4 et de PANX1, CBX ont été utilisés. Comme vu précédemment, l'activation de PANX1 par choc hyposmotique, provoque le relargage d'ATP ($1.95x10^{-2}$ pmoles d'ATP/ 10^6 GRs) qui est inhibé par la CBX ($1.78 x10^{-3}$ pmoles d'ATP/ 10^6 GRs). Ce relargage est également partiellement inhibé par la toxine GsMTx4 ($8.90x10^{-3}$ pmoles d'ATP/ 10^6 GRs). Cependant, il n'y a pas de relargage d'ATP observé après l'activation spécifique de Piezo1 par Yoda1 ($1.92x10^{-3}$ pmoles d'ATP/ 10^6 GRs).

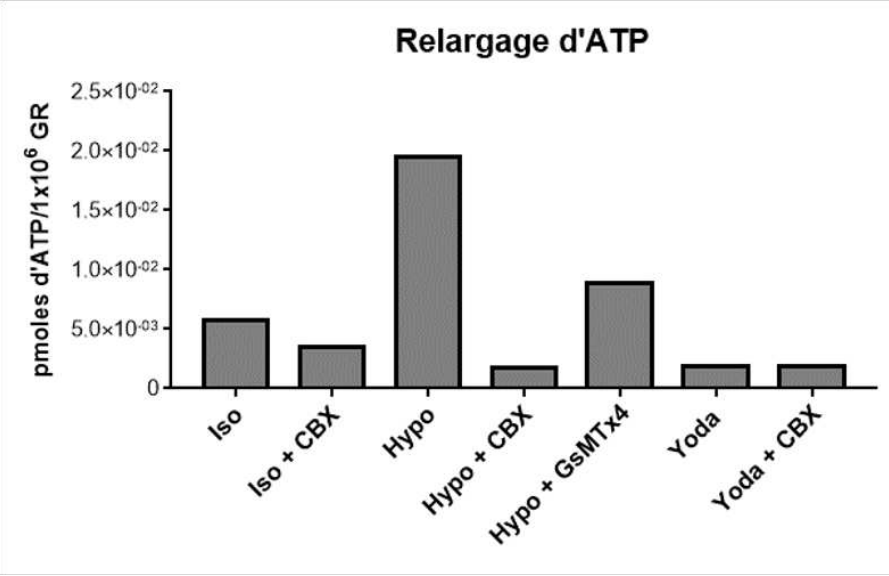


***Figure 62** : Mesure de l'ATP relargué par les GRs frais après diverses activations des canaux ioniques mécanosensibles par choc hyposmotique (Hypo 220 mOsms) ou par activation chimique de Piezo1 (Yoda, 10 μM). Des inhibiteurs ont été utilisé en incubant les GR préalablement à la stimulation : 20 minutes dans 20 μM de carbenoxolone (CBX) ou 20 minutes dans 2.5 μM de la toxine GsMTx4.*

Table des matières

INTRODUCTION **5**

CHAPITRE 1 : LE GLOBULE ROUGE HUMAIN **6**

CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES (CELLULAIRES) 6

STRUCTURE MOLECULAIRE 7

PATHOLOGIES ERYTHROCYTAIRES 11

HOMEOSTASIE 16

CHAPITRE 2 : LES CANAUX IONIQUES **20**

STRUCTURE DES CANAUX IONIQUES 20

CINETIQUE D'OUVERTURE 21

SELECTIVITE 21

MODE D'ACTIVATION 23

CHAPITRE 3 : LA MECANOSENSIBILITE **25**

NOTION DE MECANOSENSIBILITE DANS LES CELLULES NON-ERYTHROIDES 25

LES CANAUX IONIQUES MECANOSENSIBLES 25

REGULATION DES CANAUX IONIQUES MECANOSENSIBLES 28

CHAPITRE 4 : ACTEURS DE LA MECANOSENSIBILITE DANS LE GR **31**

1. DEUX CANAUX IONIQUES MECANOSENSIBLES DU GR 31

2. STOMATINE ERYTHROCYTAIRE 36

OBJECTIFS DE LA THESE **39**

PATIENTS ET METHODES **42**

1. MODELES CELLULAIRES **43**

PATIENTS 43
OSMOSCAN 43
REJUVENATION 44
PREPARATION DES STROMAS 45
CULTURE CELLULAIRE 45
TRANSFECTION DE PLASMIDES CRISPR-CAS9 ET HDR 45
TRANSFECTION DE PLASMIDE PCDNA3.1 PIEZO1-FLAG ET PIEZO1-MCHERRY 47
2. STRUCTURE MOLECULAIRE 51
ANTICORPS ET MARQUEURS CELLULAIRES 51
LYSATS CELLULAIRES ET DOSAGE DES PROTEINES 53
GELS D'ELECTROPHORESE EN POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE) 53
COLORATION DE GEL EN NITRATE D'ARGENT 54
IMMUNOBLOTS 54
CYTOMETRIE EN FLUX 55
PROXIMITY LIGATION ASSAY (PLA) 56
PREPARATION DES SMALPS ENRICHIS EN PIEZO1 59
IMMUNOPRECIPITATION DES SMALPS 60
3. MESURE D'ACTIVITE DES CANAUX IONIQUES 61
MESURE DE L'INFLUX DE 5(6)-CARBOXYFLUORESCEINE 61
MESURE DU RELARGAGE D'ADENOSINE TRIPHOSPHATE (ATP) 61
PERMEABILITE AU *TO-PRO®-3* 62
MESURE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE PAR IMAGERIE CALCIQUE 63
MESURE DES COURANTS IONIQUES GENERES PAR UN AGONISTE DE PIEZO1 : YODA1 65

RESULTATS 66

AXE I : L'ACTIVITE MECANOSENSIBLE DE LA PANNEXINE1 EST MODULEE PAR LA STOMATINE DANS LE GLOBULE ROUGE HUMAIN 68

1. INTRODUCTION DE L'AXE I 69

2. ARTICLE PUBLIE 71

3. FIGURES SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE 90

4. TRAVAUX ET FIGURES SUPPLEMENTAIRES NON PUBLIES 93

5. CONCLUSION ET DISCUSSION DU CHAPITRE 1 97

EXPRESSION DU CANAL IONIQUE PANX1 A LA MEMBRANE DU GR HUMAIN 97

COMPLEXE MEMBRANAIRE STOMATINE-PANX1 98

UNE ACTIVITE MECANOSENSIBLE DE LA PROTEINE PANX1 99

PROBABLES CONSEQUENCES PHYSIOLOGIQUES 101

AXE II : MODIFICATION DE L'ACTIVITE MECANOSENSIBLE DE PIEZO1 IMPLIQUANT UNE INTERACTION DU CANAL AVEC LA STOMATINE 104

1. INTRODUCTION A L'AXE II 105

2. RESULTATS DE L'AXE II 107

PIEZO1 EST EXPRIME A LA MEMBRANE DES GRS TEMOINS ET OHST 107

PIEZO1 ET LA STOMATINE SONT A PROXIMITE (<40 NM) A LA MEMBRANE DES GRS 109

PIEZO1 EST ENRICHI DANS DES SMALPS APRES FRACTIONNEMENT EN GRADIENT DE SUCROSE 111

L'ACTIVATION MECANOSENSIBLE DE PIEZO1 DANS LES GRS DECONGELES TEMOINS ET OHST EST SIMILAIRE 115

L'INHIBITION DE L'INFLUX DE CALCIUM PAR LA TOXINE GSMTX4 EST INEFFICACE DANS LES GRS OHST 117

L'ACTIVATION CHIMIQUE DE PIEZO1 DANS LES GRS DECONGELES TEMOINS ET OHST EST SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE 118

L'ACTIVATION CHIMIQUE DE PIEZO1 DANS LES GRS DECONGELES TEMOINS ET OHST INDUIT LA DEFORMATION DES GRS EN ECHINOCYTES 120

L'ACTIVATION CHIMIQUE DE PIEZO1 PAR YODA1 DANS LES CLONES STOM+ ET STOM- GENERE DES COURANTS SIMILAIRES 122

L'EXPRESSION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE PIEZO1-MCHERRY DANS LES CLONES K-562 C4 (STOM+) ET C2 (STOM-) 124

ETUDE DU COMPLEXE STOMATINE-PIEZO1 DANS LES CELLULES K-562 TRANSFECTEES PIEZO1-MCHERRY PAR PROXIMITY LIGATION ASSAY (PLA) *IN SITU* 127

3. DISCUSSION DE L'AXE II 129

EXPRESSION DE PIEZO1 DANS UN CONTEXTE ERYTHROÏDE 129

COMPLEXES MEMBRANAIRES STOMATINE-PIEZO1 DANS LES CELLULES K562 ET DANS LES GLOBULES ROUGES 131

IMPACT DE LA DEFICIENCE EN STOMATINE SUR L'ACTIVITE DE PIEZO1 DANS UN CONTEXTE ERYTHROÏDE 133

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 137

1. EXPRESSION DE LA STOMATINE DANS UN CONTEXTE ERYTHROÏDE 138

2. COMPLEXE PROTEIQUE D'INTERACTION DE LA STOMATINE AVEC PANNEXINE1 (PANX1) OU PIEZO1 140

3. REGULATION DE L'ACTIVITE DES CANAUX IONIQUES MECANOSENSIBLES PAR LA STOMATINE DANS UN CONTEXTE ERYTHROÏDE 142

4. IMPLICATION DES LIPIDES DANS LES COMPLEXES STOMATINES-CANAUX IONIQUES MECANOSENSIBLES ET LEUR ACTIVITE 145

5. INTERACTIONS FONCTIONNELLES ENTRE LA PANX1 ET PIEZO1 DANS LE GR ? 146

ANNEXES 149

FICHE PRODUIT REJUVESOL 150

CARACTERISATION CELLULAIRE DES CLONES STOM+ ET STOM- 152

MICRODOMAINES DANS LES CELLULES STOM+ ET STOM- 153

TRANSFECTION DU PLASMIDE PMELUC DANS LES CLONES STOM+ ET STOM- 155

MARQUEURS D'APOPTOSE DES GRS TEMOINS ET OHST 157

CA^{2+} INTRACELLULAIRE A L'ETAT BASAL DE GRS TEMOINS ET OHST AVANT ET APRES REJUVENATION 157

INFLUX DE CA^{2+} APRES STIMULATION HYPOSMOTIQUE DANS LES GRS TEMOINS ET OHST DECONGELES SANS REJUVENATION. 159

MESURE DU SODIUM INTRACELLULAIRE 160

IDENTIFICATIONS DES PROTEINES APRES IMMUNOPRECIPITATION DES SMALPS ENRICHIS EN PIEZO1 163

TEST DE LA TRANSFECTION DE PIEZO1-FLAG PAR ENREGISTREMENT DES COURANTS EN CONFIGURATION « CELLULE-ATTACHEE » APRES STIMULATION PAR PRESSION NEGATIVE. 164

ACTIVATION DE PIEZO1 DANS LES CELLULES SUREXPRIMANT LA STOMATINE (STOM++) 165

EFFET DE L'ACTIVATION DE PIEZO1 SUR LE RELARGAGE D'ATP DANS LES GRS 166

TABLE DES MATIERES 167

TABLE DES ILLUSTRATIONS 171

BIBLIOGRAPHIE 177

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma de la différenciation érythroïde dite définitive. 6

Figure 2: Répartition des lipides sur les feuillets interne et externe de la membrane du GR,..... 9

Figure 3 : Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie après séparation des protéines de la membrane du GR (Aoki 2017) 9

Figure 4 : Complexes membranaires impliquant les protéines majoritaires du GR (Lux 2016) 10

Figure 5 : Organigramme des pathologies liées à des mutations des protéines membranaires et cytosquelettiques participant à l'architecture du GR : Sphérocytose héréditaire (HS), Elliptocytose héréditaire (HE) pyropoïkilocytose héréditaire (HPP) et Ovalocytose (SAO) avec le défaut moléculaire associé, la pathophysiologie du GR et le schéma des frottis des patients associés. 13

Figure 6 : Images de microscopie présentant des frottis sanguins de patients présentant des défauts moléculaires sur les transporteurs de la membrane du GR et associé à des pathologies : Cryohydrocytose, Stomatocytose héréditaire à GR hyperhydraté et la Xérocytose héréditaire..... 16

Figure 7 : Schéma des structures tridimensionnelles des canaux potassiques. Le domaine P signalé par un P. Figure extraite de (Girard et Lesage 2004) 21

Figure 8 : Différents types de canaux ioniques par leur mécanisme d'ouverture tiré de Yin S, BJP, 2019 23

Figure 9 : Techniques de stimulations mécaniques de la cellule pour la mesure de l'activité d'un canal ionique mécanosensible (Delmas, Hao, et Rodat-Despoix 2011) 25

Figure 10 : Structure/architecture de canaux ioniques mécanosensibles,(Cox, Martinac, et Navis 2017) 27

Figure 11 : Homologie de structure des protéines de la famille des stomatines : stomatine, podocine, stom-like protein 1 (SLP-1), stom-like protein 2 (SLP-2), stom-like protein 3 (SLP-3) et MEC-2. (**A**) Phylogramme des stomatines (**B**) Alignement des séquences d'acides aminés des stomatines et correspondances avec leurs domaines protéiques. Les cystéines (C) marquées par une étoile (*) indiquent le site de palmitoylation et la proline de l'hairpin (P) est indiquée par un losange (♦). Les résidus conservés entre les différentes stomatines sont indiqués en rouge 29

Figure 12 : Schématisation de Piezo1 (**A**) structure d'un monomère de Piezo1(Saotome et al. 2018) (**B**) structure de l'homotrimère de Piezo1 vue perpendiculaire à la membrane et vue transversale à la membrane (Lin et al. 2019) 32

Figure 13 : Activation de Piezo1 par agoniste (**A**) structure moléculaire de Yoda1. (**B**) Mécanisme d'insertion de Yoda1 entre la première répétition (A) et le bras (Arm) de Piezo1 permettant la courbure de la membrane et l'ouverture du pore (Botello-Smith et al, 2019)..... 33

Figure 14 : Schémas de la structure du canal Panx1. (**A**) Structure tridimensionnelle d'un monomère (Penuela, Gehi, et Laird 2013) (**B**) Assemblage des sept monomères afin de former le canal (Michalski et al. 2020) 35

Figure 15 : Schéma de la structure de la stomatine érythrocytaire ou bande 7.2b (Kadurin, Huber, et Gründer 2009) 37

Figure 16 : Courbe d'Osmoscan en ektacytométrie de l'indice d'élongation en fonction de l'osmolalité sur une population de GRs et relevance des points caractéristiques. D'après RR Mechatronic. 44

Figure 17 : Schéma illustrant la mécanistique d'insertion du plasmide HDR au site de coupure généré par la ribonucléase Cas9 du plasmide CRISPR/Cas9 KO lors de la co-tranfection de ces 2 plasmides, d'après Santa Cruz 47

Figure 18 : carte du plasmide pcDNA3.1 Piezo1 humain (en bleu) avec tag FLAG (en vert) GenScript 48

Figure 19 : Insertion du tag fluorescent mCherry sur la protéine Piezo1 (a) positionnement du tag mCherry en position 1591 sur une boucle intracellulaire d'un monomère du canal Piezo1 (b) courant enregistré en configuration cellule attachée après stimulation par pression négative à -50mmHg, sur les cellules HEK-293 transfectées avec le plasmide sans mutation (WT) avec le tag mCherry en position 1591 ou 1851 ou à l'extrémité c-terminal (C terminus) (Cox et al. 2016) 49

Figure 20 : Carte du plasmide pcDNA3.1 Piezo1 (bleu)-mCherry(rouge) 50

Figure 21 : Schéma illustrant les étapes du PLA in situ selon le kit fourni par Duolink 57

Figure 22 : Stratégie d'inclusion des stromas (ghosts) marqués à la phalloïdine Alexa Fluor 488 pour l'analyse du PLA 58

Figure 23 *: Réaction enzymatique d'oxydo-réduction de la D-luciférine en présence d'ATP et d'O_2 catalysée par la luciférase en présence de Mg^{2+} conduisant à la production d'oxyluciférine, d'AMP, d'ions biphosphate de CO_2 et de lumière.* 61

Figure 24 : Schéma du système de perfusion local : les seringues contiennent les solutions de Tyrode isotonique, hypoosmotique avec 10 µM de Yoda1, ou hypoosmotique avec 2.5 µM de GsMTx4. Les valves monitorées contrôlent le flux dans les tubulures qui se rejoignent en un capillaire de 1mm de diamètre. Le capillaire visible dans le champ d'acquisition (ombre noir) délivre les solutions de la perfusion localement sur les GRs également dans le champ d'acquisition. 64

Figure 25 : Schéma de la méthodologie appliquée à l'étude de la régulation de l'activité de la PANX1 par la stomatine dans les GRs témoins et OHSt (déficient en stomatine) 70

Figure 26 : Effet de la réjuvénation des GRs témoins (rouge) et OHSt (bleu) sur la concentration intracellulaire en ATP. Test statistique one-way ANOVA, * : p value <0.05, ** : p value <0.01, *** : p value <0.005 93

Figure 27 : Activation de la PANX1 dans les GRs Témoins (rouge) et OHSt (bleu) après stimulation par le Kgluconate (Kglu, losange) ou avec une incubation préalable avec 20 µM de CBX, mesurée en cytométrie en flux (**A**) Fluorescence intracellulaire moyenne de la sonde 5(6)-CarboxyFluoresceine (MFI 5(6)-CF). (**B**) Dispersion de la lumière proportionnelle à la taille des évènements suite au passage des GRs dans les tampons Krebs. Test two-way ANOVA, ns : non significatif, * : p value <0.05, ** : p value <0.01, **** : p value <0.001 95

Figure 28 : Cinétique de la dépolarisation des GRs témoins (symboles rouges en (A)) et OHSt (symboles bleus en (B)) induit par augmentation du K+ extracellulaire (traits discontinus) des tampons

Krebs KCl (carré) et KGlu (triangle) observée par fluorescence de la $DiBAC_4(3)$ en cytométrie en flux 96

Figure 29 : Schéma de la structure des canaux à larges pores PANX1 (bleu) et LRRC8a (gris) (Deng et al. 2020) 97

Figure 30 : Images de microscopie électronique en coloration négative de PANX1 isolée à partir de cellules transduites sf9 par baculovirus montrant l'ouverture du canal par l'élargissement du pore central 99

Figure 31 : cascade de signalisation du relargage de l'ATP par le GR au travers de la Pannexine à la vasodilatation des vaisseaux sanguins par les cellules endothéliales 102

Figure 32 : Expression de Piezo1, de l'Aquaporine1 et d'autres protéines érythrocytaires à la membrane des GRs témoins et OHSt par immunoblots (**A**) Coloration de la membrane au rouge ponceau après immunotranfert (**B**) Immunoblot avec l'anti-Fam38A (**C**) Immunoblot avec l'anti-AQP1 108

Figure 33 : Expression de Piezo1 et de la stomatine sur les stromas des GRs témoins et OHSt en cytométrie en flux. (A) les stromas de GRs témoins fixés ont été incubés sans anticorps primaire (histogramme blanc) avec l'anticorps anti-Piezo1 (histogramme plein) ou avec l'anticorps anti-Piezo1 préalablement bloqué avec le peptide (histogramme semi-transparent) puis avec un anticorps secondaire. (**B**) Les stromas des GRs témoins (rouges) et OHSt (bleus) sont analysés après marquage de la stomatine par un anti-stomatine. (**C**) Les stromas des GRs témoins (rouges) et OHSt (bleus) sont analysés après marquage de Piezo1 par un anti-Piezo1 109

Figure 34 : PLA in situ appliqué aux stromas de GRs témoins utilisant le couple d'anticorps anti-stomatine/anti-Piezo1 (A) Images de stromas extraites de l'analyse en imagerie en flux observés en champ clair (brightfield), à 488nm pour le marquage de l'actine (AF488) et à 664nm pour le marquage des spots PLA (Far red). (B) Quantification en pourcentage des évènements correspondant à des stromas qui présentent des spots rouges (PLA+) parmi les stromas actine+, quand la réaction de PLA est faite sans anticorps primaires (aucun) ou avec un seul anticorps primaire anti-stomatine ou anti-piezo1 ou avec les deux anticorps primaires. Test statistique Anova one-way, ** p value <0.01 110

Figure 35 : Caractérisation des SMALPs enrichis en Piezo1 (**A**) Fractionnement des SMALPs par gradient de sucrose (suc) après ultracentrifugation, la hauteur supposée de l'homotrimère de Piezo1, qui est calculée à partir du diamètre du canal, étant indiquée par une flèche rose **(B**) Immunoblot des fractions de SMALPs après gradient de sucrose avec détection de Piezo1 par l'anti-Fam38A. (**C**) Profil de la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) à partir de l'injection des fractions de SMALPs F_{Suc}11-12-13 (**D**) Immunoblots des fractions de la SEC issues de la colonne Superdex incubés avec l'anti-Fam38A (membrane du haut) et l'anti-stomatine E5 (membrane du bas). 112

Figure 36 : Image en coloration négative de microscopie électronique des fractions $F_{SEC}3$ (en **A**) et $F_{SEC}4$ (en **B**) après chromatographie d'exclusion de taille (SEC) caractérisées chacune par des nanoparticules de taille moyenne de 30 nm (miniatures a, b, c et d). Barre d'échelle des images en bas à droite. 113

Figure 37 : Immunoprécipitation des SMALPs enrichis en Piezo1 ($F_{SEC}3$-4) la fraction non retenue (NR) par l'anti-stomatine couplé aux billes d'agarose, les 3 lavages (L1-3) ainsi que les éluats (E1 et E2) ont été déposés sur 2 gels d'électrophorèse. (A) coloration au nitrate d'argent des dépôts précédemment décrits (**B**) Immunoblot avec un anti-stomatine (flèche rouge montrant la hauteur théorique de la bande spécifique à la stomatine) (**C**) Immunoblot avec un anti-Fam38A (flèche rose

montrant la hauteur théorique de la bande spécifique à Piezo1). Les astérisques montrant les IgG (H et L)..... 114

Figure 38 : Image de microscopie à fluorescence montrant la fluorescence des GRs (contour d'intérêt délimité par un cercle jaune) chargés en sonde calcique Fluo-4-AM. (**A**) Fluorescence des GRs sous perfusion de tampon Tyrode isotonique (300 mOsms) au début de l'acquisition d'image (F0). (**B**) Fluorescence des GRs 6 secondes ($F_{t=36s}$) après l'arrêt de la perfusion de Tyrode isotonique et le début de la perfusion en tampon Tyrode hypoosmotique (220 mOsms)..... 115

Figure 39 : Mesure de l'induction de l'influx de Ca^{2+} dans les GRs après un choc hyposmotique par enregistrement de la fluorescence de la sonde sensible au Ca^{2+} présente dans les GRs en miscroscopie à l'aide d'une caméra. (**A**) Moyenne des cinétiques de fluorescence mesurée pour des populations d'au moins 300 GRs témoins (en rouge) et OHSt (en bleu) en condition iso osmotique (traits discontinus) et hyposmotique (traits pleins). (**B**) Moyenne des fluorescences à t =36 secondes en condition isotonique (300 mOsms, ronds vides) et en conditions hyposmotiques (220 mOsms, ronds pleins) pour les GRs de trois témoins (en rouge) et des trois patients OHSt (en bleu) réalisé trois fois pour chaque individu. Test statistique one-way ANOVA, ** p value <0.01, **** p value <0.001 116

Figure 40 : Inhibition de l'influx de calcium par la toxine GsMTx4 après un choc hyposmotique par enregistrement de la fluorescence de la sonde sensible au Ca2+ présente dans les GRs en microscopie à l'aide d'une caméra dans les GRs témoins et OHSt (**A**) Moyenne des cinétiques de fluorescence pour une population de GRs témoins (en rouge) ou OHSt (en bleu) en solution isotonique (300 mOsm, traits discontinus), après un choc hyposmotique (220 mOsms traits pleins) ou préalablement incubés avec 2.5 µM de GsMTx4 (220 mOsms + GsMTx4, traits pointillés). (**B**) Moyennes des fluorescences à t =36 secondes en conditions hyposmotiques (220 mOsms, ronds pleins) ou en condition hyposmotique en présence de la toxine (GsMTx-4 + 220mOsms, ronds pointés) pour les GRs de deux témoins (en rouge) et des deux patients OHSt (en bleu) réalisé une fois pour chaque individu. 118

Figure 41 : Activation de l'influx de calcium par 10 µM de Yoda1 dans les GRs témoins (rouge) et OHSt (bleu). (**A**) Moyenne des cinétiques de fluorescence pour des populations de GRs montrant 2 phases après l'application de Yoda1 (Y) séparé par un trait discontinu noir à la 90ème seconde pour les GRs d'un témoin vs ceux d'un patient OHSt (OHSt2, gauche) et à la 80ème seconde pour les GRs d'un autre témoin vs un autre OHSt (OHSt3, droite). (**B**) Médiane des fluorescences maximale au cours de la première phase (t= 30-80s) de chaque population de GRs témoins et OHSt (OHSt2, à gauche et OHSt3, à droite). Tests statistiques Man-Whitney, **** p value <0.001. 119

Figure 42 : Formation des échinocytes liée à l'influx de calcium suite à l'activation par Yoda1 sur des GRs témoins et OHS (**A**) Image de microscopie à fluorescence des GRs marqués avec la sonde calcique Fluo4-AM 60 secondes après le début de l'activation, au maximum de présence d'échinocytes (indiqués par les flèches rouges) (**B**) Pourcentage d'échinocytes en fonction du temps après activation de Piezo1 par Yoda1 (**C**) Image en lumière blanche des GR témoin et OHSt après l'enregistrement de l'influx calcique 121

Figure 43 : Enregistrement en configuration cellule-entière des courants induits par Yoda1 dans les cellules stom + et stom- (**A**) Courbes I/V entre -120 mV et +80 mV d'une cellule perfusée successivement avec une solution extracellulaire (basal, gris clair), avec 15 µM de Yoda1 (Yoda1, noir) et avec 15 µM de Yoda1 et 30µM de Ruthenium Red (Yoda1 + RR, gris foncé). (**B**) et (C) densité relative de courants des cellules stom- (bleu) et stom+ (rouge) répondante à l'inhibition par le RR à +80 mV et -80 mV respectivement..... 123

Figure 44 : Expression et localisation de la protéine recombinante Piezo1-mCherry dans deux clones K-562 stom+ et stom-. (**A**) Immunoblot des lysats de cellules K-562 WT, du clone C4 stom+ non

transfecté (stom+ nt), du clone C4 transfecté avec le plasmide pcDNA Piezo1-mCherry (stom+ Piezo1-mCherry) et les lysats de stromas de GRs témoins, incubé avec l'anti-mCherry. (**B**) Histogramme de cytométrie en flux des clones C4 (stom+, en rouge) et C2 (stom-, en bleu) après fixation, perméabilisation et incubation sans anticorps primaires (traits pointillés) ou avec l'anticorps anti-mCherry (trait plein). (**C**) Images d'immunofluorescence des clones stom+ et stom- transfectés Piezo1-mCherry après marquage avec les anticorps primaires anti-stomatine (vert) et anti-mCherry (en rouge). Les cellules ont été montées entre lame et lamelle dans du milieu de montage contenant du DAPI (bleu). 126

Figure 45 : PLA in situ réalisé sur le clone K562 stom+ (**A**) images d'imagerie en flux des cellules dites PLA+ caractérisées par la présence de spots rouges (PLA-AF647) et dont le noyau a été marqué au colorant Hoechst (violet). (**B**) Images de microscopie confocale des cellules après les réactions de PLA réalisées avec aucun anticorps primaire, avec les anti-stomatine et anti-Glut1 (Stomatine/Glut1) ou avec les anti-stomatine et anti-mCherry (Stomatine/mCherry). Le noyau des cellules est marqué au DAPI (bleu). (**C**) Table des résultats obtenus en imagerie en flux (Amnis) et en microscopie confocale après un PLA réalisé sans (aucun) ou avec les couples d'anticorps primaires anti-stomatine/anti-Glut1 et anti-stomatine/anti-mCherry. Le pourcentage de cellules PLA+ correspond à la proportion de cellules (identifiée par leur noyau) ayant un signal positif en AF647 pour l'Amnis ou ayant visuellement des spots pour la microscopie confocal. Le nombre de spots/cellule PLA+ correspond au nombre de spot déterminé par le logiciel IDEAS à l'Amnis ou Fiji en microscopie confocale par rapport au nombre de cellules PLA+. 128

Figure 46 : Histogramme représentant l'expression de Piezo1 au cours de la différenciation érythroïde de progéniteurs CD34+ pour une érythropoïèse. D'après Gautier EF et al., 2016..... 129

Figure 47 : illustration de la localisation des mutations GOF (violet) et LOF (rouge) sur la protéine Piezo1 d'après Fotiou et al., Nature com 2015..... 133

Figure 48 : Structure du peptide GsMTx4 issu du venin d'araignée, (Gnanasambandam et al. 2017) 134

Figure 49 : Conservation du système de mécanotransduction à force appliquée au cytosquelette chez le nématode C. elegans et chez les mammifères. Figure extraite de (Cheng, Jiang, et Chen 2018) 141

Figure 50 : Volume cellulaire des clones K-562 stom+ et stom-, n=3, test statistique t-test, ns, non significatif..... 152

Figure 51 : Prolifération des cellules K-562 stom+ et stom- sur 5 jours par comptage des cellules viables au CASY. n=3 152

Figure 52 : Caractérisation des microdomaines par marquage du ganglioside GM1 dans les cellules stom+ et stom-. (**A**) Les cellules K-562 ont été analysées en imagerie en flux après le marquage avec la CTB couplé à l'AlexaFluor 595 (CTB AF594, orange) et marquage du noyau au Hoechst (DAPI, violet). (**B**) Avec le logiciel IDEAS, un masque inclusif de la membrane est appliqué pour chaque cellule permettant de mesurer la MFI du CTB AF594 (gauche) et de calculer le nombre de spot (droite) uniquement à la membrane. Comparaison de la MFI du CTB AF594 (C) et du nombre de spots (D) membranaire des cellules stom+ (rouge) et stom- (bleu) après analyse de 20 000 cellules. Tests Mann-Whitney, **** p value > 0.001 154

Figure 53 : transfection du plasmide pmeLUC (A) codant pour la luciférase permettant la détermination de l'ATP extracellulaire à la membrane (B) Après transfection des cellules HEK-293, la protéine recombinante est détectée avec un anticorps anti-myc en immunofluorescence (C) et en cytométrie en flux (D)(Pellegatti et al. 2005)..... 155

Figure 54 : Expression de la protéine recombinante GPI-luciférase cmyc 48 heures après la transfection du plasmide PmeLUC dans les cellules K-562 stom+ (rouge) et stom-(bleu) analysée en cytométrie en flux après marquage avec un anticorps anti-cmyc puis un anticorps secondaire anti-IgG de souris, couplé à BV421. 156

Figure 55 : Exposition de la Phosphatidyl-Sérine (PS) de GRs de 3 Témoins (rouge) et de 3 OHSt (bleu) après marquage à la lactadhérine-FITC 157

Figure 56 : Fluorescence de la sonde calcique dans des populations de GRs Témoins (rouge) et OHSt sans (nt) ou avec traitement de jouvence (réjuvéné). (**A**) Fluorescence de la sonde calcique pour une population de GR de deux individus (Témoin1 et OHSt 1) (**B**) Moyenne de fluorescences de la sonde calcique des GRs provenant des 3 Témoins avant (rouge vif) et après réjuvénation (rouge écarlate), ainsi que pour les GRs des 3 patients OHSt avant (bleu ciel) et après réjuvénation (bleu marine). (**C**) Table montrant la diminution de la fluorescence de la sonde calcique pour les 3 témoins et les 3 patients OHSt après réjuvénation. Tests statistiques one way ANOVA, ns non significatif, * p value < 0.05, *** p value < 0.005, ****p value < 0.001. 158

Figure 57 : Activation de l'influx de Ca2+ dans les GRs décongelés non-réjuvénés témoins et OHSt 159

Figure 58 : Concentration de Na+ intracellulaire dans les GRs après activation de Piezo1 avec Yoda1 162

Figure 59 : Protéomique obtenue par spectrométrie de masse sur les élutions après immunoprécipitation avec un anti-stomatine des SMALPs enrichis en Piezo1 163

Figure 60 : courant enregistrés dans une cellule HEK-293 co-transfectée avec un plasmide Piezo1 et un plasmide GFP, en configuration « cellule attachée » après un protocole paliers de 200msec de pression négative de -5 mmHg de 0 à -85 mmHg (**A**). Courbe du maximum de densité de courant en fonction de la pression (I/P) et régression sigmoïde de Boltzmann (trait noir discontinu) permettant le calcul de la pente et de la P50 (**B**). 164

Figure 61 : Expression de la stomatine et activité de Piezo1 recombinant par mesure en électrophysiologie dans les cellules transfectées et stabilisées avec un plasmide pcEP4-stomatine .. 165

Figure 62 : Mesure de l'ATP relargué par les GRs frais après diverses activations des canaux ioniques mécanosensibles par choc hyposmotique (Hypo 220 mOsms) ou par activation chimique de Piezo1 (Yoda, 10 μM). Des inhibiteurs ont été utilisé en incubant les GR préalablement à la stimulation : 20 minutes dans 20 μ M de carbenoxolone (CBX) ou 20 minutes dans 2.5 μM de la toxine GsMTx4... 166

BIBLIOGRAPHIE

Abascal, Federico, et Rafael Zardoya. 2012. « LRRC8 Proteins Share a Common Ancestor with Pannexins, and May Form Hexameric Channels Involved in Cell-Cell Communication ». *BioEssays* 34 (7): 551-60. https://doi.org/10.1002/bies.201100173.

Albuisson, Juliette, Swetha E. Murthy, Michael Bandell, Bertrand Coste, Hélène Louis-dit-Picard, Jayanti Mathur, Madeleine Fénéant-Thibault, et al. 2013. « Dehydrated Hereditary Stomatocytosislinked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels ». *Nature communications* 4: 1884. https://doi.org/10.1038/ncomms2899.

Allen, S. J., A. O'Donnell, N. D. Alexander, C. S. Mgone, T. E. Peto, J. B. Clegg, M. P. Alpers, et D. J. Weatherall. 1999. « Prevention of Cerebral Malaria in Children in Papua New Guinea by Southeast Asian Ovalocytosis Band 3 ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60 (6): 1056-60. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.1056.

Alvarez, Cora L., Arnaud Chêne, Jean-Philippe Semblat, Benoît Gamain, Claudine Lapouméroulie, Claudio M. Fader, Claude Hattab, et al. 2022. « Homeostasis of Extracellular ATP in Uninfected RBCs from a Plasmodium Falciparum Culture and Derived Microparticles ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1864 (10): 183980. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183980.

Andolfo, Immacolata, Seth L. Alper, Lucia De Franceschi, Carla Auriemma, Roberta Russo, Luigia De Falco, Fara Vallefuoco, et al. 2013. « Multiple Clinical Forms of Dehydrated Hereditary Stomatocytosis Arise from Mutations in PIEZO1 ». *Blood* 121 (19): 3925-35. https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482489.

Andolfo, Immacolata, Roberta Russo, Francesco Manna, Boris E. Shmukler, Antonella Gambale, Giuseppina Vitiello, Gianluca De Rosa, et al. 2015. « Novel Gardos Channel Mutations Linked to Dehydrated Hereditary Stomatocytosis (Xerocytosis) ». *American Journal of Hematology* 90 (10): 921-26. https://doi.org/10.1002/ajh.24117.

Aoki, Takahiko. 2017. « A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins ». *Membranes* 7 (4): 56. https://doi.org/10.3390/membranes7040056.

Appelman, Monique D., Marion J.D. Robin, Esther W.M. Vogels, Christie Wolzak, Winnie G. Vos, Harmjan R. Vos, Robert M. Van Es, Boudewijn M.T. Burgering, et Stan F.J. Van de Graaf. 2020. « The Lipid Raft Component Stomatin Interacts with the Na+ Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) and Modulates Bile Salt Uptake ». *Cells* 9 (4). https://doi.org/10.3390/cells9040986.

Argent, A. C., M. C. Chetty, B. Fricke, Y. Bertrand, N. Philippe, S. Khogali, M. von Düring, J. Delaunay, et G. W. Stewart. 2004. « A Family Showing Recessively Inherited Multisystem Pathology with Aberrant Splicing of the Erythrocyte Band 7.2b ('stomatin') Gene ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 27 (1): 29-46. https://doi.org/10.1023/B:BOLI.0000016624.21475.de.

Arnadottir, Johanna, et Martin Chalfie. 2010. « Eukaryotic Mechanosensitive Channels | Annual Review of Biophysics ». 2010. https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125836?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed.

Ataga, Kenneth I., et Jonathan Stocker. 2009. « Senicapoc (ICA-17043): A Potential Therapy for the Prevention and Treatment of Hemolysis-Associated Complications in Sickle Cell Anemia ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 18 (2): 231-39. https://doi.org/10.1517/13543780802708011.

Bae, Chilman, Radhakrishnan Gnanasambandam, Chris Nicolai, Frederick Sachs, et Philip A. Gottlieb. 2013. « Xerocytosis is caused by mutations that alter the kinetics of the mechanosensitive channel PIEZO1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (12): E1162-68. https://doi.org/10.1073/pnas.1219777110.

Bae, Chilman, Frederick Sachs, et Philip A. Gottlieb. 2011. « The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4 ». *Biochemistry* 50 (29): 6295-6300. https://doi.org/10.1021/bi200770q.

Bagchi, Sonchita, Robert Fredriksson, et Åsa Wallén-Mackenzie. 2015. « In Situ Proximity Ligation Assay (PLA) ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1318: 149-59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_15.

Balach, Melisa M., Cesar H. Casale, et Alexis N. Campetelli. 2019. « Erythrocyte plasma membrane potential: past and current methods for its measurement ». *Biophysical Reviews* 11 (6): 995-1005. https://doi.org/10.1007/s12551-019-00603-5.

Bao, Li, Silviu Locovei, et Gerhard Dahl. 2004. « Pannexin Membrane Channels Are Mechanosensitive Conduits for ATP ». *FEBS Letters* 572 (1-3): 65-68. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.009.

Boas, Franz Edward, Linda Forman, et Ernest Beutler. 1998. « Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 3077-81. https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3077.

Boassa, Daniela, Feng Qiu, Gerhard Dahl, et Gina Sosinsky. 2008. « TRAFFICKING DYNAMICS OF GLYCOSYLATED PANNEXIN1 PROTEINS ». *Cell communication & adhesion* 15 (1): 119-32. https://doi.org/10.1080/15419060802013885.

Bogdanova, Anna, Jeroen S. Goede, Erwin Weiss, Nikolay Bogdanov, Poul Bennekou, Ingolf Bernhardt, et Hans U. Lutz. 2010. « Cryohydrocytosis: increased activity of cation carriers in red cells from a patient with a band 3 mutation ». *Haematologica* 95 (2): 189-98. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.010215.

Botello-Smith, Wesley M., Wenjuan Jiang, Han Zhang, Alper D. Ozkan, Yi-Chun Lin, Christine N. Pham, Jérôme J. Lacroix, et Yun Luo. 2019. « A Mechanism for the Activation of the Mechanosensitive Piezo1 Channel by the Small Molecule Yoda1 ». *Nature Communications* 10 (1): 1-10. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12501-1.

Brand, Janko, Ewan St J. Smith, David Schwefel, Liudmila Lapatsina, Kate Poole, Damir Omerbašić, Alexey Kozlenkov, Joachim Behlke, Gary R. Lewin, et Oliver Daumke. 2012. « A Stomatin Dimer Modulates the Activity of Acid-Sensing Ion Channels ». *The EMBO Journal* 31 (17): 3635-46. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.203.

Bretscher, Mark S. 1972. « Phosphatidyl-Ethanolamine: Differential Labelling in Intact Cells and Cell Ghosts of Human Erythrocytes by a Membrane-Impermeable Reagent ». *Journal of Molecular Biology* 71 (3): 523-28. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(72)80020-2.

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* 111 (9): 3614-19. https://doi.org/10.1073/pnas.1320768111.

Bruce, Lesley J., Hélène Guizouarn, Nicholas M. Burton, Nicole Gabillat, Joyce Poole, Joanna F. Flatt, R. Leo Brady, Franck Borgese, Jean Delaunay, et Gordon W. Stewart. 2009. « The Monovalent Cation Leak in Overhydrated Stomatocytic Red Blood Cells Results from Amino Acid Substitutions in the Rh-Associated Glycoprotein ». *Blood* 113 (6): 1350-57. https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-171140.

Bruce, Lesley J., Hannah C. Robinson, Hélène Guizouarn, Franck Borgese, Penny Harrison, May-Jean King, Jeroen S. Goede, et al. 2005. « Monovalent Cation Leaks in Human Red Cells Caused by Single Amino-Acid Substitutions in the Transport Domain of the Band 3 Chloride-Bicarbonate Exchanger, AE1 ». *Nature Genetics* 37 (11): 1258-63. https://doi.org/10.1038/ng1656.

Bryk, Agata H., et Jacek R. Wiśniewski. 2017. « Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome ». *Journal of Proteome Research* 16 (8): 2752-61. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00025.

Buyan, Amanda, Charles D. Cox, Jonathan Barnoud, Jinyuan Li, Hannah S. M. Chan, Boris Martinac, Siewert J. Marrink, et Ben Corry. 2020. « Piezo1 Forms Specific, Functionally Important Interactions with Phosphoinositides and Cholesterol ». *Biophysical Journal* 119 (8): 1683-97. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.07.043.

Cahalan, Stuart M., Viktor Lukacs, Sanjeev S. Ranade, Shu Chien, Michael Bandell, et Ardem Patapoutian. 2015. « Piezo1 Links Mechanical Forces to Red Blood Cell Volume ». *ELife* 4 (mai). https://doi.org/10.7554/eLife.07370.

Caulier, A., R. Rapetti-Mauss, H. Guizouarn, V. Picard, L. Garçon, et C. Badens. 2018. « Primary Red Cell Hydration Disorders: Pathogenesis and Diagnosis ». *International Journal of Laboratory Hematology* 40 (S1): 68-73. https://doi.org/10.1111/ijlh.12820.

Cheng, Yuan-Ren, Bo-Yang Jiang, et Chih-Cheng Chen. 2018. « Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing ». *Journal of Biomedical Science* 25 (1): 46. https://doi.org/10.1186/s12929-018-0448-y.

Chiu, Yu-Hsin, Xueyao Jin, Christopher B. Medina, Susan A. Leonhardt, Volker Kiessling, Brad C. Bennett, Shaofang Shu, et al. 2017. « A Quantized Mechanism for Activation of Pannexin Channels ». *Nature Communications* 8: 14324. https://doi.org/10.1038/ncomms14324.

Chong, Jiehan, Dario De Vecchis, Adam J. Hyman, Oleksandr V. Povstyan, Jian Shi, David J. Beech, et Antreas C. Kalli. 2019. « Computational Reconstruction of the Complete Piezo1 Structure Reveals a Unique Footprint and Specific Lipid Interactions ». *BioRxiv*, septembre, 783753. https://doi.org/10.1101/783753.

Cinar, Eyup, Sitong Zhou, James DeCourcey, Yixuan Wang, Richard E. Waugh, et Jiandi Wan. 2015. « Piezo1 regulates mechanotransductive release of ATP from human RBCs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (38): 11783-88. https://doi.org/10.1073/pnas.1507309112.

Clapham, David E. 2007. « Calcium Signaling ». *Cell* 131 (6): 1047-58. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028.

Clark, Margaret R., Narla Mohandas, et Stephen B. Shohet. 1983. « Osmotic Gradient Ektacytometry: Comprehensive Characterization of Red Cell Volume and Surface Maintenance ». *Blood* 61 (5): 899-910. https://doi.org/10.1182/blood.V61.5.899.899.

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.

Coste, Bertrand, Bailong Xiao, Jose S. Santos, Ruhma Syeda, Jörg Grandl, Kathryn S. Spencer, Sung Eun Kim, et al. 2012. « Piezos are pore-forming subunits of mechanically activated channels ». *Nature* 483 (7388): 176-81. https://doi.org/10.1038/nature10812.

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). https://doi.org/10.1038/ncomms10366.

Cox, Charles D., Boris Martinac, et Kathleen E. Navis. 2017. « Origin of the Force: The Force-From-Lipids Principle Applied to Piezo Channels ». *Current Topics in Membranes* 79 (janvier): 59-96. https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2016.09.001.

Da Costa, Lydie, Julie Galimand, Odile Fenneteau, et Narla Mohandas. 2013. « Hereditary Spherocytosis, Elliptocytosis, and Other Red Cell Membrane Disorders ». *Blood Reviews* 27 (4): 167-78. https://doi.org/10.1016/j.blre.2013.04.003.

Danielczok, Jens G., Emmanuel Terriac, Laura Hertz, Polina Petkova-Kirova, Franziska Lautenschläger, Matthias W. Laschke, et Lars Kaestner. 2017. « Red Blood Cell Passage of Small Capillaries Is Associated with Transient Ca2+-Mediated Adaptations ». *Frontiers in Physiology* 8. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00979.

Darghouth, Dhouha, Bérengère Koehl, Jean François Heilier, Geoffrey Madalinski, Petra Bovee, Giel Bosman, Jean Delaunay, Christophe Junot, et Paul-Henri Roméo. 2011. « Alterations of red blood cell metabolome in overhydrated hereditary stomatocytosis ». *Haematologica* 96 (12): 1861-65. https://doi.org/10.3324/haematol.2011.045179.

Delmas, Patrick, Jizhe Hao, et Lise Rodat-Despoix. 2011. « Molecular Mechanisms of Mechanotransduction in Mammalian Sensory Neurons ». *Nature Reviews Neuroscience* 12 (3): 139-53. https://doi.org/10.1038/nrn2993.

Deng, Zengqin, Zhihui He, Grigory Maksaev, Ryan M. Bitter, Michael Rau, James A. J. Fitzpatrick, et Peng Yuan. 2020. « Cryo-EM Structures of the ATP Release Channel Pannexin 1 ». *Nature Structural & Molecular Biology* 27 (4): 373-81. https://doi.org/10.1038/s41594-020-0401-0.

Desplat, Angélique, Virginie Penalba, Emeline Gros, Thibaud Parpaite, Bertrand Coste, et Patrick Delmas. 2021. « Piezo1-Pannexin1 Complex Couples Force Detection to ATP Secretion in Cholangiocytes ». *The Journal of General Physiology* 153 (12): e202112871. https://doi.org/10.1085/jgp.202112871.

Desrames, Alexandra, Sandrine Genetet, Maëlenn Païline Delcourt, Dominique Goossens, et Isabelle Mouro-Chanteloup. 2020. « Detergent-Free Isolation of Native Red Blood Cell Membrane Complexes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862 (2): 183126. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183126.

Dodge, James T., Carolyn Mitchell, et Donald J. Hanahan. 1963. « The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 100 (1): 119-30. https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90042-0.

Drew, Liam J, et John N Wood. 2005. « Worm Sensation! » *Molecular Pain* 1 (janvier): 1744-8069-1-8. https://doi.org/10.1186/1744-8069-1-8.

Dyrda, Agnieszka, Urszula Cytlak, Anna Ciuraszkiewicz, Agnieszka Lipinska, Anne Cueff, Guillaume Bouyer, Stéphane Egée, Poul Bennekou, Virgilio L. Lew, et Serge L. Y. Thomas. 2010. « Local Membrane Deformations Activate Ca2+-Dependent K+ and Anionic Currents in Intact Human Red Blood Cells ». *PloS One* 5 (2): e9447. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009447.

Eber, Stefan, et Samuel E Lux. 2004. « Hereditary Spherocytosis—Defects in Proteins That Connect the Membrane Skeleton to the Lipid Bilayer ». *Seminars in Hematology*, Erythrocyte Membrane Proteins and Their Diseases, 41 (2): 118-41. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2004.01.002.

Eber, Stefan W., Jennifer M. Gonzalez, Marcia L. Lux, Alphonse L. Scarpa, William T. Tse, Marion Dornwell, Jutta Herbers, et al. 1996. « Ankyrin–1 Mutations Are a Major Cause of Dominant and Recessive Hereditary Spherocytosis ». *Nature Genetics* 13 (2): 214-18. https://doi.org/10.1038/ng0696-214.

Evans, E. A., et R. M. Hochmuth. 1976. « Membrane Viscoelasticity ». *Biophysical Journal* 16 (1): 1-11. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(76)85658-5.

Fairbanks, G., T. L. Steck, et D. F. Wallach. 1971. « Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane ». *Biochemistry* 10 (13): 2606-17. https://doi.org/10.1021/bi00789a030.

Flatt, Joanna F., et Lesley J. Bruce. 2018. « The Molecular Basis for Altered Cation Permeability in Hereditary Stomatocytic Human Red Blood Cells ». *Frontiers in Physiology* 9: 367. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00367.

Flatt, Joanna F., Hélène Guizouarn, Nicholas M. Burton, Franck Borgese, Richard J. Tomlinson, Robert J. Forsyth, Stephen A. Baldwin, et al. 2011. « Stomatin-Deficient Cryohydrocytosis Results from Mutations in SLC2A1: A Novel Form of GLUT1 Deficiency Syndrome ». *Blood* 118 (19): 5267-77. https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326645.

Fotiou, Elisavet, Silvia Martin-Almedina, Michael A. Simpson, Shin Lin, Kristiana Gordon, Glen Brice, Giles Atton, et al. 2015. « Novel mutations in PIEZO1 cause an autosomal recessive generalized lymphatic dysplasia with non-immune hydrops fetalis ». *Nature Communications* 6 (septembre): 8085. https://doi.org/10.1038/ncomms9085.

Freedman, Jeffrey C. 2001. « 23 - Membrane Transport in Red Blood Cells ». In *Cell Physiology Source Book (Third Edition)*, édité par Nicholas Sperelakis, 377-92. San Diego: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-012656976-6/50115-3.

Fricke, Britta, Annette C. Argent, Margaret C. Chetty, Arnold R. Pizzey, E. Jane Turner, Mei M. Ho, Achille Iolascon, Monika von Düring, et Gordon W. Stewart. 2003. « The "Stomatin" Gene and Protein in Overhydrated Hereditary Stomatocytosis ». *Blood* 102 (6): 2268-77. https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1705.

Fricke, Britta, Helen G. Jarvis, Cecil D. L. Reid, Patricia Aguilar-Martinez, A. Robert, P. Quittet, Margaret Chetty, et al. 2004. « Four New Cases of Stomatin-Deficient Hereditary Stomatocytosis Syndrome: Association of the Stomatin-Deficient Cryohydrocytosis Variant with Neurological Dysfunction ». *British Journal of Haematology* 125 (6): 796-803. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04965.x.

Fricke, Britta, Stephen F. Parsons, Gisela Knöpfle, Monika von Düring, et Gordon W. Stewart. 2005. « Stomatin Is Mis-Trafficked in the Erythrocytes of Overhydrated Hereditary Stomatocytosis, and Is Absent from Normal Primitive Yolk Sac-Derived Erythrocytes ». *British Journal of Haematology* 131 (2): 265-77. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05742.x.

Gallagher, P. G., M. Upender, D. C. Ward, et B. G. Forget. 1993. « The Gene for Human Erythrocyte Membrane Protein Band 7.2 (EPB72) Maps to 9q33-Q34 Centromeric to the Philadelphia Chromosome Translocation Breakpoint Region ». *Genomics* 18 (1): 167-69. https://doi.org/10.1006/geno.1993.1449.

Gallagher, Patrick G. 2004. « Hereditary Elliptocytosis: Spectrin and Protein 4.1R ». *Seminars in Hematology*, Erythrocyte Membrane Proteins and Their Diseases, 41 (2): 142-64. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2004.01.003.

Gautier, Emilie-Fleur, Sarah Ducamp, Marjorie Leduc, Virginie Salnot, François Guillonneau, Michael Dussiot, John Hale, et al. 2016. « Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis ». *Cell Reports* 16 (5): 1470-84. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.085.

Ge, Jingpeng, Wanqiu Li, Qiancheng Zhao, Ningning Li, Maofei Chen, Peng Zhi, Ruochong Li, Ning Gao, Bailong Xiao, et Maojun Yang. 2015. « Architecture of the Mammalian Mechanosensitive Piezo1 Channel ». *Nature* 527 (7576): 64-69. https://doi.org/10.1038/nature15247.

Genetet, Sandrine, Alexandra Desrames, Youcef Chouali, Pierre Ripoche, Claude Lopez, et Isabelle Mouro-Chanteloup. 2017a. « Stomatin Modulates the Activity of the Anion Exchanger 1 (AE1, SLC4A1) ». *Scientific Reports* 7: 46170. https://doi.org/10.1038/srep46170.

———. 2017b. « Stomatin Modulates the Activity of the Anion Exchanger 1 (AE1, SLC4A1) ». *Scientific Reports* 7: 46170. https://doi.org/10.1038/srep46170.

Genetet, Sandrine, Pierre Ripoche, Julien Picot, Sylvain Bigot, Jean Delaunay, Corinne Armari-Alla, Yves Colin, et Isabelle Mouro-Chanteloup. 2012. « Human RhAG Ammonia Channel Is Impaired by the Phe65Ser Mutation in Overhydrated Stomatocytic Red Cells ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 302 (2): C419-428. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00092.2011.

Girard, Christophe, et Florian Lesage. 2004. « Canaux K2P neuronaux : aspects moléculaires et fonctionnels ». *M/S : médecine sciences* 20 (5): 544-49.

Gnanasambandam, Radhakrishnan, Chilman Bae, Philip A. Gottlieb, et Frederick Sachs. 2015. « Ionic Selectivity and Permeation Properties of Human PIEZO1 Channels ». *PLoS ONE* 10 (5): e0125503. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125503.

Gnanasambandam, Radhakrishnan, Chiranjib Ghatak, Anthony Yasmann, Kazuhisa Nishizawa, Frederick Sachs, Alexey S. Ladokhin, Sergei I. Sukharev, et Thomas M. Suchyna. 2017. « GsMTx4: Mechanism of Inhibiting Mechanosensitive Ion Channels ». *Biophysical Journal* 112 (1): 31-45. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.013.

González-Alonso, José, David B. Olsen, et Bengt Saltin. 2002. « Erythrocyte and the Regulation of Human Skeletal Muscle Blood Flow and Oxygen Delivery: Role of Circulating ATP ». *Circulation Research* 91 (11): 1046-55. https://doi.org/10.1161/01.res.0000044939.73286.e2.

Goodman, Miriam B., Glen G. Ernstrom, Dattananda S. Chelur, Robert O'Hagan, C. Andrea Yao, et Martin Chalfie. 2002. « MEC-2 Regulates C. Elegans DEG/ENaC Channels Needed for Mechanosensation ». *Nature* 415 (6875): 1039-42. https://doi.org/10.1038/4151039a.

Gratzer, W B. 1981. « The red cell membrane and its cytoskeleton. » *Biochemical Journal* 198 (1): 1-8.

Guizouarn, Hélène, Franck Borgese, Nicole Gabillat, Penny Harrison, Jeroen S. Goede, Corrina McMahon, Gordon W. Stewart, et Lesley J. Bruce. 2011. « South-East Asian Ovalocytosis and the Cryohydrocytosis Form of Hereditary Stomatocytosis Show Virtually Indistinguishable Cation Permeability Defects ». *British Journal of Haematology* 152 (5): 655-64. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08454.x.

Hanlon, B. A., et M. R. Wallace. 2002. « Structure and Function of Voltage-Dependent Ion Channel Regulatory β Subunits | Biochemistry ». 2002. https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi0119565.

Heyningen, Simon van. 1974. « Cholera Toxin: Interaction of Subunits with Ganglioside GM1 ». *Science* 183 (4125): 656-57. https://doi.org/10.1126/science.183.4125.656.

Hidalgo, Patricia, et Alan Neely. 2007. « Multiplicity of Protein Interactions and Functions of the Voltage-Gated Calcium Channel β-Subunit ». *Cell Calcium*, Calcium Channels and Transporters, 42 (4): 389-96. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.05.009.

Hiebl-Dirschmied, C. M., B. Entler, C. Glotzmann, I. Maurer-Fogy, C. Stratowa, et R. Prohaska. 1991. « Cloning and Nucleotide Sequence of CDNA Encoding Human Erythrocyte Band 7 Integral Membrane Protein ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1090 (1): 123-24. https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90047-p.

Huang, M., G. Gu, E. L. Ferguson, et M. Chalfie. 1995. « A Stomatin-like Protein Necessary for Mechanosensation in C. Elegans ». *Nature* 378 (6554): 292-95. https://doi.org/10.1038/378292a0.

Huber, Tobias B., Bernhard Schermer, Roman Ulrich Müller, Martin Höhne, Malte Bartram, Andrea Calixto, Henning Hagmann, et al. 2006. « Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46): 17079-86. https://doi.org/10.1073/pnas.0607465103.

Ingram, V. M. 1957. « Gene Mutations in Human Hæmoglobin: The Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Hæmoglobin ». *Nature* 180 (4581): 326-28. https://doi.org/10.1038/180326a0.

Ji, Peng, Maki Murata-Hori, et Harvey F. Lodish. 2011. « Formation of mammalian erythrocytes: Chromatin condensation and enucleation ». *Trends in cell biology* 21 (7): 409-15. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.003.

Jin, Qiuheng, Bo Zhang, Xiang Zheng, Ningning Li, Lingyi Xu, Yuan Xie, Fangjun Song, et al. 2020. « Cryo-EM structures of human pannexin 1 channel ». *Cell Research* 30 (5): 449-51. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0310-0.

Kadurin, Ivan, Stephan Huber, et Stefan Gründer. 2009. « A Single Conserved Proline Residue Determines the Membrane Topology of Stomatin ». *The Biochemical Journal* 418 (3): 587-94. https://doi.org/10.1042/BJ20081662.

Kasuya, Go, Takanori Nakane, Takeshi Yokoyama, Yanyan Jia, Masato Inoue, Kengo Watanabe, Ryoki Nakamura, et al. 2018. « Cryo-EM Structures of the Human Volume-Regulated Anion Channel LRRC8 ». *Nature Structural & Molecular Biology* 25 (9): 797-804. https://doi.org/10.1038/s41594-018-0109-6.

Katta, Samata, Michael Krieg, et Miriam B. Goodman. 2015. « Feeling Force: Physical and Physiological Principles Enabling Sensory Mechanotransduction ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31 (1): 347-71. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013426.

Kefauver, J. M., A. B. Ward, et A. Patapoutian. 2020. « Discoveries in structure and physiology of mechanically activated ion channels ». *Nature* 587 (7835): 567-76. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2933-1.

Keller, Alexander S., Lukas Diederich, Christina Panknin, Leon J. DeLalio, Joshua C. Drake, Robyn Sherman, Edwin Kerry Jackson, et al. 2017. « Possible roles for ATP release from RBCs exclude the cAMP-mediated Panx1 pathway ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 313 (6): C593-603. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00178.2017.

Knowles, Timothy J., Rachael Finka, Corinne Smith, Yu-Pin Lin, Tim Dafforn, et Michael Overduin. 2009. « Membrane Proteins Solubilized Intact in Lipid Containing Nanoparticles Bounded by Styrene Maleic Acid Copolymer ». *Journal of the American Chemical Society* 131 (22): 7484-85. https://doi.org/10.1021/ja810046q.

Krishtal, O. A., et V. I. Pidoplichko. 1981. « A Receptor for Protons in the Membrane of Sensory Neurons May Participate in Nociception ». *Neuroscience* 6 (12): 2599-2601. https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90105-6.

Kung, Ching. 2005. « A Possible Unifying Principle for Mechanosensation ». *Nature* 436 (7051): 647-54. https://doi.org/10.1038/nature03896.

Kuzuya, Maki, Hidemi Hirano, Kenichi Hayashida, Masakatsu Watanabe, Kazumi Kobayashi, Tohru Terada, Md Iqbal Mahmood, et al. 2022. « Structures of Human Pannexin-1 in Nanodiscs Reveal Gating Mediated by Dynamic Movement of the N Terminus and Phospholipids ». *Science Signaling* 15 (720): eabg6941. https://doi.org/10.1126/scisignal.abg6941.

Lande, W. M., P. V. Thiemann, et W. C. Mentzer. 1982. « Missing Band 7 Membrane Protein in Two Patients with High Na, Low K Erythrocytes ». *The Journal of Clinical Investigation* 70 (6): 1273-80. https://doi.org/10.1172/jci110726.

Lapatsina, Liudmilla, Janko Brand, Kate Poole, Oliver Daumke, et Gary R. Lewin. 2012. « Stomatin-Domain Proteins ». *European Journal of Cell Biology* 91 (4): 240-45. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.01.018.

Larkin, Timothy J., et Philip W. Kuchel. 2010. « Mathematical Models of Naturally "Morphed" Human Erythrocytes: Stomatocytes and Echinocytes ». *Bulletin of Mathematical Biology* 72 (6): 1323-33. https://doi.org/10.1007/s11538-009-9493-8.

Lassen, U. V., et O. Sten-Knudsen. 1968. « Direct Measurements of Membrane Potential and Membrane Resistance of Human Red Cells ». *The Journal of Physiology* 195 (3): 681-96. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008482.

Lew, Virgilio L., Teresa Tiffert, Zipora Etzion, Deisy Perdomo, Nuala Daw, Lynn Macdonald, et Robert M. Bookchin. 2005. « Distribution of dehydration rates generated by maximal Gardos-channel activation in normal and sickle red blood cells ». *Blood* 105 (1): 361-67. https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0125.

Liem, Robert I., et Patrick G. Gallagher. 2005. « Molecular Mechanisms in the Inherited Red Cell Membrane Disorders ». *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2 (4): 539-45. https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2005.11.004.

Lin, Yi-Chih, Yusong R Guo, Atsushi Miyagi, Jesper Levring, Roderick MacKinnon, et Simon Scheuring. 2019. « Force-induced conformational changes in Piezo1 ». *Nature* 573 (7773): 230-34. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1499-2.

Lock, S. P., R. S. Smith, et R. M. Hardisty. 1961. « Stomatocytosis: A Hereditary Red Cell Anomally Associated with Haemolytic Anaemia ». *British Journal of Haematology* 7 (juillet): 303-14. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1961.tb00341.x.

Locovei, Silviu, Li Bao, et Gerhard Dahl. 2006. « Pannexin 1 in Erythrocytes: Function without a Gap ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (20): 7655-59. https://doi.org/10.1073/pnas.0601037103.

Lozzio, C. B., et B. B. Lozzio. 1975. « Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line with Positive Philadelphia Chromosome ». *Blood* 45 (3): 321-34.

Lux, Samuel E. 2008. « Disorders of red cell membrane - An - 2008 - British Journal of Haematology - Wiley Online Library ». 2008. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2008.07091.x.

Lux, Samuel E. 2016. « Anatomy of the Red Cell Membrane Skeleton: Unanswered Questions ». *Blood* 127 (2): 187-99. https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772.

Marquardt, Drew, Barbara Geier, et Georg Pabst. 2015. « Asymmetric Lipid Membranes: Towards More Realistic Model Systems ». *Membranes* 5 (2): 180-96. https://doi.org/10.3390/membranes5020180.

Martinac, B. 2001. « Mechanosensitive Channels in Prokaryotes ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 11 (2): 61-76. https://doi.org/10.1159/000047793.

Martinac, B, M Buechner, A H Delcour, J Adler, et C Kung. 1987. « Pressure-sensitive ion channel in Escherichia coli. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (8): 2297-2301.

Martinac, Boris, Julius Adler, et Ching Kung. 1990. « Mechanosensitive Ion Channels of E. Coli Activated by Amphipaths ». *Nature* 348 (6298): 261-63. https://doi.org/10.1038/348261a0.

Martin-Almedina, Silvia, Sahar Mansour, et Pia Ostergaard. 2018. « Human Phenotypes Caused by PIEZO1 Mutations; One Gene, Two Overlapping Phenotypes? » *The Journal of Physiology* 596 (6): 985-92. https://doi.org/10.1113/JP275718.

Mebius, Reina E., et Georg Kraal. 2005. « Structure and Function of the Spleen ». *Nature Reviews. Immunology* 5 (8): 606-16. https://doi.org/10.1038/nri1669.

Meyer, Erin K., Deborah F. Dumont, Sharry Baker, et Larry J. Dumont. 2011. « Rejuvenation Capacity of Red Blood Cells in Additive Solutions over Long-Term Storage ». *Transfusion* 51 (7): 1574-79. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.03021.x.

Michalski, Kevin, Johanna L Syrjanen, Erik Henze, Julia Kumpf, Hiro Furukawa, et Toshimitsu Kawate. 2020. « The Cryo-EM structure of pannexin 1 reveals unique motifs for ion selection and inhibition ». *eLife* 9. https://doi.org/10.7554/eLife.54670.

Mohandas, N., J. A. Chasis, et S. B. Shohet. 1983. « The Influence of Membrane Skeleton on Red Cell Deformability, Membrane Material Properties, and Shape ». *Seminars in Hematology* 20 (3): 225-42.

Montel-Hagen, Amélie, Sandrina Kinet, Nicolas Manel, Cédric Mongellaz, Rainer Prohaska, Jean-Luc Battini, Jean Delaunay, Marc Sitbon, et Naomi Taylor. 2008. « Erythrocyte Glut1 Triggers Dehydroascorbic Acid Uptake in Mammals Unable to Synthesize Vitamin C ». *Cell* 132 (6): 1039-48. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.042.

Moras, Martina, Sophie D. Lefevre, et Mariano A. Ostuni. 2017. « From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals ». *Frontiers in Physiology* 8 (décembre): 1076. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01076.

Mrówczyńska, Lucyna, Christer Lindqvist, Aleš Iglič, et Henry Hägerstrand. 2012. « Spontaneous Curvature of Ganglioside GM1--Effect of Cross-Linking ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422 (4): 776-79. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.083.

Murthy, Swetha E, Adrienne E Dubin, Tess Whitwam, Sebastian Jojoa-Cruz, Stuart M Cahalan, Seyed Ali Reza Mousavi, Andrew B Ward, et Ardem Patapoutian. 2018. « OSCA/TMEM63 are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels ». Édité par Baron Chanda, Richard Aldrich, et Eric Honoré. *eLife* 7 (novembre): e41844. https://doi.org/10.7554/eLife.41844.

Naumann, S., D. Reutzel, M. Speicher, et H. J. Decker. 2001. « Complete Karyotype Characterization of the K562 Cell Line by Combined Application of G-Banding, Multiplex-Fluorescence in Situ Hybridization, Fluorescence in Situ Hybridization, and Comparative Genomic Hybridization ». *Leukemia Research* 25 (4): 313-22. https://doi.org/10.1016/s0145-2126(00)00125-9.

Navis, Kathleen E., Churmy Y. Fan, Tuan Trang, Roger J. Thompson, et Darren J. Derksen. 2020. « Pannexin 1 Channels as a Therapeutic Target: Structure, Inhibition, and Outlook ». *ACS Chemical Neuroscience* 11 (15): 2163-72. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00333.

Owsianik, Grzegorz, Karel Talavera, Thomas Voets, et Bernd Nilius. 2006. « Permeation and Selectivity of TRP Channels ». *Annual Review of Physiology* 68: 685-717. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406.

Palis, James. 2014. « Primitive and definitive erythropoiesis in mammals ». *Frontiers in Physiology* 5 (janvier): 3. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00003.

Panchina, Yuri, Ilya Kelmanson, Mikhail Matz, Konstantin Lukyanov, Natalia Usman, et Sergey Lukyanov. 2000. « A Ubiquitous Family of Putative Gap Junction Molecules ». *Current Biology* 10 (13): R473-74. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00576-5.

Pawloski, John R., Douglas T. Hess, et Jonathan S. Stamler. 2005. « Impaired vasodilation by red blood cells in sickle cell disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (7): 2531-36. https://doi.org/10.1073/pnas.0409876102.

Pellegatti, Patrizia, Simonetta Falzoni, Paolo Pinton, Rosario Rizzuto, et Francesco Di Virgilio. 2005. « A Novel Recombinant Plasma Membrane-targeted Luciferase Reveals a New Pathway for ATP Secretion ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (8): 3659-65. https://doi.org/10.1091/mbc.e05-03-0222.

Penuela, Silvia, Ruchi Gehi, et Dale W. Laird. 2013. « The Biochemistry and Function of Pannexin Channels ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, The Communicating junctions, roles and dysfunctions, 1828 (1): 15-22. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.017.

Perrotta, Silverio, Patrick G. Gallagher, et Narla Mohandas. 2008. « Hereditary Spherocytosis ». *The Lancet* 372 (9647): 1411-26. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61588-3.

Poole, Kate, Regina Herget, Liudmila Lapatsina, Ha-Duong Ngo, et Gary R. Lewin. 2014. « Tuning Piezo Ion Channels to Detect Molecular-Scale Movements Relevant for Fine Touch ». *Nature Communications* 5 (mars): 3520. https://doi.org/10.1038/ncomms4520.

Price, Margaret P., Robert J. Thompson, Jayasheel O. Eshcol, John A. Wemmie, et Christopher J. Benson. 2004. « Stomatin Modulates Gating of Acid-Sensing Ion Channels ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (51): 53886-91. https://doi.org/10.1074/jbc.M407708200.

Qi, Yanmei, Laura Andolfi, Flavia Frattini, Florian Mayer, Marco Lazzarino, et Jing Hu. 2015. « Membrane Stiffening by STOML3 Facilitates Mechanosensation in Sensory Neurons ». *Nature Communications* 6 (1): 8512. https://doi.org/10.1038/ncomms9512.

Qiu, Feng, et Gerhard Dahl. 2009. « A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 296 (2): C250-55. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00433.2008.

Qiu, Feng, Junjie Wang, David C. Spray, Eliana Scemes, et Gerhard Dahl. 2011. « Two Non-Vesicular ATP Release Pathways in the Mouse Erythrocyte Membrane ». *FEBS Letters* 585 (21): 3430-35. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.033.

Qiu, Zhaozhu, Adrienne E. Dubin, Jayanti Mathur, Buu Tu, Kritika Reddy, Loren J. Miraglia, Jürgen Reinhardt, Anthony P. Orth, et Ardem Patapoutian. 2014. « SWELL1, a Plasma Membrane Protein, Is an Essential Component of Volume-Regulated Anion Channel ». *Cell* 157 (2): 447-58. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.024.

Qu, Ronggui, Lili Dong, Jilin Zhang, Xuekui Yu, Lei Wang, et Shujia Zhu. 2020. « Cryo-EM structure of human heptameric Pannexin 1 channel ». *Cell Research* 30 (5): 446-48. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0298-5.

Rapetti-Mauss, Raphael, Caroline Lacoste, Véronique Picard, Corinne Guitton, Elise Lombard, Marie Loosveld, Vanessa Nivaggioni, et al. 2015. « A mutation in the Gardos channel is associated with hereditary xerocytosis ». *Blood* 126 (11): 1273-80. https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-642496.

Rapetti-Mauss, Raphaël, Véronique Picard, Corinne Guitton, Khaldoun Ghazal, Valérie Proulle, Catherine Badens, Olivier Soriani, Loïc Garçon, et Hélène Guizouarn. 2017. « Red Blood Cell Gardos Channel (KCNN4): The Essential Determinant of Erythrocyte Dehydration in Hereditary Xerocytosis ». *Haematologica* 102 (10): e415-18. https://doi.org/10.3324/haematol.2017.171389.

Rapetti-Mauss, Raphael, Olivier Soriani, Henri Vinti, Catherine Badens, et Hélène Guizouarn. 2016. « Senicapoc: A Potent Candidate for the Treatment of a Subset of Hereditary Xerocytosis Caused by Mutations in the Gardos Channel ». *Haematologica* 101 (11): e431-35. https://doi.org/10.3324/haematol.2016.149104.

Reardon, David M., Carol A. Seymour, Timothy M. Cox, Jennifer C. Pinder, Ann E. Schofield, et Michael J. A. Tanner. 1993. « Hereditary Ovalocytosis with Compensated Haemolysis ». *British Journal of Haematology* 85 (1): 197-99. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb08670.x.

Richards, Mark W., Adrian J. Butcher, et Annette C. Dolphin. 2004. « Ca2+ Channel β-Subunits: Structural Insights AID Our Understanding ». *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (12): 626-32. https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.10.008.

Ridone, Pietro, Elvis Pandzic, Massimo Vassalli, Charles D. Cox, Alexander Macmillan, Philip A. Gottlieb, et Boris Martinac. 2020. « Disruption of Membrane Cholesterol Organization Impairs the Activity of PIEZO1 Channel Clusters ». *The Journal of General Physiology* 152 (8). https://doi.org/10.1085/jgp.201912515.

Rivera, Alicia, David H. Vandorpe, Boris E. Shmukler, Denis R. Gallagher, Christopher C. Fikry, Frans A. Kuypers, Carlo Brugnara, L. Michael Snyder, et Seth L. Alper. 2017. « Erythrocytes from Hereditary Xerocytosis Patients Heterozygous for KCNN4 V282M Exhibit Increased Spontaneous Gardos Channel-like Activity Inhibited by Senicapoc ». *American Journal of Hematology* 92 (6): E108-10. https://doi.org/10.1002/ajh.24716.

Ruan, Zheng, Ian J. Orozco, Juan Du, et Wei Lü. 2020. « Structures of Human Pannexin 1 Reveal Ion Pathways and Mechanism of Gating ». *Nature*, juin. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2357-y.

Rungaldier, Stefanie, Walter Oberwagner, Ulrich Salzer, Edina Csaszar, et Rainer Prohaska. 2013. « Stomatin Interacts with GLUT1/SLC2A1, Band 3/SLC4A1, and Aquaporin-1 in Human Erythrocyte Membrane Domains ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828 (3): 956-66. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.030.

Rungaldier, Stefanie, Ellen Umlauf, Mario Mairhofer, Ulrich Salzer, Christoph Thiele, et Rainer Prohaska. 2017. « Structure-function analysis of human stomatin: A mutation study ». *PLoS ONE* 12 (6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178646.

Salzer, U., H. Ahorn, et R. Prohaska. 1993. « Identification of the Phosphorylation Site on Human Erythrocyte Band 7 Integral Membrane Protein: Implications for a Monotopic Protein Structure ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1151 (2): 149-52. https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90098-k.

Salzer, U., et R. Prohaska. 2001. « Stomatin, Flotillin-1, and Flotillin-2 Are Major Integral Proteins of Erythrocyte Lipid Rafts ». *Blood* 97 (4): 1141-43. https://doi.org/10.1182/blood.v97.4.1141.

Salzer, Ulrich, Rong Zhu, Marleen Luten, Hirotaka Isobe, Vassili Pastushenko, Thomas Perkmann, Peter Hinterdorfer, et Giel J.C.G.M. Bosman. 2008. « Vesicles Generated during Storage of Red Cells Are Rich in the Lipid Raft Marker Stomatin ». *Transfusion* 48 (3): 451-62. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01549.x.

Sandilos, Joanna K., Yu-Hsin Chiu, Faraaz B. Chekeni, Allison J. Armstrong, Scott F. Walk, Kodi S. Ravichandran, et Douglas A. Bayliss. 2012. « Pannexin 1, an ATP Release Channel, Is Activated by Caspase Cleavage of Its Pore-Associated C-Terminal Autoinhibitory Region*♦ ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11303-11. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323378.

Saotome, Kei, Swetha E. Murthy, Jennifer M. Kefauver, Tess Whitwam, Ardem Patapoutian, et Andrew B. Ward. 2018. « Structure of the Mechanically Activated Ion Channel Piezo1 ». *Nature* 554 (7693): 481-86. https://doi.org/10.1038/nature25453.

Schlief, Thomas, Roland Schönherr, Keiji Imoto, et S. H. Heinemann. 1996. « Pore Properties of Rat Brain II Sodium Channels Mutated in the Selectivity Filter Domain ». *European Biophysics Journal* 25 (2): 75-91. https://doi.org/10.1007/s002490050020.

Schorge, Stephanie, et David Colquhoun. 2003. « Studies of NMDA Receptor Function and Stoichiometry with Truncated and Tandem Subunits ». *The Journal of Neuroscience* 23 (4): 1151-58. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-04-01151.2003.

Schroeder, Friedhelm, Andrey A. Frolov, Eric J. Murphy, Barbara P. Atshaves, John R. Jefferson, Lixia Pu, W. Gibson Wood, William B. Foxworth, et Ann B. Kier. 1996. « Recent Advances in Membrane Cholesterol Domain Dynamics and Intracellular Cholesterol Trafficking ».

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 213 (2): 150-77. https://doi.org/10.3181/00379727-213-44047.

Sikora, Jacek, Sergei N. Orlov, Kishio Furuya, et Ryszard Grygorczyk. 2014. « Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes ». *Blood* 124 (13): 2150-57. https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-572024.

Sine, Steven M., et Andrew G. Engel. 2006. « Recent Advances in Cys-Loop Receptor Structure and Function ». *Nature* 440 (7083): 448-55. https://doi.org/10.1038/nature04708.

Singer, S. J., et G. L. Nicolson. 1972. « The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes ». *Science (New York, N.Y.)* 175 (4023): 720-31. https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720.

Snyers, L., E. Umlauf, et R. Prohaska. 1999. « Cysteine 29 Is the Major Palmitoylation Site on Stomatin ». *FEBS Letters* 449 (2-3): 101-4. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00417-2.

Stevens-Hernandez, Christian J., Joanna F. Flatt, Sabine Kupzig, et Lesley J. Bruce. 2022. « Reticulocyte Maturation and Variant Red Blood Cells ». *Frontiers in Physiology* 13. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.834463.

Suchyna, Thomas M. 2017. « Piezo channels and GsMTx4: Two milestones in our understanding of excitatory mechanosensitive channels and their role in pathology ». *Progress in biophysics and molecular biology* 130 (Pt B): 244-53. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.011.

Svetina, Saša, Tjaša Švelc Kebe, et Bojan Božič. 2019. « A Model of Piezo1-Based Regulation of Red Blood Cell Volume ». *Biophysical Journal* 116 (1): 151-64. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.3130.

Syeda, Ruhma, Jie Xu, Adrienne E Dubin, Bertrand Coste, Jayanti Mathur, Truc Huynh, Jason Matzen, et al. 2015. « Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1 ». Édité par Jeremy Nathans. *eLife* 4 (mai): e07369. https://doi.org/10.7554/eLife.07369.

Tanner, M. J. A., L Bruce, P. G. Martin, D. M. Rearden, et G. L. Jones. 1991. « MELANESIAN HEREDITARY OVALOCYTES HAVE A DELETION IN RED CELL BAND 3 ». *Blood* 78 (10): 2785-86. https://doi.org/10.1182/blood.V78.10.2785.2785.

Tse, William T., et Samuel E. Lux. 1999. « Red Blood Cell Membrane Disorders ». *British Journal of Haematology* 104 (1): 2-13. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1999.01130.x.

Vaisey, George, Priyam Banerjee, Alison J. North, Christoph A. Haselwandter, et Roderick Mackinnon. 2022. « Piezo1 as a Force-through-Membrane Sensor in Red Blood Cells ». bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2022.08.10.503510.

Venkatachalam, Kartik, et Craig Montell. 2007. « TRP Channels ». *Annual review of biochemistry* 76: 387-417. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.

Verkleij, A. J, R. F. A Zwaal, B Roelofsen, P Comfurius, D Kastelijn, et L. L. M van Deenen. 1973. « The Asymmetric Distribution of Phospholipids in the Human Red Cell Membrane. A Combined Study Using Phospholipases and Freeze-Etch Electron Microscopy ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 323 (2): 178-93. https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90143-0.

Vignes, Stéphane, Sophie Kaltenbach, Loïc Garçon, Lionel Arrivé, Vahid Asnafi, Corinne Guitton, Jérôme Bouligand, Audrey Delarue, et Véronique Picard. 2022. « PIEZO1-gene gain-of-function mutations with lower limb lymphedema onset in an adult: Clinical, scintigraphic, and noncontrast magnetic resonance lymphography findings - PubMed ». 2022. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34477311/.

Voets, Thomas, Droogmans, et Wissenbach. 2004. « The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels | Nature ». 2004. https://www.nature.com/articles/nature02732.

Wang, Junjie, Cinzia Ambrosi, Feng Qiu, David G. Jackson, Gina Sosinsky, et Gerhard Dahl. 2014. « The membrane protein Pannexin1 forms two open channel conformations depending on the mode of activation ». *Science signaling* 7 (335): ra69. https://doi.org/10.1126/scisignal.2005431.

Wang, Junjie, David George Jackson, et Gerhard Dahl. 2018. « Cationic control of Panx1 channel function ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 315 (3): C279-89. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00303.2017.

Wetzel, Christiane, Jing Hu, Dieter Riethmacher, Anne Benckendorff, Lena Harder, Andreas Eilers, Rabih Moshourab, et al. 2007. « A Stomatin-Domain Protein Essential for Touch Sensation in the Mouse ». *Nature* 445 (7124): 206-9. https://doi.org/10.1038/nature05394.

Wetzel, Christiane, Simone Pifferi, Cristina Picci, Caglar Gök, Diana Hoffmann, Kiran K. Bali, André Lampe, et al. 2017. « Small-Molecule Inhibition of STOML3 Oligomerization Reverses Pathological Mechanical Hypersensitivity ». *Nature Neuroscience* 20 (2): 209-18. https://doi.org/10.1038/nn.4454.

Wilkinson, D. Katie, E. Jane Turner, Edward T. Parkin, Ashley E. Garner, Penny J. Harrison, Mark Crawford, Gordon W. Stewart, et Nigel M. Hooper. 2008. « Membrane Raft Actin Deficiency and Altered Ca2+-Induced Vesiculation in Stomatin-Deficient Overhydrated Hereditary Stomatocytosis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (1): 125-32. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.016.

Wong, Piu, Shilpa M. Hattangadi, Albert W. Cheng, Garrett M. Frampton, Richard A. Young, et Harvey F. Lodish. 2011. « Gene induction and repression during terminal erythropoiesis are mediated by distinct epigenetic changes ». *Blood* 118 (16): e128-38. https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-341404.

Xia, X.-M., B. Fakler, A. Rivard, G. Wayman, T. Johnson-Pais, J. E. Keen, T. Ishii, et al. 1998. « Mechanism of Calcium Gating in Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels ». *Nature* 395 (6701): 503-7. https://doi.org/10.1038/26758.

Yan, Qiuyan, Yanting Lu, Lulu Zhou, Junling Chen, Haijiao Xu, Mingjun Cai, Yan Shi, et al. 2018. « Mechanistic Insights into GLUT1 Activation and Clustering Revealed by Super-Resolution Imaging ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (27): 7033-38. https://doi.org/10.1073/pnas.1803859115.

Yang, Kai, Zhupeng Xiao, Xueai He, Ruotong Weng, Xinyue Zhao, et Taolei Sun. 2022. « Mechanisms of Pannexin 1 (PANX1) Channel Mechanosensitivity and Its Pathological Roles ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (3): 1523. https://doi.org/10.3390/ijms23031523.

Zarychanski, Ryan, Vincent P. Schulz, Brett L. Houston, Yelena Maksimova, Donald S. Houston, Brian Smith, Jesse Rinehart, et Patrick G. Gallagher. 2012. « Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis ». *Blood* 120 (9): 1908-15. https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-422253.

Zhan, Haiying, Craig S. Moore, Bojun Chen, Xin Zhou, Xin-Ming Ma, Kumiko Ijichi, Michael V. L. Bennett, Xue-Jun Li, Stephen J. Crocker, et Zhao-Wen Wang. 2012. « Stomatin Inhibits Pannexin-1-Mediated Whole-Cell Currents by Interacting with Its Carboxyl Terminal ». *PloS One* 7 (6): e39489. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039489.

Zhu, Y., C. Paszty, T. Turetsky, S. Tsai, F. A. Kuypers, G. Lee, P. Cooper, et al. 1999. « Stomatocytosis Is Absent in "Stomatin"-Deficient Murine Red Blood Cells ». *Blood* 93 (7): 2404-10.

Zidovetzki, Raphael, et Irena Levitan. 2007. « Use of Cyclodextrins to Manipulate Plasma Membrane Cholesterol Content: Evidence, Misconceptions and Control Strategies ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1768 (6): 1311-24. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.026.

Zivot, Andrea, Jeffrey M. Lipton, Anupama Narla, et Lionel Blanc. 2018. « Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017 ». *Molecular Medicine* 24 (1): 11. https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z.