



HAL
open science

Étude du rôle des canaux Na^+ dépendants du potentiel dans la vasomotricité des artères de résistance

Joohee Park

► **To cite this version:**

Joohee Park. Étude du rôle des canaux Na^+ dépendants du potentiel dans la vasomotricité des artères de résistance. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2022. Français. NNT : 2022ANGE0078 . tel-04170249

HAL Id: tel-04170249

<https://theses.hal.science/tel-04170249v1>

Submitted on 25 Jul 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale »

Par

« Joohee PARK »

« Étude du rôle des canaux Na⁺ dépendants du potentiel dans la vasomotricité des artères de résistance »

Thèse présentée et soutenue à « Angers », le « 9 décembre 2022 »

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

Thèse N° : 190329

Rapporteurs avant soutenance :

Jean-François Quignard
Sébastien Roger

PU – Université de Bordeaux
MCU – Université de Tours

Composition du Jury :

Président : Marie Briet
Examineurs : Nathalie Guérineau
Anne Virsolvy
Dir. de thèse : Christian Legros

PUPH – UMR CNRS 6015, INSERM U1083 (Angers)
DR1 – Institut de Génomique Fonctionnelle (Montpellier)
CRCN – INSERM U1046, CNRS 9214 (Montpellier)
PU – UMR CNRS 6015, INSERM U1083 (Angers)

Invité(s)

Céline Marionneau

CR1 – INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291 (Nantes)

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



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

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

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



Title: Study of the role of voltage-gated Na⁺ channels in vascular tone of resistance arteries.

Keywords: Voltage-gated Na⁺ channels, vascular tone, mesenteric arteries, veratridine, Na⁺/Ca²⁺ exchangers (NCX)

Abstract: Voltage-gated Na⁺ (Na_v) channels are expressed in arteries. However, their physiological role in vascular tone needs to be elucidated. Their activation induces distinct effects on resistance arteries: a vasoconstriction of rat mesenteric arteries (MA) and a vasodilation of mouse cremaster arteries. Thus, this thesis aimed to clarify the role of Na_v channels in mesenteric arterial vascular tone by using selective toxins: tetrodotoxin (TTX), a blocker and veratridine (VTD), an activator of Na_v channels.

First, we characterized the Na_v channel expression in intima and media of aorta and different MA branches from mice: first-order MA (FOMA) and cecocolic arteries (CA). These arteries mainly expressed *Scn2a* encoding the isoform Na_v1.2. By myography, TTX induced a total relaxation of FOMA and CA, indicating that Na_v channels participate to regulate the arterial contractility. Using arteriography, we showed that TTX potentiated the flow-mediated dilation of FOMA and CA, revealing the putative implication of Na_v channel in the response induced by shear-stress. The expression levels of *Scn2a* were significantly reduced in the aorta from angiotensin II-induced hypertensive mice and old mice. To conclude, this first study proposes that Na_v channels could be considered as an actor in vascular tone regulation and in mechanotransduction. Moreover, the modulation of *Scn2a* expression in aorta from hypertensive and aging models suggests that Na_v channels could be involved in vascular physiopathological mechanisms.

The second study aimed to characterize the effects of Na_v channel activation by VTD on isolated FOMA and CA. In fact, myography experiments showed that VTD induced vasoconstriction in FOMA and vasorelaxation in CA. Prazosin, an α1-adrenoceptor antagonist suppressed VTD-induced contraction of FOMA, indicating that VTD stimulates noradrenaline release by sympathetic nerves. The vasorelaxation of CA induced by VTD was resistant to prazosin, but abolished by atropine, a muscarinic receptor antagonist. Consequently, VTD triggered acetylcholine (ACh) release by parasympathetic nerve endings. These relaxation responses of CA were dependent on the NO pathway. In addition, VTD-induced vasorelaxant effects were strongly reduced by Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) antagonists, KB-R7943 and SEA0400. This is in agreement with the expression of NCX1 in endothelium of CA. Then, we investigated the involvement of NCX1 in NO production by using mouse endothelial cell line. Intracellular Ca²⁺ elevation induced by ACh was significantly reduced by NCX antagonists and also by protein kinase C inhibition. To conclude the second study, VTD conversely modifies the contractility of FOMA and CA, by acting on their different vasomotor innervation. We hypothesize that FOMA present a sympathetic vasomotor innervation, while CA have a predominant parasympathetic vasomotor innervation. Moreover, endothelial NCX1 could be considered as an important element in intracellular Ca²⁺ elevation which leads to NO production, and PKC could activate NCX1.

Liste de publications et communications scientifiques

Publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

- 1) ***New insights into the role of voltage-gated Na⁺ channels in arteries: contribution to vascular tone and transcriptional remodeling in physiopathological models.*** Joohee Park, Coralyne Proux, William Ehanno, Emilie Vessières, Julie Favre, Gilles Kauffenstein, Hélène Tricoire-Leignel, César Mattei, Daniel Henrion, Claire Legendre, Christian Legros.
Refusé dans le journal « *Vascular pharmacology* », puis en préparation pour une soumission prochaine dans le journal « *Molecules* »
- 2) ***Veratridine induces acetylcholine release and subsequent vasorelaxation of cecocolic artery through NCX1 activation in the mouse endothelium.*** Joohee Park, Léa Réthoré, Coralyne Proux, Linda Grimaud, Emilie Vessières, Jennifer Bourreau, César Mattei, Hélène Tricoire-Leignel, Daniel Henrion, Céline Marionneau, Claire Legendre, Christian Legros.
À remettre après une révision majeure dans le journal « *IJMS* »

Présentation du projet de thèse aux colloques scientifiques :

sous forme de poster

- 1) Journée SFR ICAT en 2017, 2018 et 2019 – Angers (49)
- 2) Congrès international « Canaux ioniques » en 2018 et 2019 – Sète (34)
- 3) Congrès international « Printemps de la cardiologie » en 2019 – Lille (59)
L'acte de colloques publié dans « *Archives of Cardiovascular Diseases* ». ***Activation of voltage-gated sodium channel triggers vasorelaxation of mice mesenteric arteries.*** Joohee Park, Claire Legendre, Coralyne Proux, Emilie Vessières, Daniel Henrion, Christian Legros. April 2019 *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements* 11(2):196

en communication orale

- 1) Journée MitoVasc en 2017 et 2019 – Angers (49)
- 2) Congrès international « Société Française pour l'Étude des Toxines (SFET) » en 2019 – Paris (75)
- 3) e-Congrès international « Printemps de la cardiologie » en 2020
L'acte de colloques publié dans « *Archives of Cardiovascular Diseases* ». ***Activation of voltage-gated Na⁺ channels induces vasorelaxation of murine mesenteric arteries, unmasking a cross-talk between Na_v channels, NCX exchangers and eNO-synthase.*** Joohee Park, Claire Legendre, Coralyne Proux, Daniel Henrion, Christian Legros. October 2020, *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements* 12(2-4):266

Autres publications scientifiques :

- 1) ***Partial Agonist Activity of Neonicotinoids on Rat Nicotinic Receptors: Consequences over Epinephrine Secretion and In Vivo Blood Pressure.*** Park, J., Taly, A., Bourreau, J., De Nardi, F., Legendre, C., Henrion, D., Guérineau, N.C., Legros, C., Mattei, C., Tricoire-Leignel, H., 2021. *Int J Mol Sci* 22, 5106. <https://doi.org/10.3390/ijms22105106>
- 2) ***Pharmacological Dissection of the Crosstalk between Na_v and Ca_v Channels in GH3b6 Cells.*** Réthoré, L., Park, J., Montnach, J., Nicolas, S., Khoury, J., Le Seac'h, E., Mabrouk, K., De Pomyers, H., Tricoire-Leignel, H., Mattei, C., Henrion, D., Fajloun, Z., De Waard, M., Legendre, C., Legros, C., 2022. *Int J Mol Sci* 23, 827. <https://doi.org/10.3390/ijms23020827>

Vulgarisation scientifique au grand public au cours de la thèse :

- 1) Participation à la Fête de la Science en 2017, 2018 et 2020
- 2) Participation à la Nuit des Chercheurs en 2019

Remerciements

Avant tout, je voudrais remercier Monsieur Jean-François QUIGNARD et Monsieur Sébastien ROGER pour avoir accepté de prendre part au jury et de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier Madame Nathalie GUÉRINEAU et Madame Anne VIRSOLVY pour avoir accepté de participer au jury en tant qu'examineurs. Je souhaite remercier Madame Marie BRIET d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie également Madame Céline MARIONNEAU d'avoir accepté de participer au jury en tant que membre invité et pour les échanges et les conseils scientifiques durant ma thèse. Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement tous les membres du jury pour leur patience et compréhension.

Je remercie également la région Pays de la Loire pour le financement du projet « SODIVASC » et de cette thèse.

Je tiens à remercier Dr Daniel HENRION, directeur du laboratoire, pour son accueil au sein du laboratoire MitoVasc depuis le Master 1. Je vous remercie également pour les échanges scientifiques que nous avons pu partager et pour tous vos conseils et l'apport du nouveau regard scientifique durant ma thèse.

Je souhaite adresser mes grands remerciements à Pr Christian LEGROS, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie dans son équipe « Ion channels & Vascular function » et de m'avoir donné l'opportunité de débiter cette thèse. Je te remercie pour ta grande confiance en moi et pour tous tes soutiens durant toutes ces années, aussi bien dans les moments hauts que les moments bas. Grâce à tout ça, j'ai pu acquérir l'autonomie dans mon travail. Sans toi, je n'aurais jamais pu aboutir cette thèse. Tous les échanges scientifiques (et aussi esthétiques) que nous avons partagés durant de nombreuses réunions étaient un réel plaisir pour moi. Sans ton exigence et ta rigueur, je n'aurais pas pu développer cet esprit scientifique et cette façon de travailler. Avec toi, le produit final était toujours de haute qualité. Enfin, je te remercie également de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner à l'IUT, qui m'a permis de vivre une nouvelle expérience et d'acquérir d'autres compétences.

Je voudrais également remercier César MATTEI, qui m'a permis de faire le premier pas dans ce laboratoire *via* le stage du Master 1, Hélène TRICOIRE-LEIGNEIL, qui m'a permis d'acquérir des connaissances et des techniques considérables dans les techniques de biologie moléculaire (RT-qPCR absolue en particulier) et Claire LEGENDRE, qui a toujours apporté des éléments de réponses à mes questions et avec qui j'ai partagé de nombreuses heures de route incommensurables en direction méditerranée. Je présente mes sincères remerciements à vous trois pour tous vos conseils et formations scientifiques bien évidemment, mais aussi pour votre soutien moral qui m'a beaucoup touchée et m'a aidée à surmonter durant la thèse.

Carole, notre gestionnaire unique, je te remercie pour ta disponibilité et ta gentillesse. Avec toutes les fiches de commandes, les ordres de mission et les devis, et avec tous mes « Carole, je peux te déranger ? », tu as toujours été très professionnelle et bienveillante. Merci encore.

Aux Superbes Mamans

Agnès, ma collègue « goinfre », à tes soutiens très sucrés et nos échanges qui ont toujours apporté de la bonne humeur. Anne-Laure, notre référente d'hygiène et sécu et ma voisine de bureau, à nos nombreux échanges au bureau touchant plusieurs domaines (problème d'ordi, manipulation des logiciels, les photos de travaux...). Émilie, notre reine de CARFI, à toutes ces heures passées entre les gaz, les solutions, le pH et le fou rire sans oublier. Jennifer, à nos heures passées ensemble auprès de nos rats et souris bien-aimés à les chérir et à leur faire du mal (juste un tout petit peu). Linda, ma chère collègue de TP, à nos nombreux brainstormings pour concrétiser et réaliser ce TP à l'IUT. Sophie, à ces nombreuses soirées où tu viens nous dire « à demain » mais qui se prolonge « éternellement » avec tes sacs sur le dos et les épaules.

Enfin, je vous remercie pour votre bonne humeur tous les matins et le bonjour avec un grand sourire. Cela m'a toujours fait plaisir de vous croiser en arrivant au labo. Je remercie également pour toutes les histoires de vos enfants. J'ai toujours aimé écouter vos petites anecdotes bien mignonnes et adorables. Bien évidemment, je vous remercie à vous toutes pour vos conseils et formations professionnelles à haut niveau dans de nombreuses domaines. Sans vous, je n'aurais pas eu la bonne réponse à toutes ces questions techniques et scientifiques et n'aurais jamais appris autant de choses. Je ne parle pas de votre douceur et gentillesse que tout le monde connaît.

À la team « Jeunes du labo »

Alexis, Aglaé, Carlotta, Léa, Louis, Lucie et Manu, je n'oublierai jamais tous ces bons moments passés : les délicieux repas qui changeaient de mes gamelles, les énigmes dont la moitié je ne comprenais pas la question, les mercredis midi qui ont toujours été très intéressants, les sorties et les soirées Jeux (je participerai davantage prochainement !), tous les potins échangés, les missions secrètes ... (trop de choses !)

Je vous remercie d'avoir autant animé mes années de thèse. Je vous remercie également pour votre soutien moral qui a toujours été accompagné de rire. Je n'oublie pas non plus les nombreux échanges scientifiques en direct autour de nos résultats dans les salles de manip.

Valentine, un grand merci pour tout ce qu'on a échangé au bureau. Je ne préciserai pas ce que c'est mais ça a toujours été très intéressant :)

À mes chères copines

Coralyne et Pauline, mes chères bien-aimées, comment pourrais-je citer tous ces précieux moments passés ensemble. Les jours et soirs interminables au labo, les discussions, les rires, les sorties, le covoiturage... Pauline, merci beaucoup pour l'ambiance musicale. Avec toi, j'ai toujours pu avoir un fond musical soit rediffusé, soit en live. Coralyne, merci beaucoup pour toute la relecture. Grâce à toi, tous ces mots et phrases incomptables qui sont passés sous tes yeux ressemblaient beaucoup plus au français.

Je vous remercie également pour vos soutiens et votre aide que vous m'avez apportés. Grâce à vous, mes quotidiens au labo étaient remplis de joie et de bonheur. Sans oublier, un grand merci pour vos efforts de remise à niveau en culture française même s'il y a encore du boulot.

Je remercie également tous les autres membres du laboratoire, Marie CHABBERT, Laurent LOUFRANI, Céline FASSOT, Mathilde MUNIER, Flavien BESSAGUET, Sylvain RECOQUILLON, Bertrand TOUTAIN, Clément TETAUD, Cyril LE CORRE et Alicia BAPTISTAVICENTE pour leurs conseils et leur présence.

À tous les étudiants et les anciens thésards qui sont devenus maintenant docteurs, je remercie tout particulièrement pour les rires et les compassions que nous avons partagés, même si nos résultats de manip parfois nous déprimaient :)

À mon entourage familial et personnel qui m'est très cher

Mes chers amis d'équipe Vélo, Ski et Chasse aux champignons. De nombreuses activités, sorties et voyages dépaysants avec vous, m'ont permis de rafraîchir mon esprit et d'enrichir ma vie. Grâce à vous, j'ai pu vivre autres choses que le travail, toujours accompagnées de joie et de bonne humeur.

Un grand merci à la famille Nguyen pour vos soutiens et tous les repas dominicaux.

JP, mon chéri, aucun mot pourrait décrire tout ce que tu m'a donné. Je remercie tout simplement de ton existence et de ta présence.

Ma famille d'accueil, 이모부, 이모, Léa et Seong-Joon, sans vous, je n'aurais jamais pu avoir cette vie en France. Je vous remercie pour toutes ces années à Laval, pour votre accueil très chaleureux et votre bienveillance.

Ma famille, 아빠 엄마, 당신들 없이 어떻게 제가 존재하고 어떻게 여기까지 올 수 있었을까요. 항상 고맙고 항상 미안한 나의 부모님. 당신 존재 자체가 저에게는 큰 힘입니다. 살아계셔서 주셔서 고맙습니다. 사랑해요. 그리고 유일하고 하나뿐인 나의 언니. 부모님께서 내게 주신 세상 가장 크고 가장 귀한 선물, 나의 반쪽. 언니가 내 언니라서 참 다행이야. 항상 이렇게 곁에 있어줘. 사랑해.

Sommaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS	1
TABLE DES TABLEAUX	2
ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION	6
1. Physiologie des artères de résistance	7
1.1. Présentation générale des artères	7
1.2. Description des cellules vasculaires	8
1.3. Description des propriétés intrinsèques des artères de résistance	9
1.4. Le remodelage artérielle sous-jacent à l'hypertension artérielle	19
2. Les canaux ioniques membranaires régulant le tonus vasculaire	22
2.1. Les canaux Ca ²⁺ dépendants du potentiel des cellules vasculaires	23
2.2. Les canaux cationiques non-sélectifs (TRP et Piezo) des cellules vasculaires	25
2.3. Les canaux K ⁺ des cellules vasculaires	27
2.4. Le canal Cl ⁻ et les transporteurs ioniques des cellules vasculaires.....	32
3. Les canaux Na_v dans la fonction vasculaire	35
3.1. Les généralités des canaux Na _v	35
3.2. Les canaux Na _v du tissu vasculaire	46
OBJECTIFS	54
MATÉRIELS ET MÉTHODES	56
1. Modèle animal	57
1.1. Modèle d'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II.....	57
1.2. Sacrifice et prélèvement	58
2. Isolement des cellules endothéliales et musculaires lisses	59
3. Etude moléculaire par RT-qPCR avec une méthode de quantification absolue	60
4. Immunohistochimie	61
4.1. Western blot	61
4.2. Immunomarquage	62
5. Étude de la réactivité vasculaire des artères	62
5.1. Myographie	62
5.2. Artériographie	64
6. Dosage du Ca²⁺ intracellulaire par le Fura-2-AM	65
7. Analyses statistiques	67
RÉSULTATS	68
1. Étude n°1 : Contribution des canaux Na_v dans le tonus vasculaire et leur remodelage transcriptionnel dans les modèles physiopathologiques	69
1.1. Article n°1	70
1.2. Résultats supplémentaires.....	90
2. Étude n°2 : Effets de la vératridine induisant la libération d'acétylcholine entraînant la vasorelaxation des artères cécoliques	93
2.1. Article n°2	94
2.2. Résultats supplémentaires.....	122
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	125
BIBLIOGRAPHIE	129
ANNEXE	150

Table des illustrations

Figure 1 : Structure de la paroi artérielle.....	7
Figure 2 : Les voies de vasodilatation dépendantes de l'endothélium.....	10
Figure 3 : Synthèse enzymatique de la PGI ₂ et du TXA ₂	12
Figure 4 : Les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium.....	13
Figure 5 : Le tonus myogénique généré par la pression et l'étirement pariétal.....	15
Figure 6 : Régulation de la vasomotricité par le système nerveux.....	16
Figure 7 : Les différents types de remodelage artériel dans les conditions physiologiques et pathologiques cardiovasculaires.....	21
Figure 8 : Les canaux ioniques membranaires régulant la vasomotricité.....	22
Figure 9 : Implication des canaux Ca _v dans la régulation de la vasomotricité.....	23
Figure 10 : Régulation de la vasomotricité par les canaux TRP et Piezo1.....	25
Figure 11 : Contribution des canaux K ⁺ dans la vasorelaxation.....	28
Figure 12 : Présentation du potentiel d'action.....	36
Figure 13 : Structure du canal Na _v	38
Figure 14 : Structures chimiques des molécules ciblant les canaux Na _v	38
Figure 15 : Sites de fixation des toxines sur le canal Na _v	41
Figure 16 : Les canaux Na _v endothéliaux comme acteurs de signalisation.....	48
Figure 17 : Les canaux Na _v du myocyte artériel, des acteurs du couplage excitation-contraction.....	53
Figure 18 : Dispositif de photopléthysmographie adapté pour les souris.....	58
Figure 19 : Présentation des artères mésentériques de souris et ses branches.....	59
Figure 20 : Dispositif pour l'étude par myographie des petites artères et le protocole expérimental.....	63
Figure 21 : Représentation schématique simplifiée de la configuration expérimentale pour l'artériographie.....	65
Figure 22 : Expression des canaux Na _v dans les artères fémorales de souris.....	90
Figure 23 : Évolution de l'expression des canaux Na _v dans les aortes, les artères mésentériques et fémorales chez les souris hypertendues.....	92
Figure 24 : Effets vasorelaxants de la VTD sur les artères cécoliques.....	122
Figure 25 : L'activation des canaux Na _v n'induit pas de réponse Ca ²⁺ dans les cellules MS1.....	123
Figure 26 : Rôle des canaux Na _v dans la régulation de la vasomotricité des MA.....	128

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification des différents grades d'HTA	19
Tableau 2 : Distribution tissulaire des canaux Na_v et leur sensibilité à la TTX.....	46
Tableau 3 : Les canaux Na_v endothéliaux	47
Tableau 4 : Les canaux Na_v des myocytes des veines.....	50
Tableau 5 : Les canaux Na_v des myocytes des artères de conductance	51
Tableau 6 : Les canaux Na_v dans le myocyte des artères de résistance.....	52
Tableau 7 : Liste des vecteurs plasmidiques utilisés pour la RT-qPCR absolue.....	60
Tableau 8 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour la RT-qPCR absolue	61
Tableau 9 : Composition des tampons utilisés pour le dosage du Ca^{2+} intracellulaire	66

Abréviations

AC : adénylate cyclase

Ach : acétylcholine

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AngII : angiotensine II

AP : atropine

ATP : adénosine triphosphate

BTX : batrachotoxine

[Ca²⁺]_i : concentration du Ca²⁺ intracellulaire

CA : artères céecocoliques

Cl_{ca} : (canal) Cl⁻ activé par le Ca²⁺

Ca_v : (canal) Ca²⁺ dépendant du potentiel

CE : cellules endothéliales

CGRP : peptide relié au gène de la calcitonine

CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires

DAG : diacylglycérol

DFD : dilatation dépendante du flux

DRG : ganglion de la racine dorsale de la moëlle épinière

ELAM-1 : molécule d'adhésion des leucocytes endothéliales 1

EDHF : facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium

eNOS : monoxyde d'azote synthase endothéliale

ET-1 : endothéline-1

FAD : flavine adénine dinucléotide

FMN : flavine mononucléotide

FOMA : artères mésentériques de 1^{er} ordre

GABA : acide γ-aminobutyrique

GC : guanylate cyclase

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GTP : guanosine triphosphate

HIF : facteur de transcription induit par l'hypoxie

HTA : hypertension artérielle

HUVEC : cellule endothéliale de veine ombilicale humaine

HSVEC : cellules endothéliales de veine saphène humaine

IC₅₀ : concentration inhibant 50% de l'effet maximal

ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire 1

IP₃ : inositol triphosphate

IP₃R : récepteur à l'IP₃

K_{ATP} : (canal) K⁺ sensible à l'ATP

K_{Ca} : (canal) K^+ activé par le Ca^{2+}
 K_{IR} : (canal) K^+ à rectification entrante
 K_v : (canal) K^+ dépendant du potentiel
L-NAME : N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester
MA : artère mésentérique
MLC : chaînes légères de la myosine
MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine
MLCP : phosphatase des chaînes légères de la myosine
MS1 : « *Mile Sven1* »
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 Na_v : (canal) Na^+ dépendant du potentiel
NCX : échangeur de Na^+/Ca^{2+}
NO : monoxyde d'azote
NT : neurotransmetteur
PA : pression artérielle
PAS : pression artérielle systolique
PAD : pression artérielle diastolique
PbTX : brévétoxine
PECAM1 : molécule d'adhésion cellulaire plaquettes-cellules endothéliales 1
PGI₂ : prostacycline
Phe : phényléphrine
PKG : protéine kinase G
PoA : potentiel d'action
PZ : prazosine
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
RyR : récepteurs de la ryanodine
SHR : rat hypertendu spontanément
SOC : « store-operated Ca^{2+} channel »
SOCE : « store-operated Ca^{2+} entry »
SR : réticulum sarcoplasmique
STIM1 : molécule d'interaction stromale 1
SU α : sous-unité alpha
SU β : sous-unité bêta
SUR : suramine
TM : tonus myogénique
TN : terminaison nerveuse
TRP : « transient receptor potential »
TRPC : canal « transient receptor potential canonical »
TRPM : canal « transient receptor potential melastatin »
TRPV : canal « transient receptor potential vanilloid »

TTX : tétrodotoxine

TTX-R : résistant à la tétrodotoxine

TTX-S : sensible à la tétrodotoxine

TXA₂ : thromboxane A₂

VCAM-1 : molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1

VE-Cadhérine : cadhérine endothéliale vasculaire

VEGF : facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires

VEGFR : récepteur aux facteurs de croissance des cellules endothéliales vasculaires

VTD : vératridine

INTRODUCTION

1. Physiologie des artères de résistance

1.1. Présentation générale des artères

Aujourd'hui, les artères sont considérées comme un véritable organe actif à part entière en tant qu'acteur majeur de l'homéostasie. Cet appareil permet le transport du sang du cœur vers les organes périphériques afin d'apporter les éléments essentiels pour leur bon fonctionnement. Selon leur structure et leur fonction, les artères présentent deux types, à savoir les artères de conductance et les artères de résistance.

Les artères de conductance, également appelées artères de « gros calibre », se trouvent principalement proches du cœur comme l'aorte, les carotides et les artères pulmonaires. Elles ont pour rôle d'amortir la pulsativité du cœur et d'assurer un flux sanguin continu grâce à l'élasticité de leurs parois se comportant comme un réservoir par une dilatation passive lors de la systole ventriculaire. **Les artères de résistance**, appelées artères de « petit calibre », correspondent à une notion définie par Mulvany et Aalkjaer en 1990 pour des artères ayant un diamètre interne inférieur à 500 μm (Mulvany and Aalkjaer, 1990). Elles se trouvent à proximité des organes périphériques comme les artères mésentériques (MA), les artères coronaires, les artères cérébrales et les artérioles. Contrairement aux artères de conductance, elles ont la capacité de moduler leur diamètre très rapidement en réponse aux variations hémodynamiques telles que le flux et la pression. Ainsi, elles participent activement à la régulation de la résistance périphérique grâce à leur réactivité vasculaire importante.

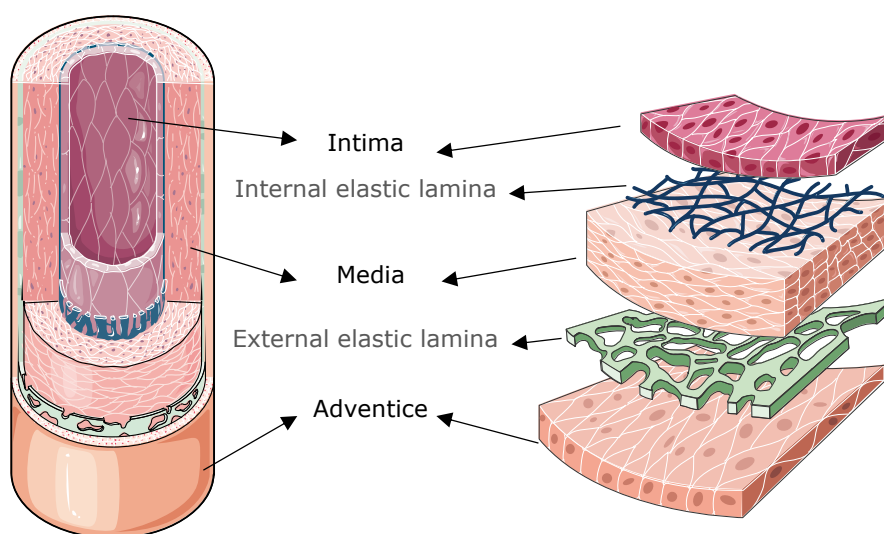


Figure 1 : Structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle se compose de trois tuniques de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima ou endothélium, la média ou couche musculaire lisse et l'adventice, un tissu conjonctif. Chaque tunique est séparée de lame élastique interne et externe.

Les artères de conductance et les artères de résistance partagent une structure générale commune, qui est composée de 3 tuniques organisées de façon concentrique : l'intima, la média et l'adventice (Figure 1). **L'intima**, appelée également l'endothélium, est la couche la plus interne composée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE). Ces cellules ayant une forme plate sont en contact direct avec le sang et les facteurs circulants. Face à diverses molécules circulantes, elles constituent une barrière de communication entre les tissus et le sang.

Elles sont également soumises au flux sanguin capable d'entraîner lui-même des réponses biologiques au niveau des artères. **La média**, séparée de l'intima par une lame élastique interne, est composée principalement de multiples couches circulaires de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Cette tunique contient également les fibres d'élastine et de collagène dont la proportion varie selon le type d'artères. La média des artères de conductance contient beaucoup d'élastine, d'où son élasticité et sa capacité de réservoir. En revanche, les artères de résistance contiennent peu de composants élastiques. Leur tunique moyenne est essentiellement musculaire, ce qui leur permet d'avoir une capacité contractile importante. L'activité de la média est régulée en grande partie par les fibres nerveuses. Les CE, étroitement liées avec les CMLV, peuvent aussi y intervenir *via* la sécrétion des diverses molécules. Enfin, séparée de la média par une lame élastique externe, **l'adventice** est la couche la plus externe des artères. Elle est composée principalement de fibres de collagène, de fibroblastes et de la matrice extracellulaire, assurant la protection et le renforcement des vaisseaux. Les fibres nerveuses sont également présentes à ce niveau afin de réguler le tonus vasculaire. L'adventice peut contenir des *vasa vasorum* dans le but d'assurer l'apport du sang au niveau des parois des artères, en particulier, de « gros calibre ».

1.2. Description des cellules vasculaires

1.2.1. Les cellules endothéliales

Les CE tapissant en monocouche la face interne des artères, présentent généralement une forme plate, fine et longue et sont alignées dans la direction du flux sanguin. Elles sont en contact direct avec le sang et les facteurs circulants. L'endothélium, considéré comme une membrane passive entre le sang et la structure vasculaire, est en fait constitué de cellules actives. En effet, les CE interviennent dans de nombreuses fonctions. En réponse à des facteurs circulants, les CE assurent un contrôle local du tonus vasculaire par la sécrétion des substances vasoactives qui agissent au niveau des CMLV (Furchgott and Zawadzki, 1980; Moncada et al., 1977; Palmer et al., 1988; Sim and Manjeet, 1990; Yanagisawa et al., 1998). Elles établissent alors un équilibre entre la vasoconstriction et la vasorelaxation. L'endothélium est exposé à des forces de cisaillement (ou « shear-stress ») dues à l'écoulement du sang dans l'artère. Les CE stimulées par le flux laminaire synthétisent un gaz appelé monoxyde d'azote (NO), considéré comme un médiateur majeur de la vasodilatation (Xiao et al., 1997). Ce phénomène est appelé la dilatation dépendante du flux (DFD). Les récepteurs mécanosensibles ou mécanosenseurs exprimés à la membrane plasmique des CE sont responsables de ce mécanisme (Douguet et al., 2019; Rode et al., 2017). En outre, les CE régulent l'activité des plaquettes. Dans les conditions physiologiques, les CE sécrètent de façon constitutive le NO et la prostacycline (PGI₂) afin d'inhiber l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (Cines et al., 1998; Moncada et al., 1977; Taylor et al., 2005). Lors d'une lésion vasculaire, les CE sont activées et stimulent l'hémostase et le processus d'angiogenèse (Krüger-Genge et al., 2019; Sturtzel, 2017). Ainsi, les CE ont une place cruciale dans l'homéostasie vasculaire.

1.2.2. Cellules musculaires lisses vasculaires

Les CMLV, contrairement aux CE, sont organisées en plusieurs couches. Localisées dans la média, elles sont au cœur de la capacité contractile des artères. En effet, les CMLV sont riches en fibres actine-myosine et en mitochondries qui sont les éléments essentiels pour la contractilité. La contraction et la relaxation des CMLV

induisent la vasoconstriction et la vasodilatation, respectivement. Ainsi, les CMLV assurent la vasomotricité, cruciale dans la régulation du débit sanguin et la perfusion des organes. Leur contractilité est finement régulée par les CE, qui sont étroitement liées avec les CMLV. En effet, les substances vasoactives produites par les CE, telles que le NO, le PIG₂, l'endothéline-1 et le thromboxane A₂ agissent au niveau des CMLV et conduisent à la phosphorylation ou à la déphosphorylation des chaînes légères de la myosine de type 2 (MLC), par la kinase des MLC (MLCK) ou par la phosphatase des MLC (MLCP). Ceci aboutit à la contraction ou à la relaxation des CMLV. Par ailleurs, la contractilité des CMLV est régulée par les fibres nerveuses sympathiques. Depuis les terminaisons nerveuses sympathiques présentes autour des CMLV, les neurotransmetteurs (NT) tels que la noradrénaline et l'adrénaline peuvent être sécrétés. Ces catécholamines se fixent aux récepteurs α 1-adrénergiques des CMLV puis entraînent la contraction.

Quand les vasoconstricteurs se fixent sur leurs récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) correspondants (ici RCPGq), ils déclenchent une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire ([Ca²⁺]_i), entraînant une augmentation de la complexe Ca²⁺/Calmoduline qui à son tour active la MLCK. L'activation des RCPG_{12/13} stimulent la cascade RhoA/Rho-Kinase, inhibant la MLCP par phosphorylation (Seasholtz et al., 1999; Somlyo and Somlyo, 2000). Ainsi, l'activation de la MLCK et l'inhibition de la MLCP augmentent le degré de phosphorylation des MLC, aboutissant à une vasoconstriction. Au contraire, les vasodilatateurs comme le NO entraînent l'activation de la MLCP et l'inhibition des RhoA par la protéine kinase G (PKG) (Smolenski et al., 2000; Wu et al., 1998), donc la diminution des MLC phosphorylées. À travers des jonctions gap situées au niveau des jonctions myoendothéliales, les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) agissent sur les CMLV et entraînent leur hyperpolarisation, donc une vasorelaxation (Straub et al., 2014). Par ailleurs, les CMLV ont une plasticité phénotypique importante. Dans des conditions pathologiques, elles sont capables de produire de nombreuses molécules comme des cytokines, des facteurs de croissance et des éléments de la matrice extracellulaire. Cette caractéristique leur confère une capacité de migration et de prolifération selon leur environnement et les conditions physiopathologiques.

1.3. Description des propriétés intrinsèques des artères de résistance

Les artères de résistance, se trouvant à proximité des organes périphériques, ont pour mission d'atténuer la pression artérielle (PA) afin d'assurer une bonne perfusion des organes sans les abîmer. La vasomotricité importante de ces artères permet de réguler la résistance périphérique. Les artères de résistance présentent ainsi certaines propriétés fonctionnelles intrinsèques.

1.3.1. Les artères de résistance ont une grande vasomotricité

La vasomotricité se traduit par l'équilibre entre la vasodilatation et la vasoconstriction. La vasodilatation est principalement contrôlée par l'endothélium soit en réponse aux forces de cisaillement, soit en réponse à des substances vasodilatatrices. La vasoconstriction est déclenchée de façon mécanique et/ou pharmacologique. La pression génère des forces pariétales exercées sur la paroi artérielle entraînant directement la contraction des CMLV. Les CE peuvent aussi produire des substances vasoconstrictrices agissant sur les CMLV. Par ailleurs, les fibres nerveuses présentes dans la paroi artérielle libèrent des molécules modulant le tonus vasculaire. Ainsi, les

forces mécaniques et les substances vasoactives libérées participent à la balance entre la relaxation et la contraction des artères.

a) Les voies de vasodilatation dépendantes de l'endothélium

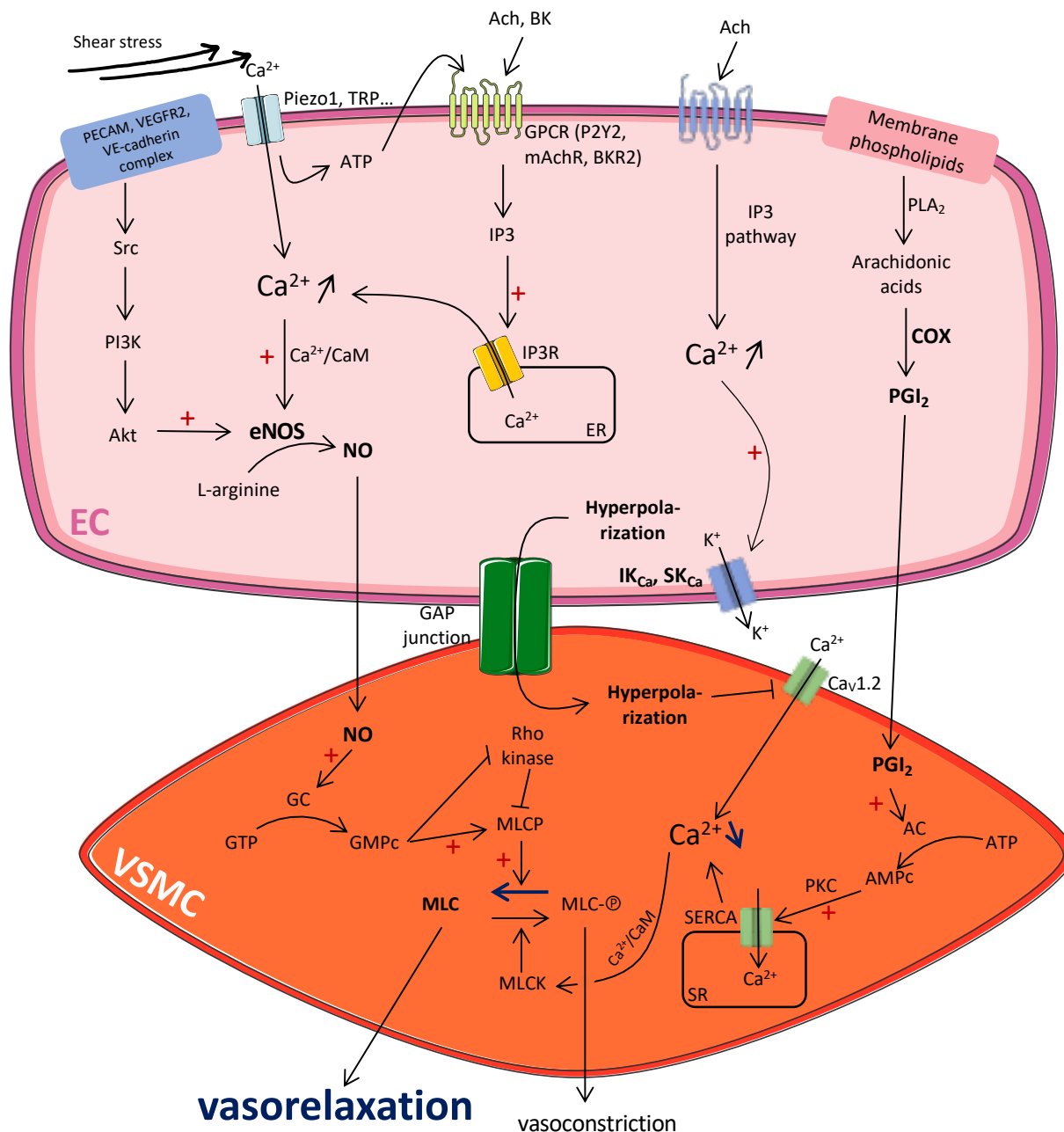


Figure 2 : Les voies de vasodilatation dépendantes de l'endothélium

Le schéma représente les 3 voies de vasodilatation induite par les CE (ou EC) : la voie du NO, la voie de l'EDHF et la voie de la PGI₂ (de gauche à droite). La voie du NO, principalement induite par les forces de cisaillement, provoque la baisse de la [Ca²⁺]_i des CMLV (ou VSMC) et favorise la déphosphorylation des MLC. La voie de l'EDHF et la voie de la PGI₂ entraîne la baisse de la [Ca²⁺]_i des VSMC par l'hyperpolarisation des VSMC et la recapture de Ca²⁺ dans le réticulum sarcoplasmique (SR), réciproquement. L'ensemble des voies aboutissent à

une vasorelaxation. BK : bradykinine ; BKR2 : récepteur à la bradykinine ; mAChR : récepteur muscarinique à l'Ach.

La voie du monoxyde d'azote (voie majeure de la vasodilatation)

Le NO est un gaz capable de diffuser librement au travers de la membrane plasmique. Son action comme vasodilatateur au niveau du système vasculaire a été décrite pour la 1^{ère} fois en 1980 par Furchgott et Zawadzki (Furchgott and Zawadzki, 1980). Comme décrit précédemment, les forces de cisaillement appliquées sur les CE favorisent la production de NO. En effet, le flux stimule des canaux mécanosensibles comme Piezo1 et certains canaux « transient receptor potential » (TRP) (Bavi et al., 2017), qui entraînent une entrée de Ca^{2+} dans les CE et la libération d'ATP. Ce dernier se fixe sur les récepteurs purinergiques P2Y2 des CE, induisant la formation d'IP₃ et la sortie de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique. L'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ conduit à la formation de complexes Ca^{2+} /Calmoduline, qui activent la NO synthase endothéliale (eNOS) par phosphorylation de la Ser1177 (Wang et al., 2016, 2015). La eNOS activée catalyse la transformation de la L-arginine en L-citrulline et NO en présence d'O₂ et des co-facteurs tels que NADPH, FAD, FMN et BH4 (Förstermann and Sessa, 2012). Les forces de cisaillement stimulent également un complexe mécanosensible composé de PECAM1, VE-Cadhérine et VEGFR2, activant la voie de Src/PI3K/AKT qui phosphoryle la eNOS indépendamment du Ca^{2+} (Baratchi et al., 2017; Hurt et al., 2002; Michell et al., 1999). Les forces de cisaillement ne sont pas la seule modalité activatrice de la voie du NO. Les facteurs circulants comme l'acétylcholine (Ach) et la bradykinine se fixent sur leurs propres RCPG et activent la eNOS par l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 2).

Le NO synthétisé diffuse librement jusqu'aux CMLV. Au niveau des CMLV, le NO active la guanylate cyclase (GC) qui transforme la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). La GMPc active, par la suite, la PKG qui entraîne l'activation des MLCP. En outre, la PKG inhibe RhoA, ce qui lève l'inhibition des MLCP. Tout cela contribue donc à la déphosphorylation des MLC et aboutit à la relaxation des CMLV (Smolenski et al., 2000; Wu et al., 1998). La voie du NO est une voie vasorelaxante majeure par rapport aux autres voies décrites ci-après (Sandow Shaun L. et al., 2002).

La voie de la prostacycline

Les CE peut également générer de la PGI₂, qui a une action vasodilatatrice (Fleming et al., 1996). La PGI₂ est synthétisée à partir de l'acide arachidonique grâce aux cyclo-oxygénases (COX). L'acide arachidonique, synthétisé à partir des phospholipides membranaires par la phospholipase A₂, est transformé en prostaglandine G₂ par l'activité cyclo-oxygénase des COX. Ensuite, par l'activité peroxydase de ces enzymes, la prostaglandine G₂ est réduite en prostaglandine H₂. La PGI₂ synthase forme enfin la PGI₂ par l'isomérisation et la réduction de la prostaglandine H₂ (Figure 3). La PGI₂ produite par les CE agit au niveau des CMLV en activant l'adénylate cyclase entraînant la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ce dernier active par la suite la protéine kinase A (PKA) phosphorylant la phospholambane. Ainsi, la PKA lève l'inhibition de la pompe à Ca^{2+} membranaire du réticulum sarcoendoplasmique (SERCA) et entraîne la recapture et la diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ des CMLV (Figure 2).

Parmi les deux COX les plus connues COX-1 et COX-2, la COX-1 est considérée comme une isoforme constitutive. La PGI₂ est donc synthétisée de façon continue par les CE en réponse au flux et impliquée dans le maintien du tonus vasculaire (Moncada et al., 1977). La COX-2, l'isoforme inducible, est exprimée dans un environnement pro-inflammatoire. En effet, il a été montré qu'en réponse à des substances comme la thrombine et l'histamine, la production de la PGI₂ augmente (Krüger-Genge et al., 2019). La PGI₂ a également des effets anti-plaquettaires (Moncada et al., 1977; Taylor et al., 2005).

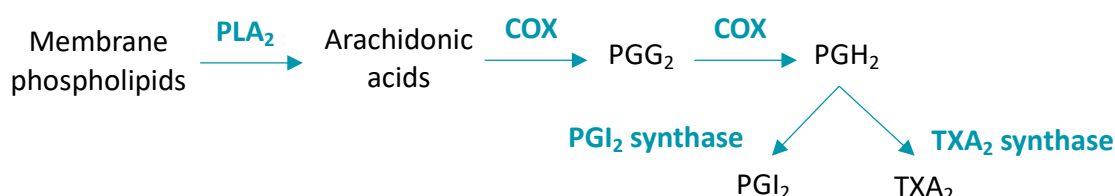


Figure 3 : Synthèse enzymatique de la PGI₂ et du TXA₂

La PGI₂ et le TXA₂ sont tous deux synthétisés à partir des phospholipides membranaires. Par l'activité enzymatique de la phospholipase A₂ (PLA₂) et de la COX, les phospholipides sont transformés en acide arachidonique, prostaglandine G₂ (PGG₂) puis prostaglandine H₂ (PGH₂). La PGH₂ est transformée en PGI₂ par la PGI₂ synthase ou en TXA₂ par la TXA₂ synthase.

La voie de l'EDHF

Il a été montré que lors de l'inhibition de la voie du NO et la voie de PGI₂, une vasodilatation persistait (Wang et al., 2003) et que l'Ach pouvait provoquer une vasodilatation indépendante de la voie du NO (Chen et al., 1988; Huang et al., 2000). Ainsi, la voie de l'EDHF a été découverte. Comme son nom l'indique, les EDHF se caractérisent par leur capacité à entraîner une hyperpolarisation des CE puis des CMLV. Suite à un stimulus, l'élévation de la [Ca²⁺]_i des CE activent les canaux K⁺ sensibles au Ca²⁺ (K_{Ca}) endothéliaux tels que SK_{Ca} (K_{Ca}2.3) et IK_{Ca} (K_{Ca}3.1). L'efflux du K⁺ agit sur les CMLV au niveau des jonctions myoendothéliales, qui sont des microdomaines constitués par une projection endothéliale, et activent les pompes Na⁺/K⁺-ATPase et les canaux K⁺ à rectification entrante (K_{IR}). Les CMLV sont alors hyperpolarisées, par efflux de K⁺, ce qui réduit fortement l'activation des canaux Ca²⁺ dépendant du potentiel (Ca_v). Cette baisse d'entrée de Ca²⁺ entraînant une vasodilatation (Figure 2) (Garland et al., 2011). Au niveau des artères de résistance, en absence de NO, les EDHF deviennent la voie de dilatation prédominante (Tomioka et al., 1999).

b) Les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium

L'endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide de 21 acides aminés identifié et décrit comme un vasoconstricteur dérivé de l'endothélium en 1988 (Yanagisawa et al., 1998). L'ET-1 est synthétisée par les CE à partir de la pré-endothéline qui est convertie en pré-endothéline puis en ET-1 par l'enzyme de conversion de l'endothéline. La synthèse est stimulée par différents facteurs tels que l'angiotensine II (AngII), le TNF-β et la thrombine (Krüger-

Genge et al., 2019; Rubanyi and Polokoff, 1994). Elle peut être inhibée par le NO et la PGI₂ (Davenport et al., 2016). Les récepteurs à l'ET-1 sont des RCPGq et il en existe 2 types : ET_A et ET_B. Une fois synthétisée par les CE, l'ET-1 se fixe sur ses récepteurs ET_A et ET_B exprimés au niveau des CMLV et entraîne l'augmentation de la [Ca²⁺]_i par l'intermédiaire de la phospholipase C et de l'IP₃. Alors que la principale action de l'ET-1 est la vasoconstriction, elle peut également avoir un effet vasodilatateur (Warner et al., 1989). Les CE exprimant l'ET_B, l'activation du récepteur par la fixation de l'ET-1 entraîne la production du NO et de la PGI₂ par l'élévation de la [Ca²⁺]_i (Houde et al., 2016).

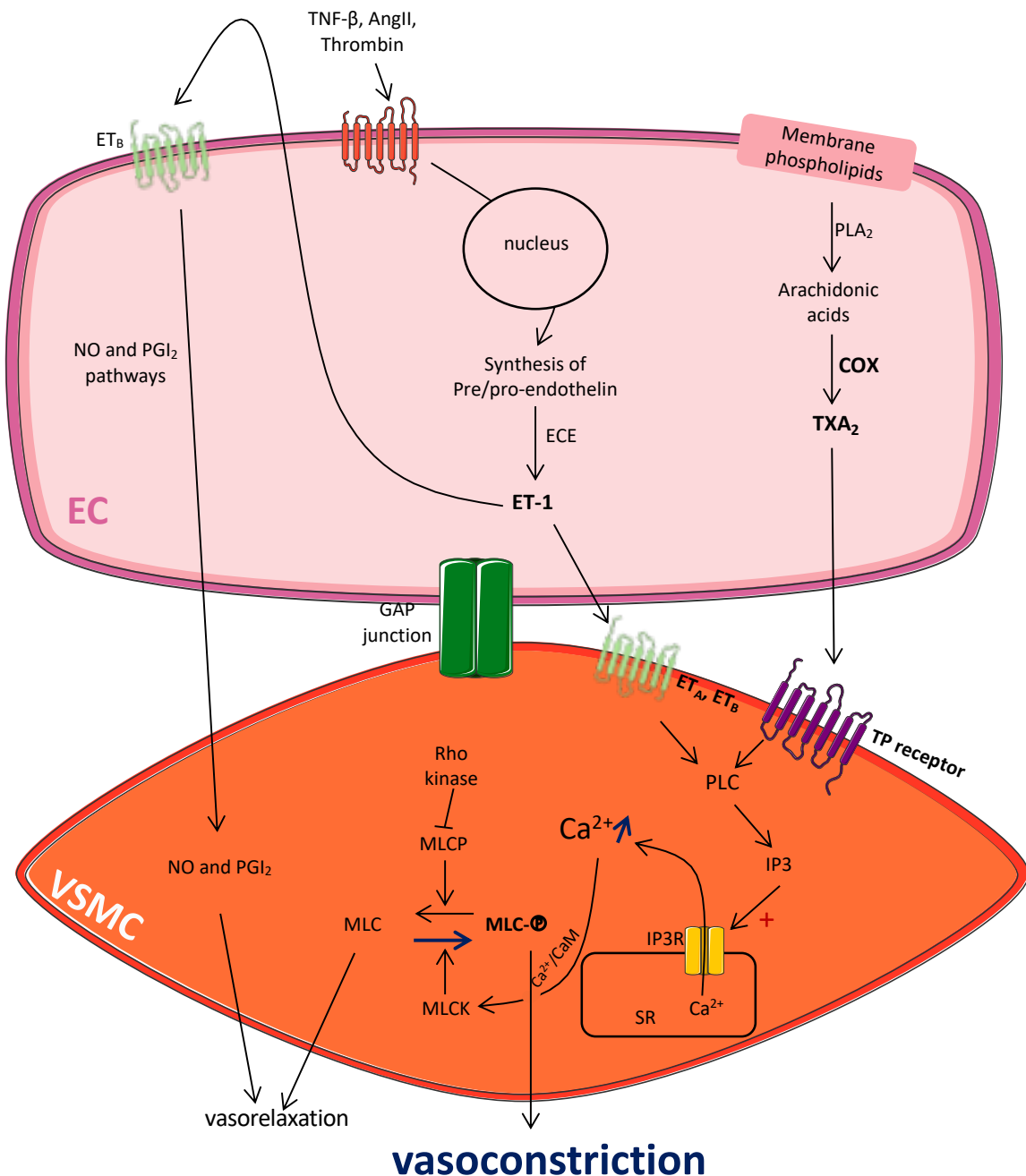


Figure 4 : Les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium

Le schéma représente le mécanisme d'action de l'ET-1 et du TXA₂ synthétisés par les CE (ou EC). L'AngII, la TNF-β et la thrombine stimulent la synthèse de la pré-proendothéline qui sera transformée en ET-1 par l'enzyme de

conversion de l'endothéline (ECE). L'ET-1 agit sur ses récepteurs ET_A et ET_B des CMLV (ou VSMC), puis provoque la hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ via la voie de l' IP_3 . Le TXA_2 produit par les EC stimule le récepteur thromboxane-prostanoïde (TP receptor) induisant également l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. L'ensemble entraîne une vasoconstriction.

Le thromboxane A_2

Le thromboxane A_2 (TXA_2) est une molécule synthétisée par les CE à partir de l'acide arachidonique grâce aux COX comme la PGI_2 . Après la formation de la prostaglandine H_2 , cette fois-ci, la TXA_2 synthase catalyse la production du TXA_2 (Figure 3). Le TXA_2 a été décrit comme ayant des effets opposés à ceux de la PGI_2 dans l'homéostasie du tonus vasculaire (Moncada et al., 1976). En effet, il entraîne une vasoconstriction par l'activation du récepteur thromboxane-prostanoïde sur les CMLV (Sellers and Stallone, 2008). Le TXA_2 a également un effet pro-agrégant et peut aussi être synthétisé par les plaquettes. Sa synthèse est donc augmentée en cas de blessure, alors que la production de la PGI_2 est importante dans les conditions physiologiques afin de réguler le tonus vasculaire (Simmons et al., 2004). L'analogue synthétique du TXA_2 , nommé l'U46619, est un agent pharmacologique utilisé très couramment dans les expérimentations afin d'induire une contraction vasculaire.

c) Les artères de résistance développent un tonus myogénique

Le tonus myogénique (TM) est défini comme la capacité des artères à se contracter en réponse à l'augmentation de la pression et à l'étirement pariétal indépendamment des influences nerveuses, hormonales ou métaboliques (Davis and Hill, 1999; Johansson, 1989). Le TM a été décrit pour la première fois par Bayliss en 1902. Il a observé, lors de l'augmentation de la pression, une vasoconstriction d'une artère de chien isolée et dénervée (Bayliss, 1902). Le TM est une caractéristique exclusive des CMLV des artères de petit calibre, leur permettant de déterminer la résistance périphérique. Dans un organisme complexe, le changement brusque de la PA dû à un changement de posture ou aux activités sportives peut survenir à tout moment. Le TM est donc un mécanisme d'autorégulation important développé par les CMLV permettant de maintenir un débit périphérique constant.

Les CMLV développent le TM dès l'augmentation de la pression. Le mécanisme du TM est caractérisé par 1) la détection de l'étirement de la paroi artérielle dû à la pression puis 2) la dépolarisation membranaire des CMLV et enfin 3) l'augmentation de la perméabilité au Ca^{2+} par l'activation des canaux Ca_v aboutissant à l'activation des protéines contractiles (Figure 5) (Davis and Hill, 1999). Au niveau des CMLV, les canaux Ca_v de type-L (notamment l'isoforme $Ca_v1.2$) sont exprimés et sont responsables de la perméabilité au Ca^{2+} lors de la dépolarisation membranaire (Tykocki et al., 2017). L'entrée du Ca^{2+} via les canaux Ca_v mobilise également le stockage du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique via les récepteurs à l' IP_3 renforçant l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$. Cependant, les canaux Ca_v ne semblent pas être les acteurs de la dépolarisation membranaire initiant le TM (Davis et al., 1992; Wu and Davis, 2001). En effet, certains canaux TRP tels que TRPV2 et TRPM4 sont exprimés au niveau des CMLV et sont responsables de cette dépolarisation (Earley Scott et al., 2004, p. 4; Muraki Katsuhiko et al., 2003, p. 2). Ces canaux cationiques non sélectifs sont sensibles à l'étirement pariétal induit par l'augmentation de pression. Lors de l'ouverture, ils font entrer le Na^+ et le Ca^{2+} qui entraînent la dépolarisation

membranaire. Par ailleurs, certains RCPG sont également décrits comme étant mécanosensibles. Par exemple, les CMLV expriment les récepteurs AT1 à l'AngII qui peuvent être activés par l'étirement pariétal sans la présence de l'AngII. L'activation de ces récepteurs entraîne l'activation de RhoA et la mobilisation du Ca^{2+} via d'autres canaux, aboutissant tous à la contraction par la phosphorylation des MLC (Kauffenstein et al., 2012; Mederos y Schnitzler et al., 2011). Le TM est donc un phénomène engendré par les stimuli mécaniques, ici la pression, pour protéger l'artère et les organes périphériques de l'augmentation de pression.

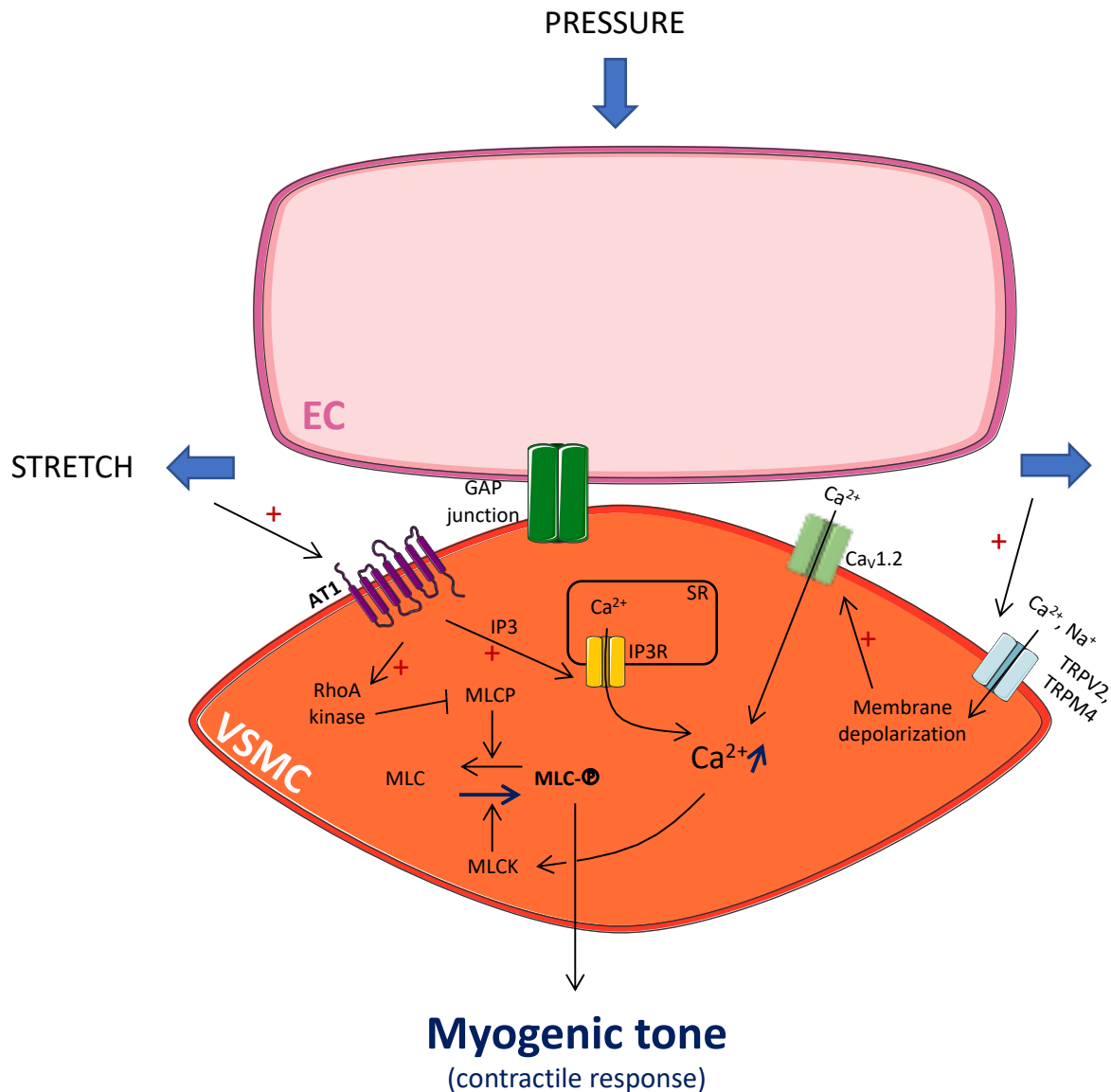


Figure 5 : Le tonus myogénique généré par la pression et l'étirement pariétal

Le tonus myogénique illustré par le schéma est généré par la pression et l'étirement pariétal. Ces forces stimulent les TRPV2 et TRPM4 dépolarisant la membrane des CMLV (ou VSMC). La dépolérisation entraîne l'entrée du Ca^{2+} à travers le canal $Ca_v1.2$. Les forces exercées sur les cellules activent également l'AT1 sans la présence de son ligand (AngII), et contribuent à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. La hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ génère des réponses contractiles, donc le tonus myogénique.

d) La vasomotricité des artères de résistance est régulée par le système nerveux

La vasomotricité des artères de résistance est régulée par différents métabolites et par des stimulations mécaniques, comme décrit précédemment. Le contrôle nerveux a également une part très importante dans cette régulation. On parle du contrôle neurogénique du tonus vasculaire. La paroi des artères, de façon générale, présente des plexus nerveux formés par les filets nerveux issus du système nerveux autonome. Ces plexus sont présents au niveau de l'adventice et s'enfoncent jusqu'à la couche externe de la média. Il a été rapporté que les fibres nerveuses sympathiques sont majeures au niveau des nerfs périvasculaires (Aalkjaer et al., 2020). La présence des terminaisons nerveuses (TN) adrénergiques et cholinergiques a été décrite dans les artères de résistance telles que les MA (Tangsucharit et al., 2012) et les artères cérébrales (Roloff et al., 2016). Alors que les TN sympathiques se trouvent uniquement dans la média, les TN parasympathiques sont localisées dans l'intima et la média (Amiya et al., 2014). En outre, les nerfs sensoriels efférents, qui sont non-adrénergiques et non-cholinergiques, participent à la régulation de la vasomotricité (Kawasaki et al., 2011). Ces différentes fibres nerveuses forment un réseau nerveux périvasculaire.

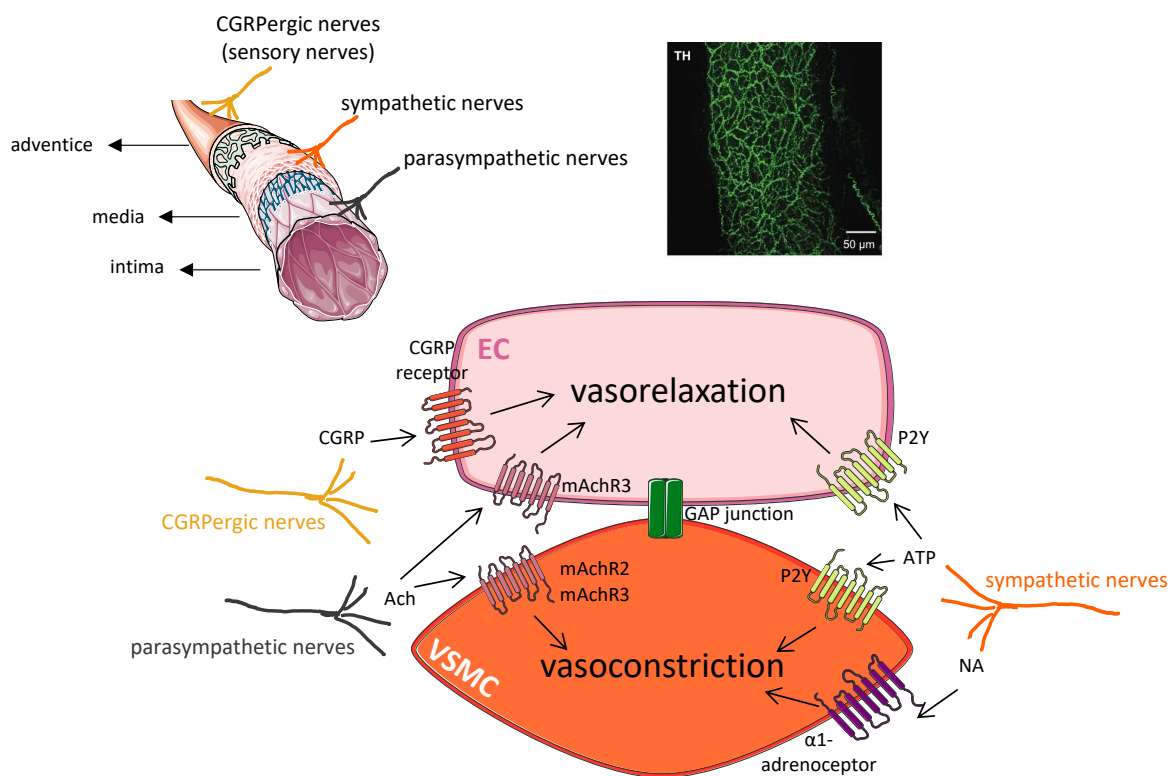


Figure 6 : Régulation de la vasomotricité par le système nerveux

Trois types de nerfs sont présents dans la paroi des artères à différents niveaux : CGRPergiques (adventice), sympathiques (adventice-média) et parasympathique (média-intima). Les nerfs CGRPergiques sont les nerfs sensoriels efférents. Ils peuvent libérer les CGRP. Les nerfs sympathiques produisent l'ATP et la noradrénaline (NA), et les nerfs parasympathiques libèrent l'Ach. En fonction de la localisation des récepteurs, ces neurotransmetteurs provoquent la vasorelaxation ou la vasoconstriction. Physiologiquement, les nerfs parasympathiques n'interviendraient pas dans la régulation de la vasomotricité. La photo de l'imagerie confocale illustre l'innervation sympathique périvasculaire au niveau de MA de rat (Tangsucharit et al., 2012).

Les NT, les molécules peptidiques ou non peptidiques libérées par les nerfs agissent non seulement sur les CMLV mais aussi sur les CE à travers de nombreux récepteurs. Les CMLV exprimant les récepteurs α 1-adrénergiques interagissent avec la noradrénaline, le NT principal du système nerveux sympathique et développent une vasoconstriction. Cette vasoconstriction d'origine sympathique peut altérer de façon conséquente la DFD (Hijmering et al., 2002). Les nerfs périvasculaires sympathiques sécrètent aussi l'ATP (Burnstock and Ralevic, 1994) pouvant avoir des actions duales et opposées sur les artères. Les CE ainsi que les CMLV expriment les récepteurs purinergiques P2Y. L'activation des récepteurs P2Y des CE entraîne une vasodilatation, alors que celle des CMLV induit une vasoconstriction (Chistiakov et al., 2015). L'Ach libérée par les nerfs cholinergiques peut agir principalement sur les CE exprimant les récepteurs muscariniques M3. La fixation du ligand active la voie du NO et entraîne une vasodilatation. Les CMLV présentent les récepteurs muscariniques M2 et M3, mais la contraction a lieu lorsque la voie du NO est inhibée (Amiya et al., 2014). Les nerfs sensoriels efférents sont capables de synthétiser et de sécréter le peptide relié au gène calcitonine (CGRP). Les MA de rat expriment ces nerfs CGRPergiques (Kawasaki et al., 2011). Depuis la découverte de ce peptide en 1983 (Rosenfeld et al., 1983), sa capacité dilatatrice a été aussitôt reconnue (Brain et al., 1985). En effet, les CGRP sécrétés agissent sur les CE présentant les récepteurs du CGRP et induisent une vasodilatation (Chistiakov et al., 2015). Récemment, les études histologiques ont démontré l'expression de la NOS neuronale (nNOS) dans les réseaux nerveux périvasculaires des artères de petit calibre telles que les MA (Kawasaki et al., 2011) et les artères coronaires (Toda and Okamura, 2015). Ces nerfs sont localisés principalement dans l'adventice. La stimulation de ces TN entraîne la libération du NO neurogénique provoquant la relaxation des CMLV. Ainsi, le réseau nerveux périvasculaire complexe incluant différents types de nerfs participe à la régulation de la vasomotricité. Cependant, il s'est avéré que les nerfs parasympathiques ne participent pas physiologiquement à la régulation vasomotrice et que seuls les nerfs adrénergiques et les nerfs sensoriels efférents contrôlent le tonus vasculaire (Tangsucharit et al., 2012).

1.3.2. Les autres fonctions physiologiques impliquant le système vasculaire

La réactivité vasculaire importante est une caractéristique spécifique des artères de résistance et des artérioles. Mais comme tout autre vaisseau sanguin, ces artères ont d'autres fonctions vasculaires communes telles que l'hémostase et l'angiogenèse. Dans cette partie, ces fonctions seront décrites de façon générale.

a) L'hémostase

L'hémostase est un processus survenant lors d'une rupture des vaisseaux sanguins afin d'arrêter le saignement. C'est une réponse rapide, localisée et précise qui s'effectue en trois étapes successives : 1) le spasme vasculaire, 2) la formation du clou plaquettaire et 3) la coagulation formant un thrombus. Le spasme vasculaire consiste à la contraction intense des CMLV développant une vasoconstriction. Lors d'une lésion d'un vaisseau sanguin, les vasoconstricteurs puissants comme TXA_2 sont produits par les plaquettes et les CE (Chen, 2018). Le mécanisme du spasme vasculaire augmente en efficacité proportionnellement à la gravité de la blessure et il est plus prononcé dans les artères de petit calibre. Cette vasoconstriction endigue l'hémorragie pendant le temps de la formation du clou plaquettaire. En règle générale, les CE intacts synthétisent en permanence le NO et la PGI_2 qui ont des effets vasodilatateurs et anti-agrégants. Lors d'une lésion vasculaire, l'endothélium synthétise le TXA_2

ayant des effets vasoconstricteurs et pro-agrégants. En effet, le TXA₂ synthétisé agit sur les CMLV en se fixant sur les récepteurs thromboxane-prostanoïdes entraînant la contraction intense (Sellers and Stallone, 2008) et accélère l'expression des protéines d'adhésion telles qu'ICAM-1, VCAM-1 et ELAM-1 au niveau des CE (Nakahata, 2008). Ainsi, les plaquettes adhèrent sur l'endothélium et s'agrègent avec les fibres de collagène exposées. Les plaquettes agrégées libèrent davantage des substances chimiques renforçant l'agrégation et forment enfin le clou plaquettaire. Ensuite, afin de consolider cette masse plaquettaire, les différents facteurs de coagulation se trouvant dans la circulation s'activent et forment des filaments de fibrine polymérisées s'attachant aux plaquettes, et donc un thrombus. En temps normal, les CE libèrent l'activateur tissulaire du plasminogène catalysant la formation de plasmine qui favorise la fibrinolyse pour empêcher la formation du thrombus. En cas de lésion, le processus fibrinolytique est inhibé par l'inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène. Une fois le caillot stabilisé, les plaquettes se contractent pour l'expulser et sécrètent les facteurs de croissance dérivés des plaquettes pour favoriser la cicatrisation. Ces facteurs favorisent la prolifération des CMLV et de fibroblastes afin de reconstruire la paroi et les CE répondent aux facteurs de croissance des CE vasculaires (VEGF) pour réparer l'endothélium (Moore et al., 2015, 2014).

b) L'angiogenèse

L'angiogenèse est la formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants, par la migration et la prolifération des CE. Ce processus se déroule en plusieurs étapes séquentielles : 1) la vasodilatation et la dégradation de la membrane basale augmentant la perméabilité du vaisseau, 2) le bourgeonnement et la migration des CE, ensuite 3) la prolifération des CE et la formation d'une nouvelle lumière, et enfin 4) la stabilisation du néovaisseau par interaction des CE avec les péricytes et par la synthèse d'une nouvelle lame basale (Carmeliet, 2003). Dans un premier temps, les vaisseaux néoformés sont de type capillaires qui sont des vaisseaux sanguins composés de l'endothélium sans CMLV. L'apparition et le développement des CMLV assurant le tonus vasculaire et de la matrice extracellulaire consolidant les structures vasculaires finalisent la formation des vaisseaux de type artérioles et artères. Ainsi, un réseau vasculaire hiérarchisé se forme. L'angiogenèse se développe activement et physiologiquement durant la période embryonnaire. Chez l'adulte, il est plus rare d'observer ce phénomène en raison de la quiescence de la majorité des CE. Cependant, les CE maintiennent leur capacité à s'activer rapidement en réponse aux stress environnementaux (ischémie, inflammation, tumeur ...) et à une lésion vasculaire pour procéder à la cicatrisation. L'angiogenèse est donc un processus complexe nécessitant une coordination et des régulations précises de nombreux facteurs activateurs (angiogéniques) et inhibiteurs (angiostatiques) tels que les facteurs de croissance, les cytokines, les protéines de la matrice extracellulaire, les protéases etc.

Le VEGF joue un rôle essentiel dans la stimulation de l'angiogenèse dans les conditions physiologiques et pathologiques (Carmeliet, 2003). La production de VEGF est étroitement liée à l'oxygénation locale des tissus. En effet, l'hypoxie est un des facteurs importants stimulant la synthèse de VEGF. Dans cette condition, les facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF) s'activent et stimulent la transcription des gènes *Vegf*. Selon le gradient du VEGF, les CE ayant un phénotype migratoire, appelées cellules « tip », se déplacent et forment un nouvel endothélium (Gerhardt, 2008; Sturtzel, 2017). A ce stade, la présence de flux est cruciale. Les forces de cisaillement induites par le flux sont perçues par les complexes mécanosensibles et permettent la survie et la

stabilisation de l'endothélium. Par la suite, le recrutement des CMLV et l'apparition de la matrice extracellulaire peuvent se faire, aboutissant à la formation d'une artère. En absence de flux, l'endothélium néoformé se dégénère (Carmeliet, 2003). Le processus angiogénique peut aussi être régulé par la signalisation Delta-like 4/Notch. Les cellules « tip », exprimant les récepteurs Notch, synthétisent les Delta-like 4, le ligand du récepteur Notch sous l'influence du VEGF. A travers cette voie de signalisation, les cellules « tip » abandonnent le phénotype migratoire (Gerhardt, 2008). Le VEGF n'est pas le seul facteur induisant l'angiogenèse. En cas de l'inflammation, les CE expriment les interleukines-19, les cytokines anti-inflammatoires. Ces dernières stimulent le facteur de transcription STAT3 et entraînent la migration des CE (Jain Surbhi et al., 2011).

1.4. Le remodelage artérielle sous-jacent à l'hypertension artérielle

1.4.1. Les généralités

A chaque battement cardiaque, le sang est pompé par le cœur et exerce une force sur la paroi artérielle, déterminant ce que l'on appelle la PA. Celle-ci est composée de deux types de pression : 1) la PA systolique (PAS) correspondant à la pression s'exerçant au moment de la contraction cardiaque et 2) la PA diastolique (PAD) s'exerçant lors du relâchement cardiaque. Chez une personne en bonne santé, les valeurs normales de la PAS et de la PAD se situent aux alentours de 130 mmHg et de 80 mmHg, respectivement. Lorsque la PAS est supérieure ou égale à 140 mmHg et/ou la PAD est supérieure ou égale à 90 mmHg et que cette pression haute persiste, on considère que l'individu souffre d'hypertension artérielle (HTA) (Tableau 1).

Catégorie	PAS (mmHg)		PAD (mmHg)
PA optimale	< 120	et	< 80
PA normale	120 - 129	et/ou	80 - 84
PA normale haute	130 - 139	et/ou	85 - 89
HTA de grade 1 (légère)	140 - 159	et/ou	89 - 99
HTA de grade 2 (modérée)	160 - 179	et/ou	100 - 109
HTA de grade 3 (sévère)	≥ 180	et/ou	≥ 110
HTA systolique isolée	≥ 140	et	< 90

Tableau 1 : Classification des différents grades d'HTA

Les valeurs de PAS et PAD ainsi que les catégories ont été définies par la Société Européenne de la Cardiologie (ESC) et la Société Européenne de l'Hypertension (ESH) en 2018.

L'HTA est l'une des premières causes de décès prématuré à l'échelle mondiale. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, actuellement, 1,28 milliard de personnes sont atteintes d'HTA dans le monde entier et chez moins d'une personne sur 5 seulement, l'HTA est maîtrisée. Les études de « Global Burden of Disease » ont montré que l'HTA entraîne environ 9,4 millions de morts chaque année dans le monde (GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016). En raison de l'absence de symptômes et de signes cliniques, l'HTA est considérée comme un « tueur silencieux » et de nombreuses personnes ignorent qu'elles en souffrent. Celle-ci étant l'un des

principaux facteurs de risque dans la survenue de maladies cardiovasculaires, lorsque la haute pression n'est pas maîtrisée, plusieurs complications telles que l'insuffisance cardiaque, la coronaropathie, l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux et l'artériopathie peuvent survenir.

Pendant que 90% des HTA apparaissent spontanément sans savoir la cause et qu'elles sont classées comme « essentielles », d'autres facteurs liés au mode de vie peuvent favoriser le développement de l'HTA, dite secondaire. Il est donc important d'adopter une hygiène de vie adaptée à chaque patient. Selon une revue scientifique publiée dans *Nature* en 2018, la mise en place des mesures hygiéno-diététiques a des effets positifs sur la PA (Oparil et al., 2018) :

- Consommation modérée de l'alcool → diminution de 2 à 4 mmHg,
- Activité physique → diminution d'environ 6 mmHg,
- Perte de poids chez les patients en surpoids → diminution de 2,7 mmHg,
- Diminution des apports en sel (< à 5 g/j) → amélioration du contrôle de l'HTA.

Ces mesures restent un traitement secondaire à faire respecter à tous les patients. Afin de traiter de façon efficace l'HTA, les traitements médicamenteux sont nécessaires. Il existe 5 classes de médicaments antihypertenseurs à savoir, les diurétiques, les β -bloquants, les inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone, les inhibiteurs calciques et les α -bloquants. Lorsque ces traitements ne fonctionnent pas bien, il est possible de prescrire un antihypertenseur central.

1.4.2. Le remodelage artériel dû à l'hypertension artérielle

La pression étant la force exercée sur la paroi artérielle, une haute pression chronique peut engendrer un remodelage artériel. Par définition, le remodelage artériel désigne la modification structurale et fonctionnelle de la paroi des artères due aux changements hémodynamiques au cours de processus physiologiques ou pathologiques. Par exemple, dans le cas de la grossesse, un remodelage vasculaire utérin se met en place afin de répondre aux besoins fœtaux. Ce processus est complètement réversible. Cependant, dans des conditions pathologiques comme l'HTA chronique, les changements structuraux et fonctionnels des artères sont durables, voire définitifs afin de contrer et de normaliser la modification hémodynamique importante.

Sur le plan structurel, le remodelage artériel est un processus actif impliquant des mécanismes cellulaires tels que la migration, la prolifération, la mort cellulaire et la synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire (Gibbons and Dzau, 1994). Il se caractérise par une modification du diamètre et de l'épaisseur de la paroi. Lorsque le diamètre de la lumière diminue ou augmente, on parle du remodelage « concentrique/inward » ou « excentrique/outward ». Le grossissement ou le rétrécissement de l'épaisseur pariétale se nomment le remodelage « hypertrophique » ou « hypotrophique ». Quand l'épaisseur ne varie pas, on dit que le remodelage est « eutrophique » (Figure 7). Les conséquences de l'HTA sur les artères diffèrent selon le type d'artère. **Les artères de conductance** à composante élastique, développent un élargissement progressif du diamètre interne accompagné d'un épaississement de la paroi. L'hypertrophie pariétale est un mécanisme adaptatif à l'augmentation de la contrainte circonférentielle due à la haute pression. L'élargissement du diamètre est lié aux dommages des éléments structuraux, en particulier les lames élastiques. L'hypertension favorise la dégradation des élastines. Ainsi, les contraintes cycliques intenses entraînent une sorte de « fatigue » des biomatériaux des

artères et entraînent un remodelage excentrique et hypertrophique au niveau des artères de conductance. **Les artères de résistance**, en réponse à l'augmentation de la pression, se contractent et développent un remodelage concentrique afin de contrer la pression importante et d'assurer la perfusion des organes en aval sans les nuire. En fonction de la localisation des artères de résistance, le remodelage peut être hypertrophique ou eutrophique. Chez les rats hypertendus, les MA ont subi un épaissement pariétal (Korsgaard and Mulvany, 1988) dû à la prolifération des CMLV et à l'augmentation de la synthèse de la matrice extracellulaire (Touyz et al., 2001). Cependant, au niveau des artères cérébrales, le remodelage observé a été eutrophique chez les rats SHR (Baumbach and Heistad, 1989).

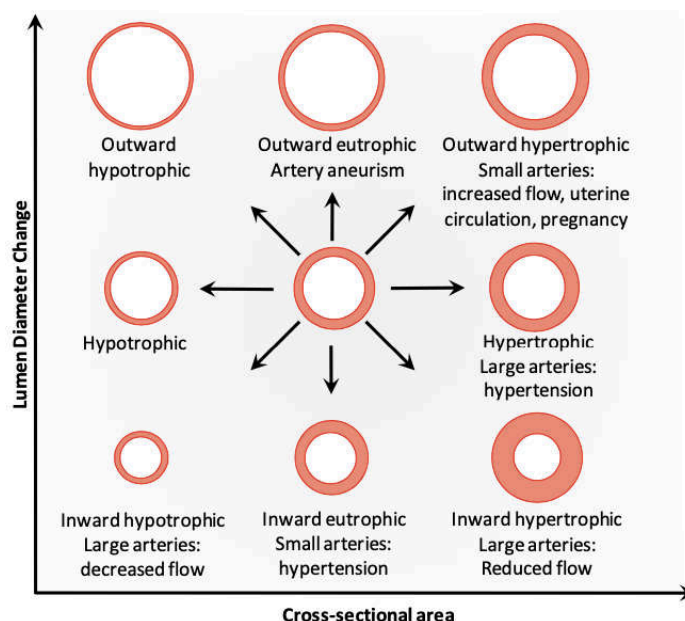


Figure 7 : Les différents types de remodelage artériel dans les conditions physiologiques et pathologiques cardiovasculaires

Le schéma illustre les différents types de remodelage structural de l'artère dans les différentes conditions physiopathologiques cardiovasculaires. Selon la variation du diamètre de la lumière, le remodelage est caractérisé comme « concentrique/inward » ou « excentrique/outward ». Le changement de l'épaisseur de la paroi se caractérise par hypotrophique, eutrophique ou hypertrophique. L'HTA n'entraîne pas le même remodelage en fonction du type d'artère (de conductance ou de résistance). Modifié à partir de (Mulvany et al., 1996)

L'HTA n'entraîne pas uniquement un changement structural mais aussi fonctionnel des artères. Souvent, une dysfonction endothéliale accompagne les changements structuraux chez les individus hypertendus (Schiffryn, 2004). Une dysfonction endothéliale, comme son nom l'indique, se caractérise par une altération phénotypique des CE. Dans un état physiologique normal, les CE ont des propriétés anti-agrégants, anti-plaquettaires, anti-inflammatoires et assurent la vasodilatation en réponse au flux. Lorsqu'une dysfonction endothéliale se met en place, les CE présentent un profil pro-inflammatoire, favorisent l'agrégation plaquettaire et interagissent davantage avec des cellules immunitaires. De plus, les CE dysfonctionnelles deviennent insensibles au flux, altérant la production du NO. Ainsi, la DFD est mal assurée (Dharmashankar and Widlansky, 2010; Sturtzel, 2017). Par conséquent, à long terme, la dysfonction endothéliale peut favoriser le développement de

l'athérosclérose, voire d'autres maladies cardiovasculaires (Kuhlencordt Peter J. et al., 2001). Par ailleurs, l'HTA provoque une dysfonction endothéliale qui peut elle-même à son tour aggraver l'HTA (Sander Mikael et al., 1999). Le traitement de la dysfonction endothéliale peut donc améliorer l'efficacité des traitements antihypertenseurs.

2. Les canaux ioniques membranaires régulant le tonus vasculaire

Le Ca^{2+} est un 2nd messenger crucial dans la régulation de la vasomotricité. La variation de la $[Ca^{2+}]_i$ peut aboutir à la relaxation (CE) ou à la contraction (CMLV). En raison de son importance, l'homéostasie du Ca^{2+} est régulée par de nombreux canaux et échangeurs ioniques induisant la mobilisation des autres ions comme Na^+ , K^+ et Cl^- (Figure 8). Dans cette partie, je décris les principaux acteurs participant à la régulation de la $[Ca^{2+}]_i$.

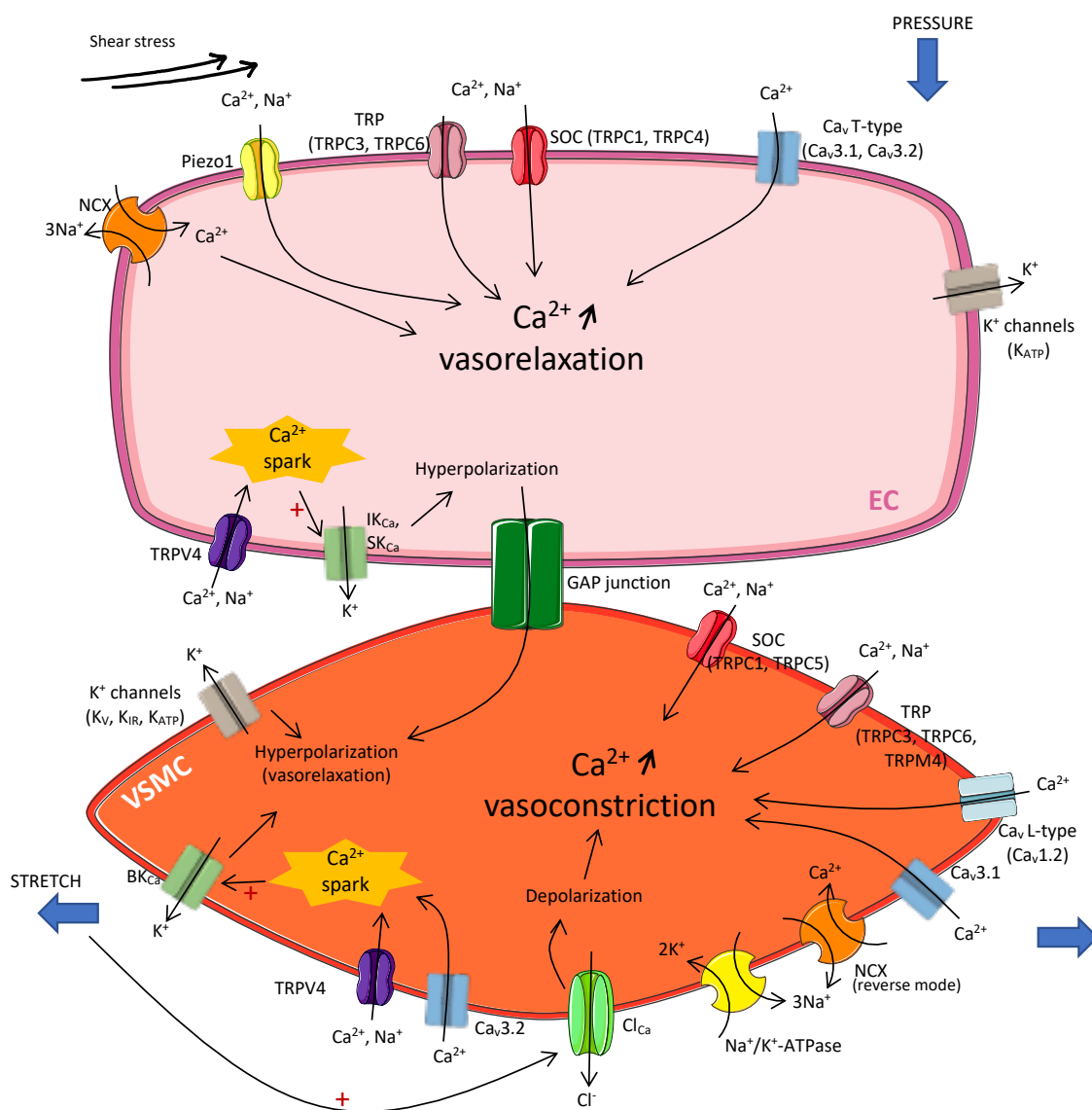


Figure 8 : Les canaux ioniques membranaires régulant la vasomotricité

Le schéma illustre les canaux et les cotransporteurs ioniques qui participent directement ou indirectement à la régulation de la vasomotricité, à savoir : les canaux Ca_v , les canaux TRP, Piezo1, les canaux K^+ (K_{Ca} , K_V , K_{IR} et K_{ATP}), les canaux Cl_{Ca} , les NCX et la pompe $Na^+/K^+-ATPase$. Les canaux et les cotransporteurs ioniques des CE (ou EC) contribuent essentiellement à la vasorelaxation. Les acteurs des CMLV (ou VSMC) participent principalement à la vasoconstriction, à l'exception de certains canaux. Les canaux K^+ , TRPV4 et $Ca_v3.2$ présents dans les VSMC déclenchent plutôt la vasorelaxation. Le Ca^{2+} est l'acteur central du contrôle de la vasomotricité. Les canaux et les cotransporteurs ioniques régulent directement ou indirectement la $[Ca^{2+}]_i$ pour modifier les réponses vasomotrices.

2.1. Les canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel des cellules vasculaires

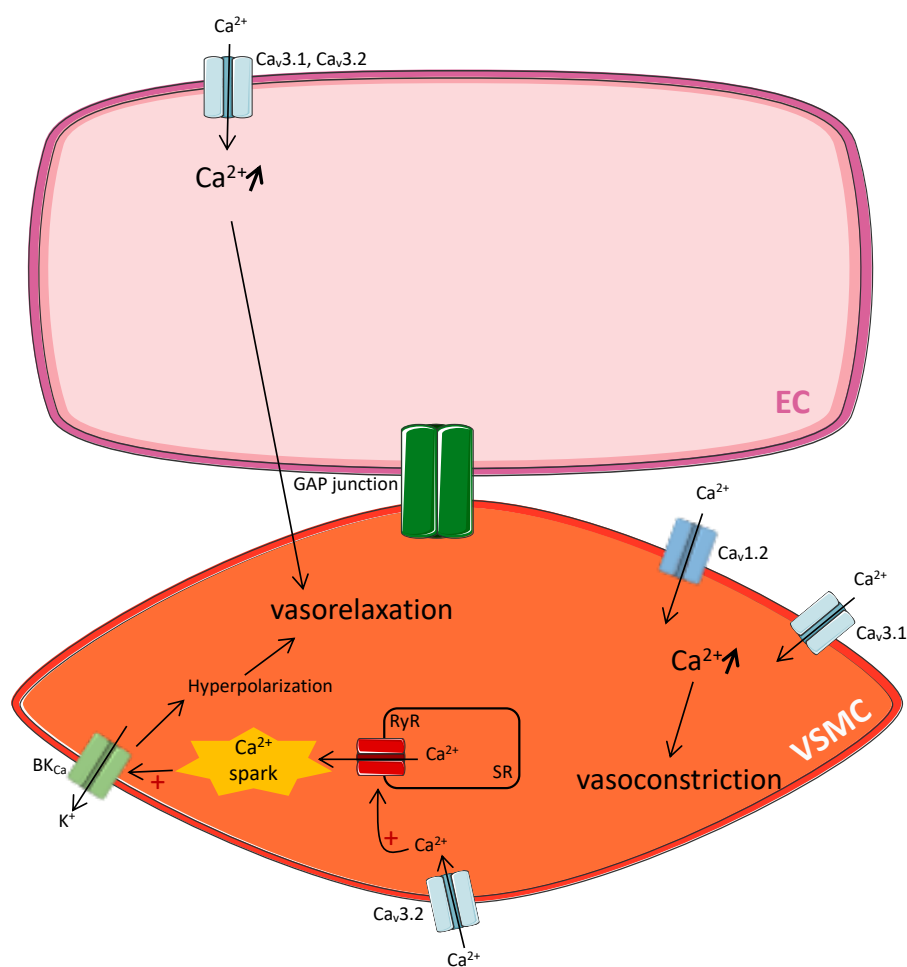


Figure 9 : Implication des canaux Ca_v dans la régulation de la vasomotricité

Les canaux Ca_v des cellules endothéliales (EC) sont de type-T et entraînent la vasorelaxation. Les isoformes $Ca_v1.2$ (type-L) et $Ca_v3.1$ (type-T) des CMLV (ou VSMC) induisent la vasoconstriction. Cependant, l'isoforme $Ca_v3.2$ des VSMC stimule les récepteurs à la Ryanodine (RyR) et provoque la sortie Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (SR). Ce « Ca^{2+} spark » active les canaux BK_{Ca} hyperpolarisant les VSMC, ce qui entraîne la vasorelaxation.

Une part de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ provient du milieu extracellulaire à travers les canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel (Ca_v). Lors de la dépolarisation membranaire, les canaux Ca_v s'ouvrent et entraînent un influx important de Ca^{2+} du fait d'un fort gradient électrochimique. Ces canaux sont classés en six types selon leurs caractéristiques pharmacologiques et électrophysiologiques, à savoir, type-L, T, N, P/Q et R (Catterall, 2011). Parmi eux, **les canaux Ca_v de type-L** caractérisés par le seuil d'activation élevé (-40 à -30 mV) sont les plus décrits au niveau des artères, en particulier dans les CMLV. En effet, l'isoforme $Ca_v1.2$ est exprimée dans les CMLV des différentes artères telles que les artères cérébrales, les aortes, les artères tibiales et les artérioles de muscles squelettiques (Jackson, 2000; Syed et al., 2019a; Tykocki et al., 2017). Au niveau des artères cérébrales de rat, les canaux Ca_v de type-L contribuent au développement du TM à travers la dépolarisation membranaire induite par l'augmentation de la pression intravasculaire (Knot and Nelson, 1998). L'inhibition de ces canaux entraîne une réduction du TM dans les artérioles désendothélialisées de muscles squelettiques de rat (Kotecha and Hill, 2005). L'extinction ciblée du gène codant $Ca_v1.2$ (isoforme de Ca_v type-L) au niveau des CMLV (modèle murin SMAKO) induit une perte de TM de la microcirculation (Moosmang et al., 2003). Ainsi, les canaux Ca_v de type-L jouent un rôle important dans le maintien de la résistance périphérique par le développement du TM des artères (Figure 9). Les courants Ca^{2+} de type-L ont également été observés dans les CE microvasculaires de la glande médullosurrénale de bœuf (Bossu et al., 1989, 1992; Vinet and Vargas, 1999). Le transcrite *CACNA1C* ($Ca_v1.2$) a été mis en évidence dans les CE de l'artère coronaire humaine. Son niveau d'expression est significativement augmenté lorsque les cellules sont soumises au flux (Kefaloyianni and Coetzee, 2011). Cependant, le rôle de l'isoforme $Ca_v1.2$ endothéliale n'est pas élucidé.

Les canaux Ca_v de type-T ayant le seuil d'activation plus négatif (-70 à -60 mV) sont exprimés dans les différentes artères, par exemple, les artérioles crémastériques (VanBavel et al., 2002), les artérioles rénales (Hansen et al., 2001), les MA (Braunstein et al., 2009; Svenningsen et al., 2014), les artères pulmonaires (Gilbert et al., 2017), les artères cérébrales (Kuo et al., 2010) et les artères coronaires (Kefaloyianni and Coetzee, 2011). Contrairement à $Ca_v1.2$, les canaux Ca_v de type-T sont davantage décrits dans les CE. En effet, les $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ (les isoformes de Ca_v type-T) sont localisés dans les CE des artères cérébrales, des MA et des artères coronaires (Braunstein et al., 2009; Kefaloyianni and Coetzee, 2011; Kuo et al., 2010). Au niveau de l'endothélium, les canaux Ca_v semblent être impliqués dans la réponse vasodilatatrice. Gilbert et al. ont montré que chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$, la dilatation des artères pulmonaires induite par l'Ach a été réduite (Gilbert et al., 2017). Sur les artères crémastériques isolées, l'extinction du gène codant $Ca_v3.2$ a induit une diminution de la vasodilatation (Figuroa et al., 2007). En parallèle, l'implication des canaux Ca_v de type-T dans le TM est discutée. VanBavel et al. proposent que le sous-type $Ca_v3.1$ participerait au développement du TM des artères crémastériques de rat (VanBavel et al., 2002). En revanche, l'isoforme $Ca_v3.2$ est proposée pour jouer un rôle dans le rétrocontrôle négatif la contraction vasculaire (Harraz et al., 2014). L'entrée de Ca^{2+} par $Ca_v3.2$ active les récepteurs à la Ryanodine (RyR) du réticulum sarcoplasmique entraînant une augmentation importante de la $[Ca^{2+}]_i$. Le Ca^{2+} stimule les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} (BK_{Ca}) induisant un efflux du K^+ et donc l'hyperpolarisation membranaire. Par conséquent, cela inactive les canaux Ca_v et limite le TM. Ainsi, les canaux Ca_v de type-T entraînent la vasodilatation ou la vasoconstriction selon leur localisation, mais ils ont également un rôle régulateur du tonus vasculaire (Figure 9).

2.2. Les canaux cationiques non-sélectifs (TRP et Piezo) des cellules vasculaires

En outre des canaux Ca_v , les canaux cationiques non-sélectifs perméables au Ca^{2+} et au Na^+ tels que les canaux TRP et Piezo1 contribuent à la régulation du Ca^{2+} intracellulaire dans les artères.

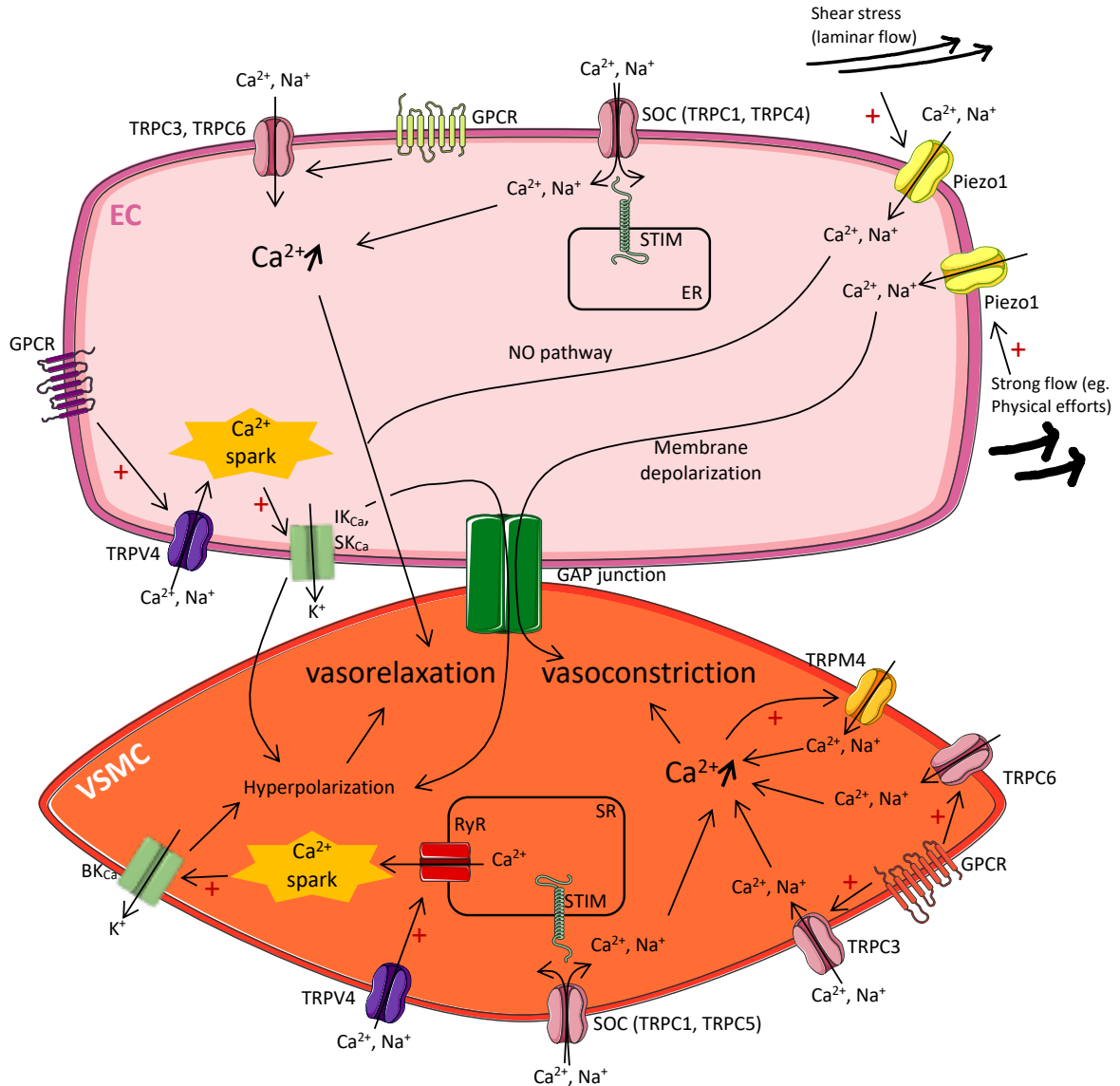


Figure 10 : Régulation de la vasomotricité par les canaux TRP et Piezo1

Les canaux TRP contribuent à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des CE (ou EC) ou des CMLV (ou VSMC) en fonction de leur localisation et régule la réponse vasomotrice. TRPC3 et TRPC6 sont principalement stimulés par les GPCR. Certains TRPC (1, 4 et 5) se comportent comme des SOC (« Store-Operated Ca^{2+} Channel ») et interagissent avec STIM. Le sous-type TRPV4 est capable de provoquer le « Ca^{2+} spark » activant les canaux K_{Ca} (IK_{Ca} , SK_{Ca} et BK_{Ca}). Ces canaux K^+ entraînent l'hyperpolarisation des VSMC, donc la vasorelaxation. Le canal Piezo1, sensible aux forces de cisaillement, contribue à la réponse dilatatrice. En revanche, sous un flux intense, il peut entraîner la vasoconstriction.

Les canaux TRP des cellules vasculaires

Les canaux « transient receptor potential » (TRP) représentent une grande famille de canaux cationiques perméables au Na^+ et Ca^{2+} . Sur la base des homologies de séquences d'acides aminés, ils sont divisés en 6 sous-familles chez les mammifères : canonical (TRPC), vanilloïde (TRPV), mélastatine (TRPM), ankyrine (TRPA), polycystine (TRPP) et mucopolipine (TRPML) (Wu et al., 2010). Leur activation conduit à l'entrée des cations suivie d'une dépolarisation membranaire. Les canaux TRP sont principalement exprimés au niveau des cellules épithéliales, mais se trouvent également dans les cellules vasculaires (Earley and Brayden, 2015; Yao and Garland, 2005).

Les isoformes TRPC1 et TRPC4 sont décrits dans les CE des artères pulmonaires humaines, de souris et d'aorte de souris (Freichel et al., 2001; Kwiatek et al., 2006; Sundivakkam et al., 2012). TRPC1, TRPC4 et TRPC5 sont connus comme étant capables de former des homo/hétéro-polymères et d'agir comme un « store-operated Ca^{2+} channels » (SOC) (Hofmann et al., 2002). Lors de la déplétion du stock interne de Ca^{2+} , ils interagissent avec les « stromal interaction molecules 1 » (STIM1) et provoquent l'entrée du Ca^{2+} (Figure 10). Dans les CE isolées d'aorte de souris TRPC4^{-/-}, le courant Ca^{2+} « store-operated » a été fortement diminué (Freichel et al., 2001). Lorsque l'expression de TRPC1 ou de TRPC4 a été inhibée par siRNA, la fonction « store-operated Ca^{2+} entry » (SOCE) a été réduite dans les CE pulmonaires isolées de souris. De plus, leur fonction SOCE a été supprimée quand les STIM1 ont été réprimées (Sundivakkam et al., 2012). Contrairement aux TRPC1 et 4, les TRPC3 et TRPC6 peuvent interagir avec les RCPG et être activés par le diacylglycérol (DAG) (Figure 10) (Hofmann et al., 1999). Ils semblent être impliqués dans la dilatation endothélium-dépendante. En effet, il a été rapporté que l'inhibition de TRPC3 a réduit la DFD des MA de rat (Liu et al., 2006). L'extinction du gène codant TRPC6 a entraîné une diminution du signal Ca^{2+} dans les CE, ainsi que la relaxation endothélium-dépendante de l'aorte de souris (Loga et al., 2013). L'expression de TRPV4 est également décrite dans les différentes artères de souris, à savoir l'aorte, les carotides et les MA (Zhang et al., 2009; Sonkusare et al., 2012, 2014). L'extinction de TRPV4 entraîne la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des CE des MA, donc la réduction de la vasodilatation (Zhang et al., 2009). L'équipe de Sonkusare a décrit la fonction du TRPV4 au niveau des jonctions myo-endothéliales. Il est activé par l'interaction avec les RCPG, ici, couplés aux Gq, puis induit une entrée du Ca^{2+} locale appelée « Ca^{2+} spark ». Ce dernier active les canaux K_{Ca} provoquant une vasodilatation importante (Figure 10) (Sonkusare et al., 2014, 2012).

Comme dans les CE, les SOC tels que TRPC1 et 5 sont également décrits dans les CML microvasculaires cérébrales de rat. Ils participent à l'entrée du Ca^{2+} lors de la déplétion du stock interne du Ca^{2+} (Xu et al., 2006). Par ailleurs, les TRPC3 et 6 interagissant avec les RCPG sont aussi décrits dans les myocytes artériels. Il a été rapporté que TRPC3 joue un rôle important dans la vasoconstriction induite par les RCPG comme les récepteurs purinergiques et les récepteurs à l'ET-1 (Reading et al., 2005; Earley and Brayden, 2015). Dans les myocytes artériels cérébraux, le TRPC3 peut être activé par l'interaction avec les récepteurs à l' IP_3 (IP_3R) et entraîne l'entrée de Ca^{2+} . Cette interaction TRPC3- IP_3R est favorisée par l'ET-1 (Adebiyi et al., 2010). Welsh et al. ont montré que l'inhibition de TRPC6 par les oligonucléotides anti-sens a réduit le TM des artères cérébrales de rat (Welsh et al., 2002). L'accouplement de TRPC6 avec TRPM4 est aussi décrit pour le développement du TM. Précisément, les récepteurs AT1 stimulés par l'étirement ou par l'AngII activent TRPC6. L'entrée du Ca^{2+} par ce canal provoque la sortie du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, ce qui active le canal TRPM4. Tout l'ensemble participe à l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aboutissant à la contraction des CMLV (Figure 10) (Gonzales et al., 2014).

Contrairement aux autres canaux TRP, le canal TRPV4 contribue à la relaxation des myocytes *via* le « Ca^{2+} spark » comme décrit dans les CE. L'entrée du Ca^{2+} par TRPV4 stimule les RyR générant le « Ca^{2+} spark ». Ce dernier active les BK_{Ca} qui hyperpolarisent les CMLV, entraînant ainsi une vasorelaxation (Figure 10) (Earley and Brayden, 2015; Nelson et al., 1995).

Finalement, plusieurs sous-familles des canaux TRP, en particulier les TRPC et TRPV sont décrits à la fois dans les CE et CMLV de différentes artères. Ils contribuent à la régulation du Ca^{2+} intracellulaire. En fonction de leur localisation, ils participent soit à la vasorelaxation, soit au développement du TM.

Le canal Piezo1

Les canaux Piezo perméables au Ca^{2+} , Na^+ et K^+ sont activables par des stimulations mécaniques. Il en existe 2 types : Piezo1 et Piezo2. Le canal Piezo1 est principalement présent dans les tissus périphériques incluant les cellules vasculaires, alors que Piezo2 est davantage exprimé dans les neurones sensoriels. Piezo1 est essentiel pour le développement du système cardiovasculaire durant l'embryogénèse. En effet, chez les embryons de souris $\text{Piezo1}^{-/-}$, l'alignement des CE en réponse aux forces de cisaillement est fortement perturbé (Li et al., 2014; Ranade et al., 2014). Chez les individus adultes, le rôle de Piezo1 est davantage décrit dans la dilatation endothélium-dépendante. Le canal étant sensible aux forces de cisaillement, il répond différemment en fonction du flux. Sous un flux laminaire, Piezo1 contribue au développement de la DFD *via* la production du NO, qui a aussi un rôle athéroprotecteur. Wang et al. ont démontré que l'inactivation de Piezo1 endothéliale empêche la phosphorylation de la eNOS par le flux, ce qui réduit la production du NO (Wang et al., 2016). En revanche, au niveau de la crosse aortique qui est sujette à un flux turbulent, l'activation de Piezo1 entraîne une inflammation endothéliale pouvant aboutir au développement de l'athérosclérose (Hahn and Schwartz, 2009; Chiu and Chien, 2011). L'activation de Piezo1 peut aussi entraîner une réponse contractile. Lors d'un effort physique, le canal Piezo1 activé par l'augmentation importante du flux dépolarise les CE des MA de souris. Cette dépolarisation est transmise aux CMLV à travers les jonctions gap, induisant une vasoconstriction (Rode et al., 2017). Ainsi, Piezo1 contribue, par l'entrée des cations notamment du Ca^{2+} , à la régulation du tonus vasculaire en réponse au flux (Figure 10).

2.3. Les canaux K^+ des cellules vasculaires

Les canaux K^+ ne sont pas perméables au Ca^{2+} , mais sont connus pour leur rôle dans le contrôle du potentiel de membrane en hyperpolarisant les cellules par la sortie du K^+ . De ce fait, ils peuvent influencer la régulation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, par conséquent, la vasomotricité. Les cellules vasculaires présentent plusieurs types de canaux K^+ , à savoir les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} (K_{Ca}), les canaux K^+ dépendants du potentiel (K_v), les canaux K^+ à rectification entrante (K_{IR}) et les canaux K^+ sensibles à l'ATP (K_{ATP}).

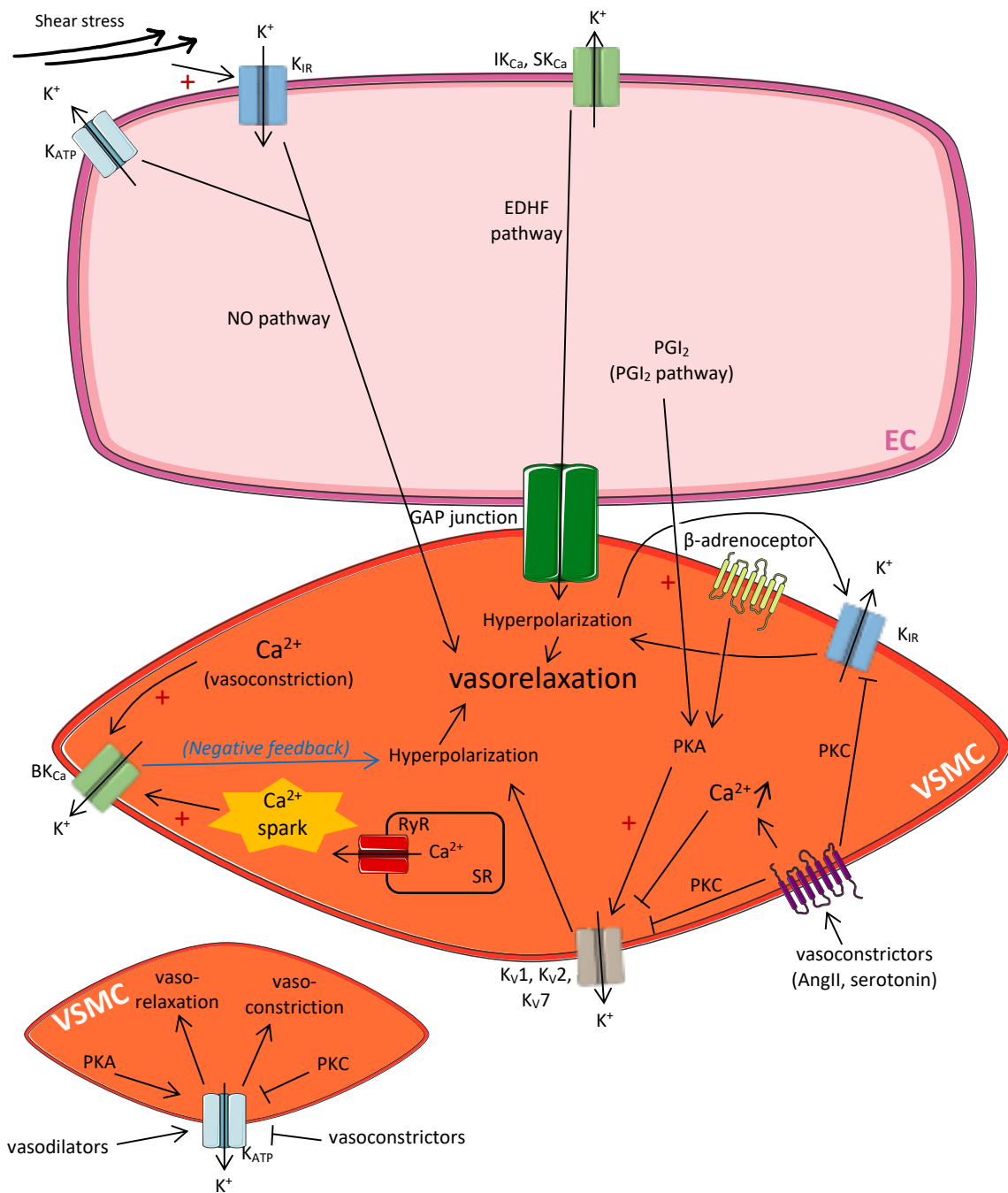


Figure 11 : Contribution des canaux K^+ dans la vasorelaxation

L'activité des différents canaux K^+ (K_{Ca} , K_V , K_{IR} , K_{ATP}) entraîne principalement la vasorelaxation. Les canaux K_{IR} des CE (ou EC) sont impliqués dans la voie du NO. Ceux des CMLV (ou VSMC) ayant des courants sortants sont stimulés par l'hyperpolarisation et la renforce en retour. L'activité des canaux K_V est favorisée par la PKA, alors que la PKC les inhibe. Les IK_{Ca} et SK_{Ca} des EC sont les principaux acteurs de la voie de l'EDHF. Le canal BK_{Ca} des VSMC peut être activé par le Ca^{2+} accru pendant la vasoconstriction et hyperpolarise les cellules. Il joue le rôle de rétrocontrôle négatif. L'activation des canaux K_{ATP} entraîne la vasorelaxation, tandis que sa répression participe à la vasoconstriction.

Les canaux K⁺ activés par le Ca²⁺

Comme leur nom l'indique, les canaux K_{Ca} sont sensibles au Ca²⁺ et activés par l'élévation de la [Ca²⁺]_i. Ils sont classifiés en 3 types : les canaux K_{Ca} de large conductance (BK_{Ca}), de conductance intermédiaire (IK_{Ca}) et de petite conductance (SK_{Ca}). Pendant que les CE expriment principalement les SK_{Ca} et IK_{Ca}, l'expression du BK_{Ca} est davantage décrite dans les CMLV (Féléto, 2009; Goto et al., 2018; Jackson, 2022; Ledoux et al., 2006; Tykocki et al., 2017). **Les SK_{Ca} et IK_{Ca}** endothéliaux sont essentiels dans la voie vasodilatatrice de l'EDHF (Ledoux et al., 2006; Garland et al., 2011; Goto et al., 2018; Severino et al., 2020). Les SK_{Ca} et IK_{Ca} présentent un domaine d'interaction avec la calmoduline en C-terminal intracellulaire. Lors de l'augmentation de la [Ca²⁺]_i dans CE, la calmoduline couplée au Ca²⁺ interagit et active les IK_{Ca} et SK_{Ca} (Ledoux et al., 2006). La sortie du K⁺ par ces K_{Ca} agissent sur le K_{IR} et la pompe Na⁺/K⁺-ATPase des CMLV. En parallèle, ce courant K⁺ se propage vers les CMLV à travers les jonctions gap. En somme, cela entraîne une hyperpolarisation des CMLV, donc une relaxation (Garland et al., 2011). Il a été observé que l'inhibition de K_{Ca}2.3 (isoforme de SK_{Ca}) a défavorisé l'hyperpolarisation de l'endothélium des MA de souris (Taylor et al., 2003). L'extinction génétique de K_{Ca}2.3 et/ou de K_{Ca}3.1 (isoforme de IK_{Ca}) a entraîné une forte diminution de la dilatation des MA, des artéoles crémastériques et des carotides de souris. Par ailleurs, ces modèles murins ont développé une augmentation de la PA (Taylor et al., 2003; Brähler et al., 2009). Dans les modèles SHR, la réduction de la voie de l'EDHF a été traduite par une baisse de l'expression de SK_{Ca} endothélial dans les MA (Seki et al., 2017; Weston et al., 2010). L'expression de BK_{Ca} dans les CE est quant à elle, discutée.

Le BK_{Ca}, essentiellement exprimé dans les CMLV, est décrit pour sa fonction de rétrocontrôle négatif dans la régulation du TM. Plusieurs études ont montré que son inhibition pharmacologique a entraîné une dépolarisation membranaire des CMLV et une contraction des artères pressurisées. Ces résultats ont été observés sur de nombreuses artères de résistance telles que les artères caudales, mésentériques, épigastriques et crémastériques de rongeurs (Hayoz et al., 2014; Jackson-Weaver et al., 2011; Kotecha and Hill, 2005; Lucchesi et al., 2005; Schubert et al., 1997; Westcott et al., 2012). Le BK_{Ca} est localisé à proximité du RyR (Pérez et al., 1999). Le canal peut donc être exposé à l'augmentation locale et aiguë du Ca²⁺. Contrairement aux SK_{Ca} et IK_{Ca}, le BK_{Ca} est sensible au Ca²⁺ indépendamment de la calmoduline et présente une activité dépendante du potentiel. Par conséquent, le canal est activé pendant la contraction qui est accompagnée de la dépolarisation membranaire et l'augmentation de la [Ca²⁺]_i. Son ouverture entraîne une hyperpolarisation des CMLV, donc une relaxation. Ainsi, le BK_{Ca} possède une fonction de rétrocontrôle négatif régulant le tonus vasculaire en agissant sur le potentiel de membrane (Figure 11) (Brayden and Nelson, 1992; Féléto, 2009; Ledoux et al., 2006; Syed et al., 2019b).

Les canaux K⁺ dépendants du potentiel

Les canaux K_v, par définition, sont sensibles au potentiel de membrane. Ils s'activent par une dépolarisation membranaire puis entraînent une hyperpolarisation. Ces canaux sont essentiellement présents dans les CMLV de multiples artères (Figure 11) (Cox, 2005; Jackson, 2005; Tykocki et al., 2017). Des courants K⁺ dépendants du potentiel ont été caractérisés dans des CE d'artères et de capillaires (Dittrich and Daut, 1999; Millar et al., 2008; Quignard et al., 2000). Cependant, le rôle des canaux K_v endothéliaux dans la vasomotricité reste indéfini. Au niveau des CMLV, les K_v1, K_v2 et K_v7 sont présents (Tykocki et al., 2017) et sont responsables de l'hyperpolarisation membranaire (Park et al., 2015; Yuill et al., 2011). Comme le BK_{Ca}, les canaux K_v contribuent

au rétrocontrôle négatif régulant le potentiel de membrane en limitant la dépolarisation membranaire des CMLV (Jackson, 2005; Syed et al., 2019a; Tykocki et al., 2017). L'inhibition de ces canaux peut même provoquer une contraction (Cook, 1989; Uchida et al., 1986). Certains agents vasoactifs semblent réguler indirectement leur activité. Par exemple, les agents vasoconstricteurs comme l'AngII et la sérotonine réduisent le courant K^+ dépendant du potentiel au niveau des CMLV des MA de rat (Bae et al., 2006; Hayabuchi et al., 2001b). Ce mécanisme d'inhibition se traduit par la fermeture des canaux K_v induite par la protéine kinase C qui est activée par la protéine Gq/11 couplée aux récepteurs de l'AngII et de la sérotonine (Clément-Chomienne et al., 1996; Hayabuchi et al., 2001b; Ko et al., 2010; Mackie et al., 2008). Il a été rapporté que la tyrosine kinase activée par la sérotonine peut également inhiber les canaux K_v (Sung et al., 2013). De plus, la hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ réduit le courant K^+ sensible à la 4-aminopyridine, un bloqueur des canaux K_v (Gelband et al., 1993; Ishikawa et al., 1993). Lorsque les substances vasoconstrictrices déclenchent l'augmentation Ca^{2+} intracellulaire dans les CMLV, l'activité de la PKC et le Ca^{2+} amplifieraient l'inhibition des canaux K_v . Ceci pourrait être un mécanisme de rétrocontrôle positif afin de renforcer la vasoconstriction. En parallèle, l'activité de ces canaux peut être favorisée par la PKA. Dans les artères cérébrales de rat, les récepteurs β -adrénergiques couplés aux protéines Gs activent la PKA, qui phosphoryle le K_v1 à l'aide d'une protéine d'échafaudage PSD95 (Moore et al., 2015, 2014). Les vasodilatateurs comme la PGI_2 et l'adénosine stimulent la protéine Gs activant la PKA, mais cette fois-ci, par l'augmentation de la production d'AMPc (Dong et al., 1998; Li et al., 2003). Par la suite, la PKA activée phosphoryle les canaux K_v , ce qui favorise le flux sortant K^+ (Figure 11). Par ailleurs, la PKA est capable de lever l'inhibition des canaux K_v induite par la RhoA (Luykenaar and Welsh, 2007). L'implication de ces canaux dans la vasodilatation peut être justifiée par la réduction des effets vasorelaxants par la 4-aminopyridine (Dick et al., 2008; Heaps et al., 2005; Sobey and Faraci, 1999). Ainsi, les canaux K_v participent à la régulation du tonus vasculaire, soit par son ouverture favorisant la relaxation, soit par sa fermeture renforçant la contraction.

Les canaux K^+ à rectification entrante

Les canaux K_{IR} permettent l'entrée de K^+ lorsque le potentiel de membrane est plus négatif qu'au potentiel d'équilibre à l'ion K^+ pour le retour du potentiel de membrane au repos (Hibino et al., 2010). Ils sont également capables d'induire de faibles courants sortants. C'est le cas dans les CMLV artérielles. L'hyperpolarisation des CMLV, suite à une vasoconstriction, active les canaux K_{IR} qui renforcent l'hyperpolarisation (Figure 11) (Tykocki et al., 2017). Ces canaux présentent une sensibilité à la concentration K^+ extracellulaire. À l'augmentation de cette dernière, les canaux K_{IR} s'activent et contribuent à l'hyperpolarisation des CMLV des petites artères (edwards 1988, Knot 1996, quayle 1993). Comme les canaux K_v , l'activité des canaux K_{IR} peut être modulée par des agents vasoactifs. Les vasoconstricteurs comme l'AngII et l'ET-1 inhibent les canaux K_{IR} *via* la protéine kinase C (Park et al., 2006, 2005). Hein et al. ont montré que l'inhibition des canaux K_{IR} a réduit la vasodilatation induite par l'adénosine dans les artérioles cérébrales, indiquant leur implication dans ces effets vasodilatateurs (Hein et al., 2013). Ainsi, les canaux K_{IR} contribuent à la régulation du potentiel de membrane et leur activation participe à la relaxation des CMLV.

Au niveau des CE, les canaux K_{IR} ont été identifiés dans les artères de conductance (l'aorte, les artères pulmonaires) et de résistance (les MA, les artères crémastériques) (Fancher and Levitan, 2020; Nilius and Droogmans, 2001). Leur rôle a été suggéré dans la régulation du potentiel de membrane des CE (Nilius and

Droogmans, 2001). Récemment, Fancher et Levitan ont rapporté plusieurs études montrant que les forces de cisaillement activent les canaux K_{IR} des CE. Par ailleurs, l'extinction des canaux K_{IR} réduit la production du NO dans le MA de souris (Fancher and Levitan, 2020). Ainsi, ces canaux seraient non seulement un des composants de la mécanotransduction dans les CE en réponse au flux, mais aussi un acteur dans la voie vasodilatatrice du NO (Figure 11). Dans l'ensemble, les canaux K_{IR} des CE et des CMLV participent à la régulation de la vasomotricité et leur activation tend les artères à se dilater.

Les canaux K^+ sensibles à l'ATP

Les canaux K_{ATP} appartiennent à la famille des canaux K_{IR} . Ces canaux participent également au retour du potentiel de membrane au repos par l'entrée de K^+ . Les canaux K_{ATP} sont caractérisés par la diminution de leur activité lorsque le taux intracellulaire d'ATP augmente. Leur expression est décrite dans plusieurs types cellulaires, y compris les CE et les CMLV et ils participeraient à la régulation du tonus vasculaire (Foster and Coetzee, 2016; Jackson, 2005; Tykocki et al., 2017).

Au niveau des CMLV, l'activité des canaux K_{ATP} peut être influencée par les différentes substances vasoactives. Il s'est avéré que certains vasoconstricteurs comme l'AngII, l'ET-1, la sérotonine (5-HT) et la phényléphrine (Phe) inhibent les canaux K_{ATP} (Standen, 2003; Tykocki et al., 2017). L'AngII, à travers son récepteur AT1, inhibe d'une part l'adénylate cyclase réduisant l'activité de la PKA qui contribue à l'ouverture des canaux K_{ATP} (Hayabuchi et al., 2001a; Quayle et al., 1997). D'autre part, il active la PKC qui peut être responsable de l'internalisation des canaux (Hayabuchi et al., 2001a; Jiao et al., 2008). Le blocage des canaux K_{ATP} contribue à la dépolarisation membranaire, ce qui stimule les canaux Ca_v augmentant la $[Ca^{2+}]_i$ dans les CMVL, donc une vasoconstriction (Standen, 2003). *A contrario*, les substances vasodilatatrices telles que le CGRP et la PGI_2 sont décrites comme activatrices des canaux K_{ATP} par la signalisation AMPc-PKA (Tykocki et al., 2017). Ces molécules stimulent l'adénylate cyclase produisant l'AMPc, qui active à son tour la PKA. La PKA est connue pour activer les canaux K_{ATP} par phosphorylation (Quinn et al., 2004). L'ouverture de ces canaux contribue à l'hyperpolarisation membranaire des CMLV, aboutissant à la vasorelaxation. En outre, le NO semble également modifier l'activité des canaux. Dans les MA de rat et de lapin, il a été rapporté que l'hyperpolarisation des CMLV induite par le NO a nécessité l'ouverture des canaux K_{ATP} (Murphy and Brayden, 1995; Wu et al., 2004). Dans les myocytes vasculaires, la régulation des canaux K_{ATP} est très active pour le contrôle du tonus vasculaire soit dans un sens (fermeture - vasoconstriction) ou dans l'autre (ouverture - vasorelaxation) en fonction des substances vasoactives (Figure 11).

Bien que les canaux K_{ATP} vasculaires soient davantage décrits et étudiés au niveau des CMLV, leur expression a également été rapportée dans les CE, par exemple de MA, d'aorte et de microcirculation cérébrale et coronaire (Aziz et al., 2017; Jackson, 2005). L'activité des canaux K_{ATP} endothéliaux serait liée à la vasodilatation. Kuo et al. ont observé que l'adénosine favorise la DFD des artères coronaires et que ces effets sont supprimés par la désendothélialisation ou le glibenclamide, bloqueur des canaux K_{ATP} . Ils suggèrent donc que l'adénosine potentialise la FMD en faisant intervenir les canaux K_{ATP} endothéliaux (Kuo and Chancellor, 1995). Les résultats similaires ont été constatés chez les souris où les canaux K_{ATP} endothéliaux ont été génétiquement déplétés (Aziz et al., 2017). Les effets vasodilatateurs induits par l'adénosine étant supprimés par les inhibiteurs de la eNOS (Kuo and Chancellor, 1995; Leipert et al., 1992), le lien entre la production du NO et les canaux K_{ATP}

endothéliaux pourrait s'établir. Aziz et al. proposent que contrairement aux CMLV où l'entrée de Ca^{2+} se fait en grande partie par les canaux Ca_v , l'entrée de Ca^{2+} dans les CE se fait principalement par les canaux TRP et Piezo1. Donc, cette entrée ionique dépendrait plutôt du gradient électrochimique, ce qui expliquerait l'entrée de Ca^{2+} lors d'une hyperpolarisation (Aziz et al., 2018). En effet, ils ont démontré l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ par l'activation des canaux K_{ATP} (Aziz et al., 2017).

En somme, les canaux K_{ATP} des CE et des CMLV participent à la régulation du tonus vasculaire à travers l'homéostasie Ca^{2+} . Leur ouverture conduit à la vasodilatation à la fois par la hausse de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des CE et par l'hyperpolarisation des CMLV. En revanche, leur fermeture favorise la vasoconstriction par l'entrée de Ca^{2+} dans les CMLV.

2.4. Le canal Cl^- et les transporteurs ioniques des cellules vasculaires

En plus de canaux cationiques, d'autres acteurs peuvent intervenir dans la régulation du tonus vasculaire. C'est le cas des canaux Cl^- activés par le Ca^{2+} (Cl_{Ca}). En outre, les cotransporteurs ioniques actifs ou passifs comme la pompe Na^+/K^+ -ATPase et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) peuvent y contribuer.

Les canaux Cl^- activés par le Ca^{2+}

Les canaux Cl_{Ca} sont, comme leur nom l'indique, sensibles au Ca^{2+} , mais aussi à la variation du potentiel de membrane. La dépolarisation membranaire augmente leur sensibilité au Ca^{2+} (Pedemonte and Galletta, 2014). Ces canaux, exprimés de façon ubiquitaire dans de nombreux types cellulaires, sont également présents dans les CMLV des artères auriculaires, cérébrales, mésentériques, rétiniennes, pulmonaires et de muscle squelettique (Bulley and Jaggar, 2014; Hübner et al., 2015) et dans les CE des artères pulmonaires, mésentériques, de l'aorte et de la microcirculation cardiaque (Ma et al., 2017; Nilius et al., 1997; Nilius and Droogmans, 2002; Skofic Maurer et al., 2020; Wu et al., 2014; Yamamoto and Suzuki, 2007).

Au niveau des CMLV, il y a une accumulation intracellulaire de Cl^- grâce au cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (Chipperfield and Harper, 2000; Kitamura and Yamazaki, 2001). De ce fait, l'ouverture des canaux Cl_{Ca} entraîne la sortie de Cl^- et favorise la dépolarisation membranaire, donc une vasoconstriction dans ce type cellulaire (Dulin, 2020). En effet, une répression de l'expression des canaux Cl_{Ca} a entraîné une diminution de la dépolarisation membranaire en réponse à la noradrénaline dans les CMLV des MA de rat. De plus, cette répression a induit une réduction significative des effets contractiles de la noradrénaline dans les mêmes artères (Dam et al., 2014). Par ailleurs, les canaux Cl_{Ca} présenteraient une mécanosensibilité. Bulley et al. ont démontré que ces canaux sont activables par étirement membranaire induit par la pression dans les CMLV d'artères cérébrales de rat (Bulley and Jaggar, 2014), ce qui montre l'implication des canaux Cl_{Ca} dans le développement du TM. Plus récemment, il a été rapporté que l'inhibition des canaux Cl_{Ca} favorise la dilatation des artéioles en réponse à la pression, donc une perte du TM (Jackson, 2020). Au niveau des CMLV, l'activité des canaux Cl_{Ca} contribue à la dépolarisation membranaire provoquant une vasoconstriction et au développement du TM par leur propriété mécanosensible (Figure 8).

Les canaux Cl_{Ca} dans les CE sont plutôt étudiés dans le contexte de l'hypertension accompagnée d'une dysfonction endothéliale (Ma et al., 2017; Skofic Maurer et al., 2020). Par exemple, leur expression a augmenté

dans les CE d'artères pulmonaires provenant des patients souffrant d'une hypertension pulmonaire. Cette augmentation a bien entraîné une hausse d'activité, puisque les courants Cl_{Ca} ont également été accrus (Skofic Maurer et al., 2020). Les résultats similaires ont été observés dans les CE de veine ombilicale humaine (HUVEC) traitées à l'AngII mimant l'hypertension et dans l'endothélium de l'aorte de souris hypertendues par l'AngII (Ma et al., 2017). La surexpression ou l'extinction des canaux Cl_{Ca} endothéliaux chez les souris normotendues n'altère pas la fonction endothéliale. Cependant, dans un modèle d'hypertension, leur surexpression potentialise la dysfonction endothéliale et leur extinction la réduit (Ma et al., 2017). Par ailleurs, Goto et al. ont observé une dépolarisation rapide des MA induite par l'Ach uniquement chez les rats SHR et non chez les contrôles (Goto et al., 2007). D'après leur étude, cette dépolarisation serait responsable de l'altération de la voie vasodilatatrice de l'EDHF dans l'hypertension. Lorsque la dépolarisation est supprimée par les bloqueurs des canaux Cl_{Ca} , les auteurs suggèrent également l'implication des canaux dans ce processus pathologique (Goto et al., 2007).

En somme, l'activité des canaux Cl_{Ca} des CMLV contribue au développement du TM *via* leur participation à la dépolarisation membranaire. En revanche, les canaux Cl_{Ca} endothéliaux semblent jouer un rôle plutôt dans un contexte pathologique, comme l'HTA, en favorisant la dysfonction endothéliale.

La pompe Na^+/K^+ -ATPase

La pompe Na^+/K^+ -ATPase est capable d'échanger les ions Na^+ et K^+ contre leurs gradients de concentration respectifs grâce à une activité ATPasique. Elle induit la sortie de 3 ions Na^+ et l'entrée de 2 ions K^+ . Parmi ses 4 isoformes ($\alpha 1$ - $\alpha 4$), $\alpha 1$ présente une expression ubiquitaire, ce qui justifie son rôle rudimentaire dans le maintien de l'homéostasie ionique dans la cellule. Les autres isoformes ont une expression plutôt tissu-spécifique, nous laissant suggérer un rôle particulier (Clausen et al., 2017). Au sein du système vasculaire, en plus de l'isoforme $\alpha 1$, la pompe Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 2$ a été identifiée essentiellement dans les CMLV (Zhang et al., 2019) et jouerait un rôle dans la régulation du tonus vasculaire (Chen et al., 2015; Shelly et al., 2004; Zhang et al., 2005). Les souris transgéniques surexprimant la pompe Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 2$ dans les CML ont développé une PA plus basse que les contrôles. Cette baisse de la PA par rapport aux contrôles a également été observée lorsque ces souris transgéniques sont rendues hypertendues à l'AngII (Chen et al., 2015). À l'inverse, l'invalidation de l'expression d'*Atp1a2* a induit une augmentation de la PA chez les souris (Chen et al., 2015; Zhang et al., 2005). Par ailleurs, chez les souris *Atp1a2*^{-/-}, l'aorte a développé une contraction en réponse à l'U46619 plus rapide par rapport aux souris contrôles et une relaxation moins importante en réponse aux substances vasodilatatrices (l'Ach et le nitroprussiate de sodium) (Shelly et al., 2004). *Zhang et al.* ont obtenu des résultats similaires au niveau des MA. En effet, les MA des souris *Atp1a2*^{+/-} ont développé le TM plus important en réponse à la PA. De façon intéressante, l'inhibition de la pompe Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 2$ par l'ouabaine a également provoqué l'augmentation du TM, mais également la hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ des CMLV des MA (Zhang et al., 2005). Ainsi, la pompe Na^+/K^+ -ATPase, en particulier l'isoforme $\alpha 2$ contribuerait à la régulation du tonus vasculaire, en modulant l'homéostasie Na^+ et indirectement celle du Ca^{2+} (Figure 8).

Les échangeurs Na⁺/Ca²⁺

Les NCX sont des antiports perméables aux ions Na⁺ et Ca²⁺. Ils fonctionnent avec les gradients électrochimiques des ions Na⁺ et Ca²⁺. De plus, comme ils échangent 3 ions Na⁺ contre 1 ion Ca²⁺, les NCX ont un rôle électrogénique. Il existe 3 isoformes NCX1 à 3 codées par les gènes *SLC8A1-SLC8A3* et une isoforme mitochondriale nommée NCLX (*SLC8B1*). Les isoformes NCX2 et NCX3 sont exprimées au niveau des systèmes nerveux central et périphérique et dans les muscles squelettiques (Verkhatsky et al., 2018). Quant à NCX1, il a une expression ubiquitaire, mais son importance est particulièrement bien décrite dans le couplage excitation-contraction des cardiomyocytes (Shattock et al., 2015). Les NCX sont bidirectionnels et fonctionnent en 2 modes, à savoir, le mode de sortie de Ca²⁺ (sens) et d'entrée de Ca²⁺ (anti-sens). La sortie de Ca²⁺ est le mode prédominant des NCX pour l'homéostasie Ca²⁺ (Khananshvili, 2014; Zhang, 2013). Ces 2 modes de fonctionnement leur permet d'avoir un rôle majeur dans la régulation de la [Ca²⁺]_i. La présence de l'isoforme NCX1 est décrite dans les CMLV et les CE (Figure 8) (Santos-Gomes et al., 2022; Zhang, 2013).

Dans les CMLV, NCX1 a une localisation spécifique au niveau de la jonction membrane plasmique-réticulum sarcoplasmique, en colocalisation avec le canal TRPC6 (Khananshvili, 2014; Poburko et al., 2008; Zulian et al., 2010). Ceci pourrait indiquer un couplage entre le NCX1 et le canal TRPC6 contribuant à la restauration du stock interne Ca²⁺ sarcoplasmique où l'entrée de Ca²⁺ se ferait par le canal TRPC6 et NCX1 (mode d'entrée de Ca²⁺) (Poburko et al., 2008). En particulier, le rôle de NCX1 dans la régulation du tonus vasculaire a été mis en évidence. Dans les CMLV humaines, le niveau de phosphorylation des MLC qui est augmenté par l'AngII, retrouve son niveau basal en présence de KB-R7943, un antagoniste de référence des NCX (Alves-Lopes et al., 2020). Par ailleurs, chez les souris KO pour *Slc8a1* spécifique dans les CMLV, les MA développent un TM plus faible par rapport aux contrôles. De même, l'inhibiteur sélectif des NCX1, le SEA0400 entraîne aussi une baisse du TM. De plus, les MA prélevées sur des souris *Slc8a1*^{-/-} se contractent moins bien en comparaison à de MA issues de souris WT (Zhang et al., 2010). Ainsi, NCX1 des CMLV apparaît comme un acteur moléculaire modulant la [Ca²⁺]_i, impliquée dans le développement du TM des artères de résistance.

Les NCX des CE ont également été décrits comme étant impliqués dans la régulation du tonus vasculaire, en particulier dans la relaxation dépendante de l'endothélium. Cependant, il existe beaucoup moins d'études dans la littérature sur les NCX endothéliaux en comparaison avec les NCX des CMLV. Quelques études ont parfaitement démontré l'expression des NCX dans les CE artérielles (Kefaloyianni and Coetzee, 2011; Lillo et al., 2018; Mizuno et al., 2002; Teubl et al., 1999). Plus récemment, Lillo et al. (2018) ont pu prouver que l'isoforme de NCX1 était d'une part exprimée dans l'endothélium des MA, mais également colocalisée avec eNOS (Lillo et al., 2018; Teubl et al., 1999), suggérant une interaction probable entre ces deux protéines. En effet, les inhibiteurs de NCX réduisent la production du NO dans les CE d'aorte, d'artère pulmonaire et de MA (Lillo et al., 2018; Mizuno et al., 2002; Schneider et al., 2002; Teubl et al., 1999). De plus, les inhibiteurs de NCX réduisent également l'augmentation de la [Ca²⁺]_i induite par l'Ach dans les CE (Lillo et al., 2018), conduisant à une réduction de la vasorelaxation (Lillo et al., 2018; Schneider et al., 2002). Des résultats similaires ont été observés dans les CE, lorsque l'expression de NCX a été réprimée par les petits ARN interférants (Lillo et al., 2018). En plus de la voie du NO, Lillo et al. proposent la participation de NCX1 dans la voie de l'EDHF. Ils ont montré que l'hyperpolarisation membranaire des CE induite par l'Ach a été atténuée par le KB-R7943 (Lillo et al., 2018). Au niveau de l'endothélium, le NCX serait un acteur des voies de dilatation des artères de résistance.

Les NCX sont aussi impliqués dans des mécanismes physiopathologiques vasculaires, telle que l'HTA. Chez les rats hypertendus, le niveau de l'expression de NCX1 dans les MA a fortement augmenté. De plus, le signal Ca^{2+} en réponse à l'Ach est accentué dans les CMLV des MA de souris hypertendues par rapport aux contrôles (Zulian et al., 2010). Il a été rapporté que l'entrée de Ca^{2+} induite par l'AngII est plus importante dans les cellules provenant des individus hypertendus que celle de contrôles, et cette augmentation a été réduite par le KB-R7943 (Alves-Lopes et al., 2020). Ces résultats pourraient indiquer que les NCX des CMLV sont impliqués dans l'augmentation de la contractilité des artères en cas d'HTA.

En somme, NCX1 participe à la régulation du tonus vasculaire avec des actions opposées, selon sa localisation endothéliale ou dans la CMLV. Si le NCX1 endothélial contribue à la dilatation des artères en réponse à des substances vasorelaxantes, dans la musculature vasculaire, il participe au développement du TM. Par ailleurs, en cas d'HTA, il participerait au processus pathologique en renforçant la contractilité artérielle.

3. Les canaux Na_v dans la fonction vasculaire

J'ai précédemment développé le fait que le Ca^{2+} est un 2nd messenger crucial dans le contrôle du tonus vasculaire et que sa concentration intracellulaire est finement régulée par de nombreux acteurs. Cette régulation se fait à travers le mouvement d'autres ions de part et d'autre de la membrane, en particulier, le Na^+ . À travers des canaux et échangeurs perméables au Na^+ tels que les canaux TRP, les Piezo, la pompe Na^+/K^+ -ATPase et les NCX, l'importance du Na^+ a fréquemment été évoquée. En plus de ces acteurs, les canaux Na^+ dépendant du potentiel (Na_v) ont été retrouvés dans les vaisseaux sanguins, notamment les artères de résistance. Dans cette partie, les connaissances actuelles sur la place des canaux Na_v dans la fonction vasculaire physiologique et pathologique seront décrites.

3.1. Les généralités des canaux Na_v

Les canaux Na_v sont des glycoprotéines hétéromultimériques perméables aux Na^+ . L'ouverture de ces canaux permet aux ions Na^+ de traverser la membrane en fonction du gradient électrochimique du Na^+ (ici l'entrée de Na^+). L'activité des canaux Na_v est dépendante du potentiel de membrane et permet la genèse et la propagation du potentiel d'action (PoA) dans les cellules excitables comme les neurones, les cellules musculaires et les cardiomyocytes. Le PoA est un signal électrique unidirectionnel permettant, en fonction du territoire, la propagation des messages nerveux, la libération de substance ou la contraction musculaire. Ce PoA est un changement transitoire du potentiel de membrane composé de quatre phases successives : 1) la dépolarisation, 2) la repolarisation, 3) l'hyperpolarisation et 4) le retour au potentiel de membrane au repos (Figure 12.A). Ces différentes phases sont dues à l'activité de deux canaux principaux : les canaux Na_v et les canaux K_v . Dans un premier temps, la dépolarisation membranaire entraîne une ouverture rapide de la porte d'activation des canaux Na_v . L'entrée massive de Na^+ induit la première phase du PoA. Ensuite, les canaux Na_v deviennent inactifs par la fermeture rapide de la porte d'inactivation et les canaux K_v s'ouvrent dans le même temps. L'arrêt de l'entrée de Na^+ et l'efflux de K^+ sont responsables de la phase de repolarisation du PoA. La fermeture lente des canaux K_v entraîne l'hyperpolarisation post-PoA, puis le retour progressif du potentiel de membrane au repos, et les canaux Na_v retrouvent leur état fermé réactivable (Barnett and Larkman, 2007) (Figure 12).

Les canaux Na_v ont la particularité d'avoir deux portes structurelles et fonctionnelles : la porte d'activation et la porte d'inactivation. Ceci leur permet d'avoir trois conformations : 1) ouvert, 2) inactivé et 3) fermé (Figure 12.B). Au repos, le canal se trouve à l'état fermé où seule la porte d'activation est fermée. Lors d'une dépolarisation membranaire, le canal s'active par l'ouverture de la porte d'activation pour laisser passer les ions Na^+ . Après quelques millisecondes, la porte d'inactivation se ferme et le canal passe à l'état inactivé. L'inactivation rapide est l'une des caractéristiques des canaux Na_v . Ensuite, la porte d'activation se ferme et la porte d'inactivation s'ouvre afin de rendre le canal réactivable. Cette réactivation permet de préparer le canal pour une prochaine dépolarisation (Figure 12.B).

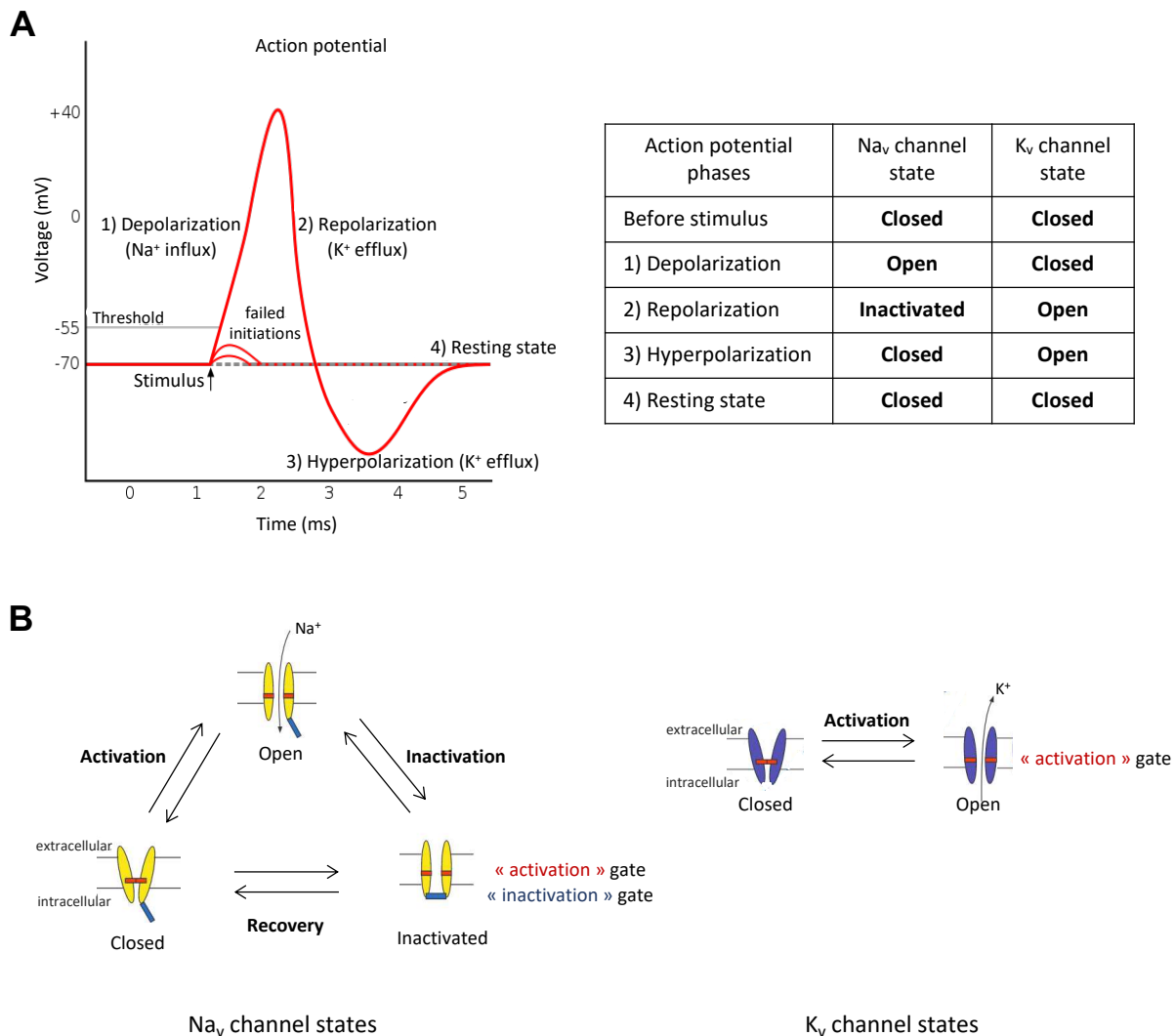


Figure 12 : Présentation du potentiel d'action

(A) Le diagramme représente l'allure du potentiel d'action. Le tableau récapitule l'état des canaux Na_v et des canaux K_v responsables des différentes phases du potentiel d'action. (B) Les schémas illustrent les états des canaux Na_v (gauche) et des canaux K_v (droite). La porte d'inactivation des canaux Na_v leur permet d'avoir 3 configurations : fermé, ouvert et inactivé. Les canaux K_v sont à l'état fermé ou ouvert en fonction de la variation du potentiel de membrane. L'ouverture des canaux Na_v entraîne l'entrée de Na^+ , pendant que l'activation des canaux K_v fait sortir du K^+ de la cellule. Adapté à partir de Barnett and Larkman 2007.

3.1.1. La structure des canaux Nav

Les canaux Nav sont structurellement composés de deux sous-unités, à savoir une sous-unité principale de 260 kDa, dite alpha (SU α) et une sous-unité auxiliaire de 30 à 40 kDa, nommée beta (SU β) (Catterall et al., 2020). **La SU α** constitue le pore et représente la partie fonctionnelle du canal. Elle est composée de quatre domaines homologues (I à IV) (Figure 13). Chaque domaine est constitué de six segments transmembranaires (S1 à S6) organisés en hélice α . Le S4 se comporte comme un senseur du potentiel grâce aux acides aminés chargés positivement. Lors d'une dépolarisation membranaire, le S4 entraîne un changement conformationnel du canal puis son ouverture. Les S5 et S6 de chaque domaine sont reliés par la boucle P, possédant quatre acides aminés à motif DEKA (Asp-Glu-Lys-Ala). Celle-ci forme le filtre de sélectivité pour les ions Na⁺ à l'extrémité extracellulaire du pore. Entre le S6 du domaine III et le segment S1 du domaine IV, la boucle intracellulaire avec le motif IFM (Ile-Phe-Met) constitue la porte d'inactivation, permettant de bloquer l'influx Na⁺ très rapidement, en quelques millisecondes, avant la fermeture du canal. Les parties N-terminale et C-terminale du canal sont situées dans le compartiment intracellulaire (Yu and Catterall, 2003). La SU α est codée par 9 gènes chez les mammifères : *SCN1A* à *SCN5A* et *SCN8A* à *SCN11A*, ce qui définit les neuf isoformes du canal (Nav1.1 à Nav1.9). Ces neuf isoformes peuvent être catégorisées en deux types selon leur sensibilité au bloqueur spécifique, la tétrodotoxine (TTX). Les isoformes Nav1.1 à Nav1.4, Nav1.6 et Nav1.7 sont sensibles à la TTX (TTX-S, IC₅₀ environ 1-30nM), tandis que Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9 sont résistants (TTX-R, IC₅₀ environ 1-60 μ M) (Catterall et al., 2005) (Tableau 2). Ces neuf isoformes des canaux Nav ont une expression tissu-spécifique, qui sera développée ultérieurement.

La SU β est une glycoprotéine transmembranaire unique avec un petit domaine C-terminal intracellulaire et un domaine N-terminal extracellulaire de type immunoglobuline (Ig-like domaine) (Figure 13). L'Ig-like domaine de la partie N-terminale permet à la SU β de se comporter comme une molécule d'adhésion cellulaire. Sa capacité d'adhésion est cruciale dans le développement neuronal, le processus d'excroissance des neurites et la migration cellulaire à travers l'interaction avec les cytosquelettes et la matrice extracellulaire (Chahine and O'Leary, 2011; O'Malley and Isom, 2015). Étant associée à la SU α , la SU β est capable de moduler les propriétés biophysiques du canal comme la cinétique d'activation et la dépendance au potentiel. Elle régule également l'adressage du canal à la membrane (Catterall et al., 2020). Cette sous-unité auxiliaire est codée par 4 gènes : *SCN1B* à *SCN4B* (β 1 à β 4). β 1 et β 3 partagent 57% de séquence homologue et s'associent de façon non covalente avec la SU α . En revanche, β 2 et β 4 forment une interaction covalente avec la sous-unité principale par des ponts disulfures. Ainsi, l'assemblage d'une SU α et d'une ou deux SU β forme les canaux Nav.

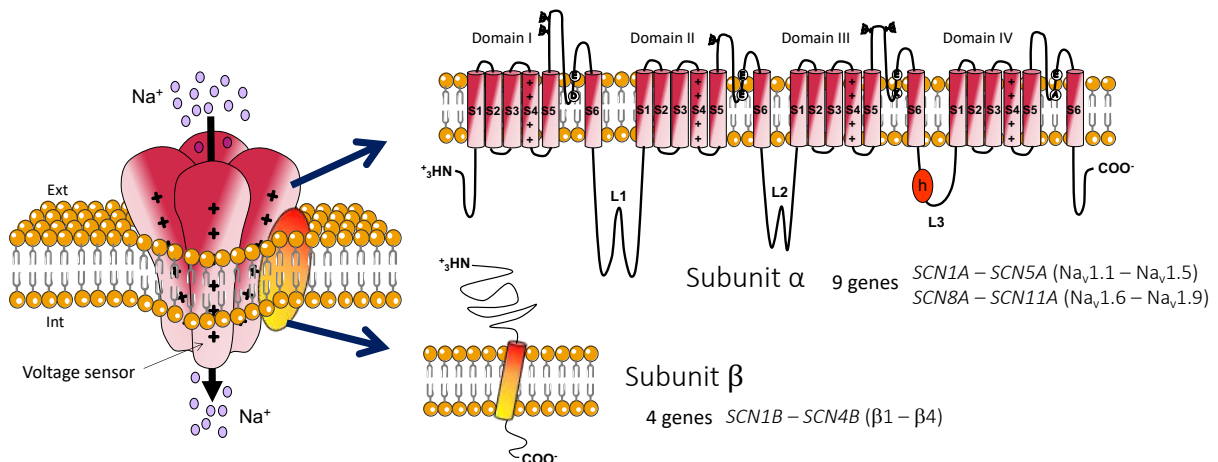


Figure 13 : Structure du canal Na_v

Le schéma illustre la structure du canal Na_v transmembranaire (gauche) et la structure primaire des deux SU α et β (droite). Les cylindres représentent les segments en hélice α. Les traits noirs reliant les cylindres sont les chaînes polypeptidiques. La SU α du canal Na_v est constituée de quatre domaines composés de six segments. Le S4 de tous les domaines est le senseur du potentiel. Les quatre boucles P situées entre les S5 et S6 de chaque domaine de la SU α comportent le motif DEKA et forment la porte d'activation du canal. La boucle intracellulaire L3 ayant le motif IFM (cercle h) constitue la porte d'inactivation. La SU β du canal est composée d'une seule glycoprotéine transmembranaire. Le domaine N-terminal extracellulaire de la SU β est de type immunoglobuline (Ig-like domain). Modifié à partir de la revue en préparation.

3.1.2. La pharmacologie des canaux Na_v

L'activité des canaux Na_v peut être régulée par un grand nombre de molécules naturelles ou synthétiques. En effet, plusieurs toxines produites par les animaux venimeux et les plantes vénéneuses agissent sur l'activité des canaux Na_v. Certains médicaments mis sur le marché ciblent aussi les canaux.

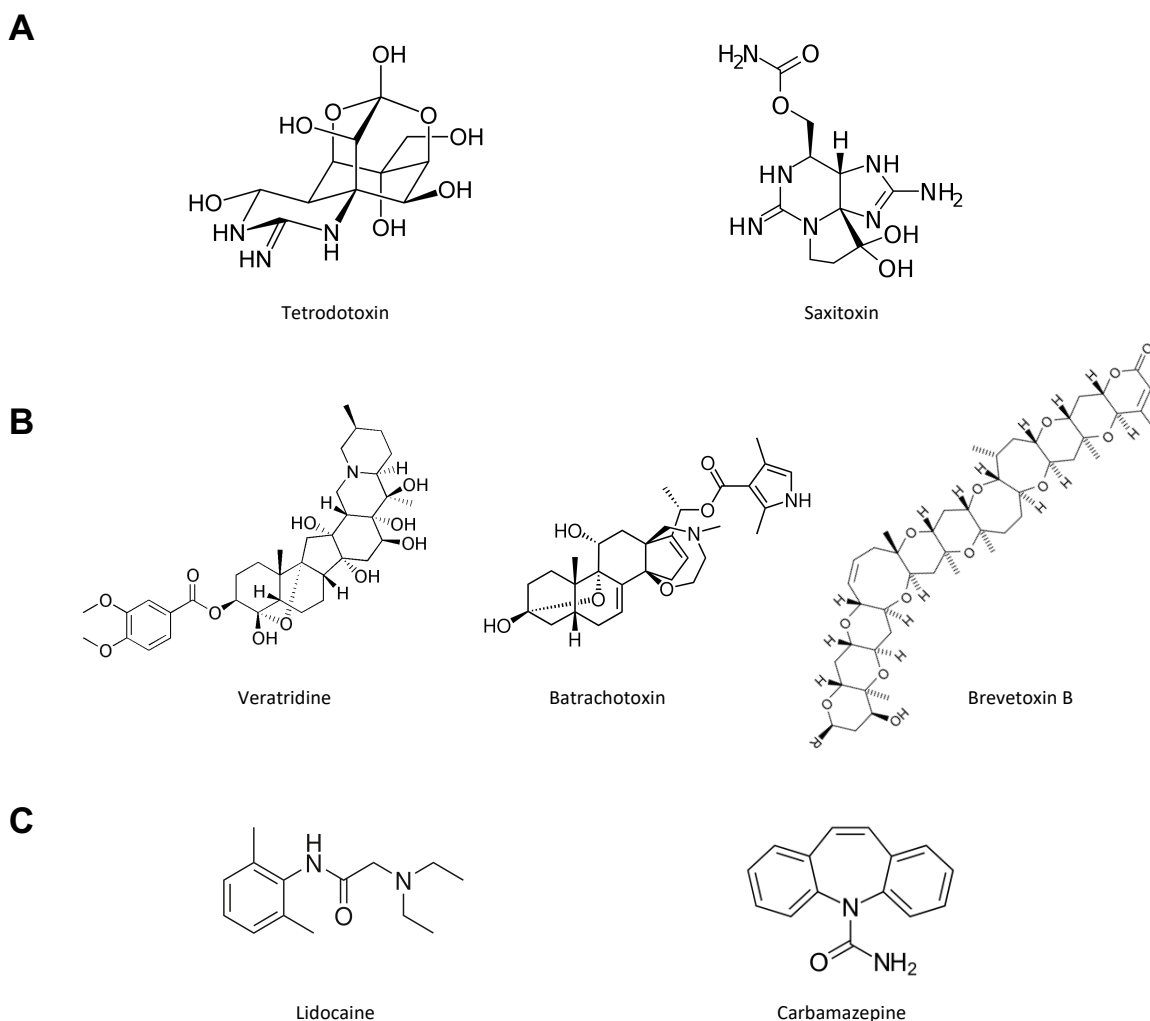


Figure 14 : Structures chimiques des molécules ciblant les canaux Na_v

La structure chimique des bloqueurs (A), des activateurs (B) et des médicaments (C) interagissant avec les canaux Na_v .

Les bloqueurs des canaux Na_v

La TTX est une neurotoxine alcaloïde non peptidique connue à l'origine pour son intoxication chez l'Homme lors d'une mauvaise consommation des poissons-globes, qui contiennent la toxine dans de multiples organes. La TTX se trouve également dans d'autres espèces marines telles que les poissons porc-épic, les poules à anneaux bleus et certains vers, coquillages, crustacés, ou encore dans certains amphibiens (Miyazawa and Noguchi, 2001). Certaines bactéries sont aussi capables de produire la TTX (Do et al., 1990). Comme indiqué précédemment, la TTX est le bloqueur de référence présentant une grande spécificité aux canaux Na_v et permettant de discriminer les neuf isoformes en fonction de leur sensibilité.

La saxitoxine, comme la TTX, est une neurotoxine de type alcaloïdes d'origine marine. Elle est principalement produite par des algues dinoflagellées unicellulaires, mais également par des cyanobactéries d'eau douce (Llewellyn, 2006). Elle est connue pour une des principales causes de l'intoxication paralytique par les mollusques et les crustacés, pouvant être mortelle à forte dose. Les canaux Na_v présentent une sensibilité à la saxitoxine. Cependant, contrairement à la TTX, les canaux Na_v ne sont pas leurs seules cibles. La toxine peut aussi agir avec les canaux K^+ et les canaux Ca_v de type-L (Llewellyn, 2006).

La TTX et la saxitoxine ont toutes les deux une structure chimique à base de guanidinium et possèdent une activité fonctionnelle semblable (Figure 14.A). Sur le canal Na_v , le site de liaison du guanidinium est situé au niveau de la boucle P formant le pore du canal, nommé le site 1 (Figure 15). Les groupes chargés positivement de guanidinium interagissent avec les groupes carboxylates chargés négativement de la boucle. La molécule forme une sorte de bouchon bloquant complètement le passage de Na^+ à travers le canal. Les deux toxines se comportent donc comme un bloqueur des canaux.

Les activateurs des canaux Na_v

La vétratridine (VTD) est une neurotoxine alcaloïde stéroïdienne non peptidique, d'origine végétale (Figure 14.B). Elle est extraite à partir des plantes du genre *Veratrum* (Schep et al., 2006; Seale and McDougal, 2022). Lors d'une intoxication de ces plantes, la VTD fait partie des principaux éléments responsables des effets toxiques gastro-intestinaux tels que les nausées et les vomissements, mais également des effets cardiotoxiques provoquant la bradycardie et l'hypotension systémique (Schep et al., 2006).

La batrachotoxine (BTX) est une autre neurotoxine alcaloïde stéroïdienne non peptidique (Figure 14.B). Comme son nom l'indique, elle a été isolée des amphibiens (anciennement appelés batraciens) du genre *Phyllobates* se trouvant en Amérique du Sud (Daly et al., 1965). La BTX est peu connue pour l'empoisonnement chez l'Homme. En revanche, certaines tribus d'Amérique du Sud l'utilisaient pour fabriquer des dars dans le but de chasser les animaux (de Lera Ruiz and Kraus, 2015).

Par la similitude de la structure chimique, la VTD et la BTX partagent le même site de fixation sur le canal Na^+ . Elles interagissent avec le S6 du domaine I et du domaine IV, au niveau de l'intérieur du pore (site 2) (Figure 15) et leur fixation est facilitée à l'état ouvert du canal (de Lera Ruiz and Kraus, 2015). En cas de fixation, les

toxines entraînent une hyperpolarisation du seuil d'activation, augmentent la perméabilité des canaux aux Na^+ et bloquent l'inactivation, ce qui prolonge l'ouverture et rehausse la conductance Na^+ du canal (Wang and Wang, 2003). Elles ont donc été identifiées comme des activateurs des canaux Na_v . En revanche, la VTD est considérée comme un activateur partiel, alors que la BTX est reconnue comme un activateur total. La conductance Na^+ provoquée par la VTD est environ la moitié de celle par la BTX (Garber and Miller, 1987). La BTX présente une meilleure affinité que la VTD. Par ailleurs, l'inactivation est quasi totalement bloquée par la BTX, tandis que le blocage de l'inactivation par la VTD est incomplète (Wang and Wang, 2003). Cependant, la BTX se fixe de façon irréversible au canal, pendant que la fixation de la VTD est réversible (Ulbricht, 1998).

La brevétotoxine (PbTX) est une neurotoxine polyéther non peptidique, produite par des microalgues dinoflagellées se trouvant dans des régions tropicales et subtropicales du bassin indo-pacifique (Figure 14.B). La PbTx est connue pour être responsable des marées rouges des côtes de la Floride et du golfe du Mexique (de Lera Ruiz and Kraus, 2015). Par ailleurs, elle est une des causes principales de la mortalité massive des oiseaux et des espèces marines. La toxine peut être accumulée dans les tissus des poissons et dans les mollusques. La consommation des produits de la mer contaminés provoque une intoxication humaine entraînant une dysesthésie (Friedman et al., 2008). La PbTX interagit avec le site 5 du canal situé sur le S6 du domaine I et le S5 du domaine IV (Figure 15) (de Lera Ruiz and Kraus, 2015). Les effets de la PbTX sont similaires à ceux de la VTD et de la BTX. Sa fixation conduit au déplacement du seuil d'activation vers le potentiel plus négatif et à l'inhibition de l'inactivation (Stevens et al., 2011; Wang and Wang, 2003). Elle est donc considérée comme un activateur du canal.

En outre des toxines citées, il existe encore de multiples toxines d'origine naturelle interagissant avec les six sites de fixation des canaux Na_v . Une espèce peut produire plusieurs toxines ayant des sites de fixation multiples avec des effets différents (Figure 15). Deux revues scientifiques ont bien développé et présenté les différentes toxines naturelles (de Lera Ruiz and Kraus, 2015; Mattei and Legros, 2014). Brièvement, par exemple, certaines conotoxines extraites de cône peuvent avoir une forme δ se fixant sur le site 6 et potentialisant l'activité du canal. La forme μ se lie sur le site 1 et provoque le blocage. Les scorpions sont également capables de produire des toxines peptidiques, dont l'une se fixe sur le site 3 (toxine de scorpion- α) et l'autre se lie sur le site 4 (toxine de scorpion- β). Quelle que soit la forme, les deux toxines favorisent l'activité du canal. Dans le venin des mygales, les molécules toxiques interagissent avec le site 4. Cependant, contrairement à la toxine des scorpions, les toxines de mygales inhibent l'activité du canal. La ciguatoxine responsable de la maladie alimentaire Ciguatera, est extraite de microalgues dinoflagellées. Elle a des effets similaires à ceux de la PbTX. Ainsi, plusieurs animaux possèdent des venins dont les molécules ciblent les canaux Na_v . En raison d'une grande expression des canaux Na_v dans le système nerveux et de leur rôle dans l'influx nerveux, de multiples organismes venimeux ciblent ces canaux pour neutraliser les proies ou pour se protéger des prédateurs.

Les médicaments ciblant les canaux Na_v

Les canaux Na_v ont une distribution tissulaire très large chez l'Homme (Cf. partie 3.1.3 distribution tissulaire des canaux Na_v). Chaque isoforme possède une ou des fonctions spécifiques en fonction de leur localisation tissulaire et leur dysfonction peut être responsable de pathologies. De ce fait, ils sont la cible de

certaines médicaments mis sur le marché (Figure 14.C). Par exemple, les anti-arythmiques de classe I (quinidine, flécaïnide, lidocaïne, etc.), les anesthésiques locaux (lidocaïne, benzocaïne, etc.) et certains anti-épileptiques (carbamazépine, lamotrigine, etc.) interagissent avec les canaux Na_v cardiaques et/ou du système nerveux afin de prévenir les arythmies, les douleurs et les crises épileptiques, respectivement (Catterall and Swanson, 2015; de Lera Ruiz and Kraus, 2015). Ces médicaments se fixent dans la cavité centrale du pore au niveau du S6 des domaines I, III et IV (site LA) (Figure 15). Cette fixation diminue la conductance Na^+ et stabilise les canaux à l'état inactivé (Körner et al., 2022; Wisedchaisri and Gamal El-Din, 2022). Bien qu'ils partagent le même site de fixation, ces molécules ne nécessitent pas la même conformation du canal pour pouvoir se fixer. Par exemple, la quinidine (anti-arythmique) peut se lier uniquement à l'état ouvert du canal en passant par la porte d'activation depuis le milieu intracellulaire. L'effet inhibiteur de la molécule augmente donc avec la stimulation des canaux Na_v . En revanche, la lidocaïne (anti-arythmique et anesthésique local) ne nécessite pas l'ouverture du canal et peut se fixer même à l'état fermé ou inactivé. Elle pénètre dans la cavité centrale par une fenestration latérale du canal en passant par la phase lipidique de la membrane plasmique. Ces différentes possibilités de liaison proviendraient de la propriété chimique des molécules (hydrophile vs hydrophobe) (Courtney, 1975; Hille, 1977; Körner et al., 2022; Wisedchaisri and Gamal El-Din, 2022).

La dysfonction des canaux Na_v pouvant être responsable de d'autres pathologies, en particulier les troubles de la douleur (Cheng et al., 2021), les molécules synthétiques ciblant les canaux sont en projet de recherche pour en faire des traitements. Par exemple, une équipe du laboratoire Pfizer a développé la molécule PF-01247324 ciblant $\text{Na}_v1.8$. Elle a montré les effets favorables contre la douleur inflammatoire et neuropathique chez le rat (Payne et al., 2015). *Goldberg et al.* ont rapporté que la molécule XEN402 ciblant $\text{Na}_v1.7$ a permis d'atténuer la douleur liée à l'érythromélgie héréditaire dans les essais cliniques (Goldberg et al., 2012). Plusieurs laboratoires pharmaceutiques tentent de développer les molécules synthétiques inhibant les canaux Na_v (Bagal et al., 2014; de Lera Ruiz and Kraus, 2015). Cependant, à cause de la complexité structurale et le degré d'homologie important des 9 isoformes, la sélectivité de la molécule reste un grand défi.

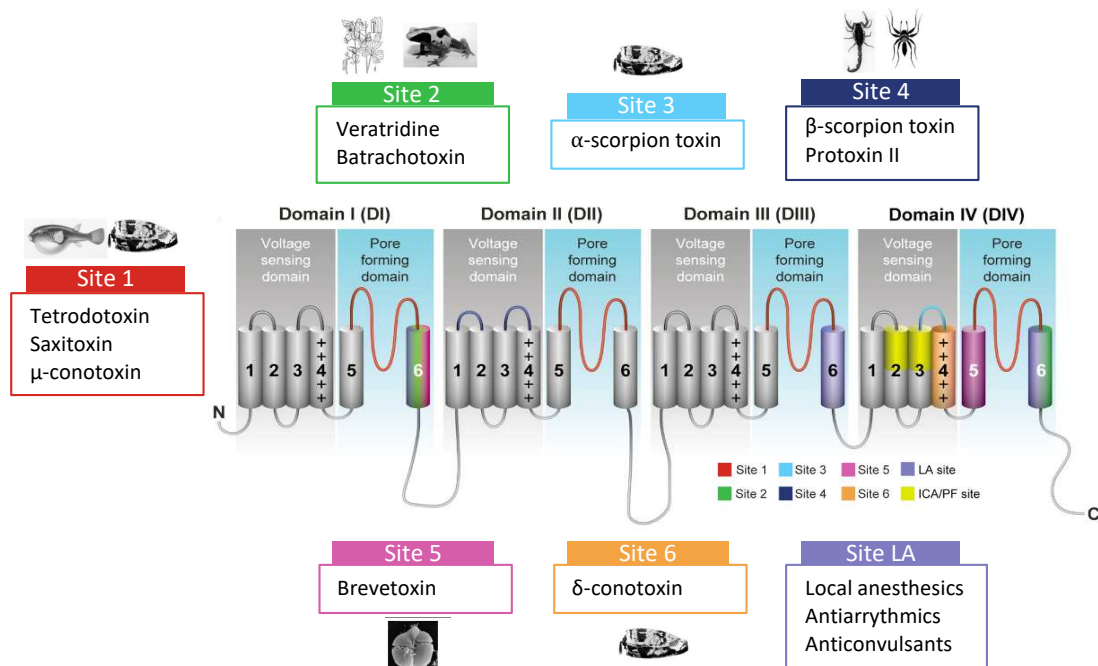


Figure 15 : Sites de fixation des toxines sur le canal Na_v

Le canal Na_v présente six sites de fixation des toxines naturelles (site 1-6) et le site des anesthésiques locaux (site LA). Le site 1 (rouge) est formé par les quatre boucles P où les bloqueurs des Na_v se fixent. Les activateurs des canaux Na_v se fixent sur le site 2 (vert) constitué du S6 des DI et DIV. La toxine de scorpion α interagit avec la boucle extracellulaire entre S3 et S4 du DIV (site 3, bleu ciel). Les boucles extracellulaires entre S1-S2 et S3-S4 du DII forment le site 4 (bleu foncé). La brévétotoxine se fixe sur le site 5 (rose) composé du S6 du D1 et du S5 de DIV. La conotoxine- δ interagit avec le S4 du DIV formant le site 6 (orange). Les médicaments ciblant les canaux Na_v se fixent sur le site d'anesthésiques locaux (LA, violet). Adapté à partir de Mattei et al. 2014, De Iera Ruiz et al. 2015.

3.1.3. La distribution tissulaire des canaux Na_v et leurs fonctions

Les canaux Na_v des cellules excitables

Historiquement, les canaux Na_v ont été découverts par la détection des courants Na^+ dépendants du potentiel enregistrés dans les axones de calamar géant (Hodgkin and Huxley, 1952, p. 195). L'expression des canaux Na_v et leur fonction ont d'abord été étudiées au niveau des cellules excitables.

Parmi les 9 isoformes des canaux Na_v , $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ et $Na_v1.6$ sont les formes principales du système nerveux central. **$Na_v1.1$** se trouve en particulier dans les neurones de type GABAergique, permettant de réguler l'activité cérébrale par la sécrétion de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), le principal neurotransmetteur inhibiteur. La mutation du gène *SCN1A* est une des causes majeures du syndrome de Dravet, une forme d'épilepsie sévère chez l'enfant. Cette mutation a également été identifiée chez les patients souffrant d'épilepsie généralisée accompagnée de fièvre et des crises myocloniques de courte durée (de Lera Ruiz and Kraus, 2015). Comme $Na_v1.1$, l'isoforme **$Na_v1.2$** est préférentiellement exprimée dans les neurones GABAergiques. Elle est également abondamment présente au niveau des nœuds de Ranvier dans le cortex et l'hippocampe durant le développement embryonnaire et néonatal, qui sera ensuite remplacée par $Na_v1.6$. $Na_v1.2$ joue donc un rôle important dans l'excitabilité neuronale (Wood and Iseppon, 2018). Sa mutation provoquant un gain de fonction cause une forme d'épilepsie moins sévère comparée à la mutation de $Na_v1.1$. Elle peut entraîner un syndrome épileptique léger comme des convulsions néonatales bénignes, qui répond de façon favorable aux médicaments (Catterall, 2014). La perte de fonction de $Na_v1.2$ par mutation entraîne d'autres troubles neurologiques comme une déficience intellectuelle ou trouble du spectre de l'autisme (Sanders et al., 2018). Quant à **$Na_v1.3$** , il est abondamment exprimé dans le cerveau durant le développement fœtal, mais son expression diminue considérablement après la naissance. Dans le cerveau adulte, seulement une quantité très faible de $Na_v1.3$ est détectée (Smith et al., 2018). Il fait donc partie des isoformes essentielles dans le développement cérébral prénatal. En raison de son expression cérébrale, sa mutation entraîne également une épilepsie comme celle de $Na_v1.1$ et $Na_v1.2$, avec une malformation du cortex. Dans ce contexte, cette pathologie est liée au gain de fonction de $Na_v1.3$ avec une augmentation de courant Na^+ continu et une inactivation lente (Liao et al., 2022). Malgré son faible taux d'expression chez l'adulte, $Na_v1.3$ peut augmenter en cas de lésion nerveuse. Par exemple, en cas de lésion des ganglions de la racine dorsale de la moëlle épinière (DRG) chez les rats, la quantité de transcrit *Scn3a* a augmenté à cet endroit (Yin et al., 2016). Cette hausse pourrait entraîner une hyperexcitabilité des neurones, causant une douleur neuropathique. Enfin, l'isoforme **$Na_v1.6$** est l'un des canaux Na_v les plus exprimés du cerveau adulte humain. Il est principalement localisé au niveau du segment initial de l'axone et des nœuds de Ranvier des

neurones myélinisés, assurant l'influx nerveux (Talwar and Hammer, 2021). Comme les précédents, sa mutation est également une des causes des encéphalopathies épileptiques infantiles. Chez les patients, l'ouverture prématurée et l'inactivation altérée de $Na_v1.6$ ont été identifiées. En revanche, la mutation menant à une perte de fonction se trouve plutôt chez les gens développant une déficience intellectuelle ou un trouble du spectre de l'autisme (Meisler et al., 2021).

Les isoformes $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ sont considérées comme celles du système nerveux périphérique. Ils sont exprimés abondamment en particulier dans les neurones des DRG et important dans la nociception et dans la douleur inflammatoire (Emery et al., 2016). En effet, la mutation de **$Na_v1.7$** a été identifiée chez les patients souffrant d'érythromélgie héréditaire, qui est une maladie chronique inflammatoire accompagnée de crises de douleur brûlant souvent dans les extrémités (Yang et al., 2004). Une autre forme de mutation de $Na_v1.7$ a été rapportée dans le syndrome de douleur extrême paroxystique. Ce syndrome est caractérisé par les douleurs péri-rectales sévères chez les enfants, qui évoluent aux douleurs péri-oculaires et péri-mandibulaires (Fertleman et al., 2006). Ces maladies génétiques sont dues au gain de fonction de $Na_v1.7$ améliorant l'activation (cas d'érythromélgie) ou altérant l'inactivation (cas de syndrome de douleur extrême paroxystique) (Estacion et al., 2008). Tandis que le gain de fonction entraîne des douleurs neuropathiques, la perte de fonction de $Na_v1.7$ provoque une forme d'insensibilité à la douleur. Étonnamment, ces sujets ne ressentent pas de douleur lors d'une fracture, d'une brûlure, d'une extraction dentaire ou encore durant l'accouchement (Waxman, 2013). Quant à **$Na_v1.8$** , il est préférentiellement exprimé dans les neurones sensoriels nociceptifs. Il joue un rôle important dans la perception de la douleur à basse température inférieure à 10°C. D'après la littérature, son mauvais fonctionnement est également une des causes des douleurs inflammatoires et neuropathiques. Un gain de fonction de $Na_v1.8$ a été détecté chez certains patients développant des douleurs neuropathiques idiopathiques sans la mutation de $Na_v1.7$ (Faber et al., 2012). Outre sa fonction dans la nociception, $Na_v1.8$ a également été décrite au niveau des neurones intracardiaques, sans être présent dans les cardiomyocytes (Emery et al., 2016). D'après Verkerk et al., ce $Na_v1.8$ est fonctionnel et régule le motif de la fréquence des PoA des interneurones cardiaques isolées de souris. Ils supposent donc son rôle dans le contrôle de l'activité électrophysiologique cardiaque (Verkerk et al., 2012). Enfin, comme les deux autres isoformes, **$Na_v1.9$** est abondamment exprimée dans les neurones des DRG, les nocicepteurs mais aussi dans les neurones sensoriels entériques (Rugiero et al., 2003). Par ailleurs, il a des caractéristiques biophysiques distinctes. Il est capable de s'activer à un potentiel plus hyperpolarisant par rapport aux autres canaux Na_v neuronaux. Il a également une cinétique très lente d'inactivation et entraîne un courant Na^+ persistant. Ces propriétés biophysiques lui permettent d'avoir un courant de fenêtre très large (un intervalle de potentiel où les canaux peuvent s'ouvrir) (Dib-Hajj et al., 2015; Wood and Iseppon, 2018). $Na_v1.9$ est donc suggéré comme un canal de seuil. En effet, il prolonge la réponse dépolarisante afin de déclencher le PoA en réponse à des stimuli inférieurs au seuil et augmente la fréquence du PoA (Dib-Hajj et al., 2015). Son implication dans les douleurs inflammatoires est également relevée par la genèse d'hyperalgésie (Wood and Iseppon, 2018). Par ailleurs, les mutations de *SCN11A* se trouvent chez les patients souffrant de douleurs neuropathiques. Un abaissement de seuil d'activation augmentant l'excitabilité neuronale nociceptive a été observé (Huang et al., 2014).

En dehors du système nerveux, les canaux Na_v sont présents dans d'autres types de cellules excitables comme les cellules musculaires. Par exemple, **$Na_v1.4$** est reconnue en tant qu'une isoforme des muscles squelettiques. La genèse et la propagation de PoA par $Na_v1.4$ initient donc la contraction musculaire squelettique

et la mutation du canal provoque des troubles de ces muscles. La mutation causant un gain de fonction est responsable de la paramyotonie congénitale, caractérisée par la rigidité et contraction musculaire involontaire du visage et des membres suite à des efforts musculaires volontaires (Cannon, 2018). La paralysie périodique hyperkaliémique est également une des canalopathies de $\text{Na}_v1.4$. Elle est caractérisée par le taux élevé de K^+ sérique (supérieur à 5 mM) durant les épisodes paralytiques. Les patients de cette paralysie peut avoir une myotonie après un épisode de faiblesse musculaire (Cannon, 2018). D'un point de vue électrophysiologique, les deux canalopathies précédentes sont dues à un défaut d'inactivation (Hayward et al., 1997) ou à une activation accrue (Cummins et al., 1993), qui augmentent par conséquent le flux Na^+ . En cas de myotonie, une salve de PoA dans les myocytes serait responsable de contraction accentuée, pendant que la paralysie serait provoquée par une inactivation maintenue des canaux Na_v due à une dépolarisation membranaire anormalement stable, ce qui rend les fibres musculaires inexcitables (Cannon et al., 1993). La perte de fonction de $\text{Na}_v1.4$ peut engendrer d'autres canalopathies musculaires telles que les syndromes myasthéniques congénitaux et la myopathie congénitale. Dans les cas sévères, elle peut entraîner la mort du fœtus. Autrement, les enfants naissent avec un tonus musculaire affaibli mais tout en gardant la capacité à se déplacer indépendamment. Les patients souffrant de la myopathie congénitale développent la fatigue musculaire très rapidement avec les épisodes de faiblesse. Chez ces patients, la mutation de $\text{Na}_v1.4$ a entraîné une augmentation du seuil d'activation de $\text{Na}_v1.4$, une réduction importante de la densité de courant Na^+ ou une absence de courant Na^+ (Zaharieva et al., 2015).

Quant au sous-type **$\text{Na}_v1.5$** , il est le principal du cœur et génère la majorité du courant Na^+ des cardiomyocytes. Sa place est donc cruciale dans l'excitabilité et la conduction cardiaque. Du fait de cette importance, sa mutation est critique pour le bon fonctionnement cardiaque. En effet, elle peut être responsable d'arythmie ou de cardiomyopathie (Wilde et al., 2011). Par exemple, le syndrome de Brugada est une maladie héréditaire caractérisée par des anomalies de conduction ventriculaire droite causant une arythmie cardiaque. Il peut être responsable de fibrillation ventriculaire et de mort subite. Environ 25% de patients souffrant de ce syndrome possède les mutations du gène *SCN5A* menant à une perte de fonction (Kapplinger et al., 2010). Cette perte est traduite par une diminution du pic de courant Na^+ due à l'augmentation de seuil d'activation ou au retour lent de l'état inactivé à l'état activable, ce qui entraîne une diminution du nombre des canaux disponibles (Wilde et al., 2011). Le gain de fonction de $\text{Na}_v1.5$ entraîne un autre type d'arythmie cardiaque. C'est le cas du syndrome de QT long. Ce gain de fonction est dû à l'inactivation incomplète du canal ou au décalage de la courbe d'inactivation vers la droite. Dans les deux, cela entraîne un courant Na^+ persistant dans les cardiomyocytes, par conséquent l'augmentation de l'intervalle QT de l'activité cardiaque. D'un point de vue clinique, les patients présentent une tachycardie ventriculaire qui peut être responsable des syncopes cardiaques, voire une mort subite (Loussouarn et al., 2016; Wilde et al., 2011). Ainsi, les canaux Na_v ont une distribution très large mais spécifique dans les cellules excitables (Tableau 2) et présentent une grande importance dans l'excitabilité cellulaire.

Les canaux Na_v des cellules non excitables

Les cellules excitables ne sont pas les seuls types de cellules où les canaux Na_v y jouent un rôle important. Les cellules dites non excitables ne générant pas de PoA expriment également plusieurs isoformes des canaux Na_v (Tableau 2). Dans ces types cellulaires, les canaux présentent d'autres fonctions que la genèse et la

propagation de PoA.

Au niveau du système nerveux central, certaines cellules gliales telles que les astrocytes, les cellules microgliales et les cellules de Müller expriment les canaux sodiques. Il a été rapporté que les astrocytes présentent les isoformes $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.5$ et $Na_v1.6$ (Black et al., 1998, 1995; Reese and Caldwell, 1999). Tandis que leur niveau d'expression est relativement faible dans les conditions de contrôle, celui de $Na_v1.5$ est fortement régulé lors d'une lésion cérébrale. Black et al. ont démontré une surexpression de $Na_v1.5$ dans les astrocytes actifs des tissus cérébraux des patients de sclérose en plaque. Des résultats similaires ont été observés dans les astrocytes adjacents aux accidents vasculaires cérébraux (Black et al., 2010). L'augmentation de l'expression des canaux Na_v a également été constatée au niveau des cellules de Müller lors des lésions rétiniennes (Francke et al., 1996). Les cellules microgliales, qui sont les macrophages se trouvant dans le système nerveux central, expriment $Na_v1.1$, $Na_v1.5$ et $Na_v1.6$ (Black et al., 2009; Craner et al., 2005). Elles contribuent aux réponses immunitaires par la phagocytose et la libération des cytokines pro-inflammatoires. Le blocage des canaux Na_v par la TTX a entraîné une réduction significative de l'activité phagocytaire et de la sécrétion des interleukines $1-\alpha$ et $-\beta$. Par ailleurs, les cellules microgliales dépourvues de $Na_v1.6$ ont perdu leur capacité à migrer lors de l'activation par l'ATP (Black et al., 2009). Les canaux Na_v joueraient donc un rôle important dans l'activité des cellules microgliales et leur migration.

Les canaux Na_v sont aussi décrits dans les cellules immunitaires. Les cellules dendritiques expriment $Na_v1.7$. Son niveau d'expression est dynamique au cours de la différenciation des cellules dendritiques. Lors de la transition des monocytes en cellules dendritiques immatures, le taux de transcrit de $Na_v1.7$ augmente, alors que durant le passage vers les cellules dendritiques matures le taux diminue considérablement (Kis-Toth et al., 2011; Zsiros et al., 2009). Le traitement des cellules dendritiques à la TTX a entraîné une diminution significative de la migration cellulaire et a atténué l'activation des cellules dendritiques (Kis-Toth et al., 2011). *Kis-Toth et al.* ont suggéré que la fonction des canaux Na_v est liée au maintien de l'état immature des cellules dendritiques afin d'éviter une activation inutile. Les macrophages, un des éléments importants de la défense immunitaire, expriment $Na_v1.5$ (Carrithers et al., 2007). Contrairement aux autres cellules, $Na_v1.5$ a été localisé au niveau des endosomes tardifs des macrophages et non à la membrane plasmique. Lors de l'activation des macrophages par lipopolysaccharides, le blocage de $Na_v1.5$ a réduit la phagocytose d'environ 50%. De plus, l'activation de ce canal a provoqué une sortie de Na^+ et une entrée de proton dans l'endosome (Carrithers et al., 2007). Ces données démontrent l'implication de $Na_v1.5$ dans le processus de phagocytose, en particulier dans l'acidification des endosomes.

En outre des cellules saines, la présence des canaux Na_v est décrite dans les cellules cancéreuses (Tableau 2). Les courant Na^+ dépendants du potentiel ont été détectés dans de nombreux types de cancer tels que cancer colorectal, de l'ovaire, du sein, leucémie etc. (Lopez-Charcas et al., 2021). Par exemple, $Na_v1.5$ est l'isoforme majeure qui a été identifiée dans le cancer du sein. Son niveau d'expression est particulièrement accru dans les tissus cancéreux métastatiques (Fraser et al., 2005). Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans les lignées cellulaires fortement métastatiques de cancer du sein humain, où la TTX a significativement réduit le taux d'invasion (Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003). Le taux d'expression de $Na_v1.5$ semble être corrélé avec le phénotype invasif et métastatique du cancer, voire la survie des patients (Yang et al., 2012). *House et al.* a rapporté que $Na_v1.5$ a également été identifié comme un élément figurant dans le processus d'invasion du cancer colorectal (House et al., 2010). D'autres isoformes comme $Na_v1.6$ et $Na_v1.7$ ont été décrites comme étant

corrélées avec la gravité du cancer du col de l'utérus et de la prostate, respectivement, puisque leur taux d'expression est élevé dans les tissus cancéreux (Diss et al., 2005; Lopez-Charcas et al., 2018). Par ailleurs, le traitement par TTX a diminué le taux d'invasion des cancers (Lopez-Charcas et al., 2018; Yildirim et al., 2012). Dans ce contexte cancéreux, les canaux Na_v sont globalement liés à la progression de la maladie vers des stades plus graves, voire métastatiques.

Ainsi, les canaux Na_v sont fonctionnels et interviennent dans la physiologie et physiopathologie des cellules excitables. En outre des cellules mentionnées précédemment, les canaux ont aussi été décrits dans les tissus artériels, également composés des cellules non excitables. Ceci sera développé dans la partie suivante.

Na_v subtype (<i>gene</i>)	TTX sensitivity (IC_{50})	Tissue expression	
		Excitable	Non excitable
$Na_v1.1$ (<i>SCN1A</i>)	TTX-S (6 nM)	CNS	Microglia
$Na_v1.2$ (<i>SCN2A</i>)	TTX-S (12 nM)	CNS	Astrocytes
$Na_v1.3$ (<i>SCN3A</i>)	TTX-S (4 nM)	CNS	Astrocytes
$Na_v1.4$ (<i>SCN4A</i>)	TTX-S (5 nM)	Skeletal muscle	
$Na_v1.5$ (<i>SCN5A</i>)	TTX-R (1-2 μ M)	Heart (cardiomyocytes)	Astrocytes
			Microglia Macrophages Cancer (breast, colorectal, ovarian, leukemia)
$Na_v1.6$ (<i>SCN8A</i>)	TTX-S (1 nM)	Nodes of Ranvier	Astrocytes
			Microglia Cancer (cervix, leukemia)
$Na_v1.7$ (<i>SCN9A</i>)	TTX-S (4 nM)	PNS	Dendritic cells
			Cancer (prostate, lung)
$Na_v1.8$ (<i>SCN10A</i>)	TTX-R (60 μ M)	PNS (sensory neurons)	
$Na_v1.9$ (<i>SCN11A</i>)	TTX-R (40 μ M)	PNS	

Tableau 2 : Distribution tissulaire des canaux Na_v et leur sensibilité à la TTX

3.2. Les canaux Na_v du tissu vasculaire

Dans cette partie, je fais un bref état des lieux de la littérature sur l'implication des canaux Na_v dans la fonction vasculaire qui a conduit aux hypothèses de travail de mes travaux de thèse. Il s'agit des études montrant l'expression et parfois la fonction des canaux Na_v dans les CE, d'une part et dans les CMLV, d'autre part. Ainsi, j'ai qualifié ces canaux ioniques, de « vasculaires », avec une distinction pour ceux exprimés dans les CE (canaux Na_v endothéliaux) et ceux exprimés dans les CMLV (canaux Na_v du myocyte). Historiquement, *William R Keatinge* a mis en évidence pour la 1^{ère} fois par électrophysiologie des PoA dans des bandes de muscles lisses de carotides de mouton qui pourraient être liés à des canaux Na_v de CMLV (Keatinge, 1968). Cependant, si W.R. Keatinge

avait montré que les ions Na⁺ étaient indispensables aux PoA enregistrés, il n'avait pas utilisé le terme de canaux Na_v et n'a pas pu les bloquer avec de la TTX (~33 μM), ce qui n'exclue pas d'éventuels canaux Na_v TTX-R. Environ 20 ans plus tard, que *Sturek et Hermsmeyer* décrivent des courants Na⁺ dépendants du potentiel dans des CMLV isolées de la veine azygos de rat, probablement produits par des canaux Na_v TTX-R (Sturek and Hermsmeyer, 1986). En 2015, *Rice et al.* publient une caractérisation par imagerie, montrant l'expression de canaux Na_v dans les artérioles cutanées humaines au niveau de l'endothélium et de la media (Gordienko and Tsukahara, 1994). Au regard de la littérature, les canaux Nav sont présents à la fois au niveau de l'intima et de la media, et pourraient jouer des rôles dans différentes fonctions, telles que la régulation de la vasomotricité, l'angiogénèse et les contractions spontanées de l'artère.

3.2.1. Les canaux Nav dits « endothéliaux »

Types de vaisseaux sanguins ou de CE	Isoformes de canaux Na _v	Rôle - Fonction	Principales observations	Références
CE isolées d'artères rénales interlobaires (rat); HUVEC	TTX-R	ND	Courants Na ⁺ dépendants du potentiel V _{1/2} activation : -38 mV et V _{1/2} inactivation : -82 mV	(Gordienko and Tsukahara, 1994)
CE isolées de microvaisseaux de cœur (rat)	TTX-S	ND	Courants Na ⁺ dépendants du potentiel ; V _{1/2} activation : -45 mV	(Walsh et al., 1998)
CE isolées de veines saphènes (Homme)	Na _v 1.5	ND	Courants Na ⁺ dépendants du potentiel; V _{1/2} activation : -30 mV et V _{1/2} inactivation : -75 mV ; Identification de <i>SCN5A</i> par RT-PCR; canaux Na _v détectés par WB et histoimmunochimie (Anti-PanNav)	(Gosling et al., 1998)
HUVEC	Na _v 1.4 Na _v 1.6	Contrôle de l'activation de la voie ERK1/2 par les forces de cisaillement	La TTX potentialise l'activation de la voie ERK1/2 par les forces de cisaillement, alors que la VTD l'inhibe	(Traub et al., 1999)
HUVEC	Na _v 1.5 Na _v 1.7	Rôle dans différents aspects de l'angiogénèse déclenchée par le VEGF	Courants Na ⁺ dépendants du potentiel ; La TTX inhibe la tubulogénèse, la migration cellulaire et la prolifération, mais stimule l'adhésion; Nav1.5 module l'activation par le VEGF de la voie ERK1/2; Nav1.7 est impliquée dans le chimiotaxisme cellulaire	(Andrikopoulos et al., 2011b)
aorte (souris)	Na _v 1.6	ND	Détection immunohistochimique	(Figuroa et al., 2007)
artérioles crémastériques (souris)	Na _v 1.2 Na _v 1.6 Na _v 1.9	Vasodilatation dépendante d'endothélium	Détection immunohistochimique; Effets vasodilatateurs de la VTD	(Figuroa et al., 2007)
Intima d'artérioles cutanées et de valves artérioveineuses cutanées humaines	Na _v 1.7	ND	Détection immunohistochimique avec des anticorps anti-Na _v 1.7	(Frank L. Rice et al., 2015)

ND : non déterminé

Tableau 3 : Les canaux Na_v endothéliaux

Plusieurs publications décrivent l'expression de canaux Na_v dans l'endothélium et ceci dans différents types de vaisseaux sanguins, cependant peu d'études abordent leur fonction (Tableau 3). Les canaux Na_v sont ainsi exprimés dans l'endothélium de veine, d'artère de conductance (l'aorte, les artères fémorales) et de résistance (la microcirculation cardiaque, les artérioles sous-cutanées et crémastériques). Les études moléculaires ne permettent pas de distinguer un sous-type particulier pour l'endothélium, car les deux types de canaux Na_v (TTX-S et TTX-R) ont été mis en évidence. Par exemple, *Figuroa et al.* ont identifié $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.6$ et $\text{Na}_v1.9$ dans l'endothélium des artères crémastériques de souris, avec une plus forte expression pour $\text{Na}_v1.2$ (Figuroa et al., 2007). L'isoforme cardiaque $\text{Na}_v1.5$ a été détectée dans les CE des veines saphènes et ombilicales (HSVEC et HUVEC) (Andrikopoulos et al., 2011b; Gosling et al., 1998). $\text{Na}_v1.7$ a été détecté dans l'intima des artérioles intracutanées humaines, mais l'étude concernée ne fait pas mention de recherche d'autres sous-types (Frank L. Rice et al., 2015). En conclusion, des sous-types TTX-S ($\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.6$, et $\text{Na}_v1.7$) et TTX-R ($\text{Na}_v1.5$ et $\text{Na}_v1.9$) ont été identifiés dans les CE.

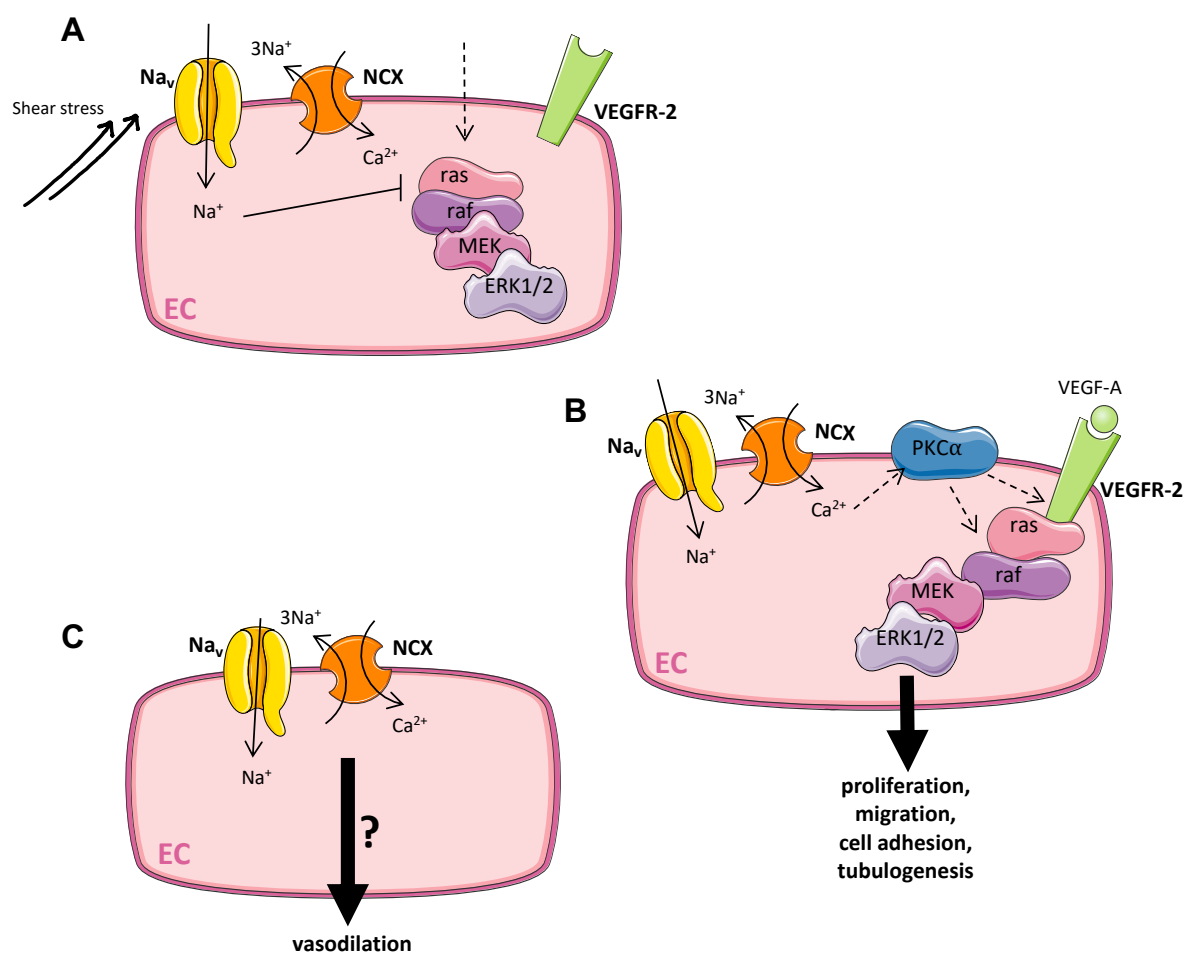


Figure 16 : Les canaux Na_v endothéliaux comme acteurs de signalisation

Les canaux Na_v sont exprimés dans les CE (ou EC) et exerceraient différents rôles. A) Ils auraient un rôle de régulateur négatif des effets du shear-stress sur l'activation de ERK1/2 dans les HUVEC (Traub et al., 1999). B) Au contraire, lors de l'activation de l'angiogenèse par le VEGF, ils auraient un rôle potentialisateur (Andrikopoulos et al., 2011b). C) Dans les artères crémastériques, leur activation stimulerait les voies de signalisation dilatatrice (Figuroa et al., 2007). Dans les trois situations, ils activeraient le NCX en mode d'entrée de Ca^{2+} .

La fonctionnalité des canaux Na_v endothéliaux a d'abord été mise en évidence par patch-clamp. Les courants Na^+ dépendant du potentiel ont été enregistrés dans les CE d'artères interlobulaires, de microvaisseaux de cœur, d'HSVEC et d'HUVEC (Tableau 3). Cependant, au global, il y a peu de données sur les propriétés électrophysiologiques de ces courants. Il apparaît que dans les CE de veines, les $V_{1/2}$ d'inactivation soient très négatifs (-75 à -82 mV), et au regard des potentiels de repos (-28 à -38 mV), on peut se poser la question de la disponibilité de ces canaux dans les conditions physiologiques (Tableau 3). Il faudrait notamment que la membrane soit hyperpolarisée pour qu'ils puissent être activés (Andrikopoulos et al., 2011b; Gosling et al., 1998; Traub et al., 1999; Walsh et al., 1998). L'étude de *Traub et al.* révèle que les canaux Na_v des HUVEC interviennent comme régulateur négatif de l'activation de la voie ERK1/2 par le shear-stress (Traub et al., 1999). On pourrait donc imaginer la possibilité d'une certaine mécanosensibilité des canaux Na_v endothéliaux comme cela a été démontré dans les cardiomyocytes (Strege et al., 2019). Cependant, il a été montré que la TTX inhibe certains aspects de l'angiogenèse (la tubulogénèse, la migration cellulaire et la prolifération) et stimule l'adhésion des HUVEC en présence de VEGF (Andrikopoulos et al., 2011b). En fait, cette étude particulièrement étayées, montre que contrairement à ce qu'avait montré Traub et al., les canaux Na_v endothéliaux potentialiseraient la voie ERK1/2 activée par le VEGF. Ainsi, ces deux études montrent que les canaux Na_v endothéliaux auraient un rôle non canonique, d'acteur de signalisation cellulaire. Par ailleurs, la VTD déclenche une vasodilatation des artères crémastériques, suggérant le rôle des canaux Na_v endothéliaux dans les voies dilatatrices. Il est notable, que ces différents rôles des canaux Na_v endothéliaux ont été rapportées de façon isolée, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'autres études qui les corroborent. Par contre, l'ensemble des études publiées convergent sur l'hypothèse que les canaux Na_v endothéliaux pourraient influencer la signalisation intracellulaire du Ca^{2+} , en coordination avec les NCX en mode d'entrée de Ca^{2+} (Andrikopoulos et al., 2011b; Gosling et al., 1998; Walsh et al., 1998) (Figure 16)

3.2.2. Les canaux Na_v des myocytes vasculaires

La mise en évidence de l'expression des canaux Na_v dans les CMLV est démontrée par plus d'une vingtaine de publications. Ils ont été initialement caractérisés par patch-clamp par Sturek et Hermeyer en 1986. Par la suite, des courants Na^+ dépendants du potentiel ont été enregistrés dans les myocytes de différents types de vaisseaux sanguins, tels que les veines (Tableau 4), les artères de conductance (Tableau 5) et des artères de résistance (Tableau 6). Concernant les myocytes de veines, les canaux Na_v contribueraient avec les canaux Ca_v à la genèse des PoA (Tableau 4). Les études électrophysiologiques menées sur des cellules dissociées montrent des amplitudes de courants variables en fonction du type de veine et les $V_{1/2}$ d'inactivation se situent autour de -50 mV. Ces canaux Na_v sont soit TTX-S, soit TTX-R, et il n'est pas possible de faire ressortir un sous-type particulier pour les veines.

Types de veines	Isoformes de canaux Na _v	Rôle - Fonction	Principales observations	Références
veine azygos (rat)	TTX-R	Contribution à l'activité pace-maker avec les canaux Ca _v	Courants Na ⁺ complètement inactivés à -50 mV	(Sturek and Hermsmeyer, 1986)
veine porte (rat, souris)	Na _v 1.6 Na _v 1.7	L'activation des canaux Na _v contribuerait à la stimulation des canaux Ca _v ; Genèse des PoA déclenchés, mais pas des PoA spontanés; Couplage fonctionnel avec NCX	Courants Na ⁺ TTX-S; Fixation spécifique de la saxitoxine radiomarquée, montrant l'expression protéique des canaux Na _v ; Courants Na ⁺ ; V _{1/2} activation : +10 mV; V _{1/2} inactivation : -52,5 mV; PoA TTX-S; myographie montrant des effets contracturants de la VTD	(Mironneau et al., 1990; Saleh et al., 2005)
veines pulmonaires (chien)	Na _v 1.5	Genèse des poA; contribution à la mise en place d'arythmie cardiaque avec fibrillation atriale	faibles densités de courants Na ⁺ en comparaison avec l'oreillette; V _{1/2} activation : -44 mV; V _{1/2} inactivation : -82 mV; courant Na ⁺ persistants	(Barajas-Martinez et al., 2017)

Tableau 4 : Les canaux Na_v des myocytes des veines

En ce qui concerne les myocytes d'artères, j'ai trouvé intéressant de diviser les différentes études en fonction du type de vaisseaux, à savoir, artères de conductance (essentiellement l'aorte et les artères pulmonaires, Tableau 5) et les artères avec un TM et/ou une vasomotricité important, telles que les artères de résistance (les MA, les artères coronaires et utérines, Tableau 6). Pour les artères de conductance, une caractéristique commune qui se dégage des études est que les canaux Na_v pourraient être ouverts au repos (courant de fenêtre) et contribuer modérément à la dépolarisation du myocyte (régulation du potentiel de repos) et ainsi, à l'activité pace-maker, dans des conditions physiopathologiques qui seront abordées un peu plus loin. Les amplitudes de courants sont par contre, très variables d'un article à l'autre (quelques dizaines de pA à plus d'un nA), les V_{1/2} d'activation sont souvent proches de -20 mV, et les V_{1/2} d'inactivation entre -44 mV et -75 mV. Ils participeraient surtout au potentiel de repos, mais pas à la genèse de PoA, qui dans les myocytes vasculaires, sont médiés par les canaux Ca_v (Borysova et al., 2018; Hirst et al., 1986; Kotecha and Hill, 2005; Sturek and Hermsmeyer, 1986).

Types d'artères de conductance	Isoformes de canaux Na _v	Rôle - Fonction	Principales observations	Références
aorte (rat)	Na _v 1.2 Na _v 1.5 Na _v 1.6	Contribution à la réponse contractile de l'aorte; L'activation des canaux Na _v contribuerait à la stimulation des canaux Ca _v et/ou des NCX; physiopathologie de l'aorte	La VTD induit une vasoconstriction qui est potentialisée par le L-NAME, suggérant la libération de NO; Cet effet est abolit par la PZ; Les contractions déclenchées par de faibles dépolarisations (KCl : 1-5 mM) sont réduites par la TTX ou le KB-R7943	(Fort et al., 2009; Shinjoh et al., 1991)
aorte (Homme)	Na _v 1.7	Contribution au potentiel de repos et impact sur l'activation des canaux Ca _v ; migration cellulaire, endocytose, sécrétion; physiopathologie de l'aorte	Courants Na ⁺ ; Courants Na ⁺ persistants; V _{1/2} activation : autour de -20 mV; V _{1/2} inactivation : autour -50 mV; Courants de fenêtre; Cellules dédifférenciées et prolifératives; Pas de courant Na ⁺ dans des CMLV fraîchement dissociées	(Choby et al., 2000; Cox et al., 1998; Meguro et al., 2009)
artères pulmonaires (lapin)	TTX-S	Petite contribution dans le potentiel de repos et également dans le PoA	Courants Na ⁺ ; V _{1/2} activation : -40 mV; V _{1/2} inactivation : -65 mV	(Okabe et al., 1988)
artères pulmonaires (Homme)	Na _v 1.2 Na _v 1.3 Na _v 1.4 Na _v 1.7 Na _v 1.9	Contribution au potentiel de repos et impact sur l'activation des canaux Ca _v ; Couplage fonctionnel putatif avec NCX; Responsables d'une vasoconstriction permanente des artères pulmonaires; physiopathologie (HTA pulmonaire)	Courants Na ⁺ ; V _{1/2} activation : -16 à -17 mV; V _{1/2} inactivation : -40 à -75 mV; courant de fenêtre; Profil d'expression transcriptionnel des Na _v par RT-PCR; Augmentation de l'expression des transcrits chez des patients atteints d'HTA pulmonaire	(Jo et al., 2004; Platoshyn et al., 2005)

Tableau 5 : Les canaux Na_v des myocytes des artères de conductance

Pour les artères de résistance, qui se caractérisent par une réactivité vasculaire plus importante, le couplage fonctionnel entre les canaux Na_v et les NCX a été montré dans les MA et les artères coronaires (Tableau 6) (Boccaro et al., 1999; Ho et al., 2013), donc un rôle indirect sur la régulation de la [Ca²⁺]_i. Ainsi, les canaux Na_v pourraient permettre d'accentuer la contraction artérielle dans des conditions qui restent à définir. De façon intéressante, dans les artérioles, les canaux Na_v participeraient aux contractions spontanées (ou « vasomotion ») qui notamment peuvent être accentuées dans des conditions d'hypoxie (Virsolvy et al., 2021).

Types d'artères de résistance	isoformes de canaux Nav	Rôle - Fonction	Principales observations	Références
MA (souris et rat)	Nav1.2 Nav1.3 Nav1.5 Nav1.6 Nav1.7	Implication dans le couplage excitation-contraction du myocyte; Couplage fonctionnel avec les NCX et les canaux Cl_{Ca} ; Ils permettraient d'augmenter le niveau des contractions artérielles	Courants Na^+ ; Courants Na^+ persistants ; Courant de fenêtre entre -40 et 20 mV; $V_{1/2}$ activation : -16 mV; $V_{1/2}$ inactivation : -53 mV; Contractions induites par la VTD partiellement inhibées par la PZ et le KBR7943; Colocalisation avec les NCX et la pompe $Na^+/K^+-ATPase$	(Berra-Romani et al., 2005; Ho et al., 2013)
artérioles sous-cutanées (Homme)	Nav1.7	Hypothèse proposée d'une implication dans le tonus vasculaire	Localisation par immunochimie de l'expression de Nav1.7	(Frank L. Rice et al., 2015)
artérioles de muscle squelettique (rat)	ND	Participation à la genèse des PoA et dans les contractions spontanées des artères (Vasomotion)	La TTX altère les PoA; Courants Na^+ régulés négativement par le Ca^{2+}	(Ulyanova and Shirokov, 2018)
artères coronaires (Homme, patients en cours de transplantation cardiaque; biopsie après ischémie)	TTX-S	Contribution à la dépolarisation des myocytes ; Dédifférenciation et prolifération cellulaire; Couplage fonctionnel avec les canaux Ca_v et les NCX; Physiopathologie de l'artère	Courants Na^+ ; Courants Na^+ persistants; $V_{1/2}$ activation : -25 mV; $V_{1/2}$ inactivation : -44 à -46 mV; Courants de fenêtre entre -50 et -10 mV; preuves expérimentales du couplage avec les NCX	(Boccard et al., 1999; Quignard et al., 1997)
artères utérines (Homme)	Nav1.2 Nav1.3 Nav1.5 Nav1.7	Participation aux contractions spontanées des artères (Vasomotion) en conditions d'hypoxie	La contribution des canaux Nav du myocyte n'apparaît que dans des conditions hypoxiques	(Virsolvy et al., 2021)

ND : non déterminé

Tableau 6 : Les canaux Na_v dans le myocyte des artères de résistance

Au niveau moléculaire, les canaux Na_v TTX-S ($Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ et $Na_v1.7$) et TTX-R ($Na_v1.5$ et $Na_v1.9$) ont été mis en évidence et donc là encore, ce n'est pas possible d'affirmer qu'un sous-type particulier soit exprimé dans le myocyte vasculaire (Tableau 5 et 6). Concernant les SU β , leur expression dans les artères a été beaucoup moins caractérisée. Les transcrits *SNC1B-SCN4B* ont été identifiés dans l'aorte de rat et les artères utérines humaines (Fort et al., 2009; Virsolvy et al., 2021). La média de l'aorte de rat exprime les transcrits de SU β 1-3 (Fort et al., 2009), alors que les transcrits des SU β 1-4 sont détectés dans les artères utérines humaines (Virsolvy et al., 2021). Les CMLV cultivées des artères pulmonaires humaines expriment les transcrits *SCN1B* et *SCN2B* (Platoshyn et al., 2005). Par ailleurs, le rôle de ces SU β dans les cellules vasculaires n'a jamais été investigué.

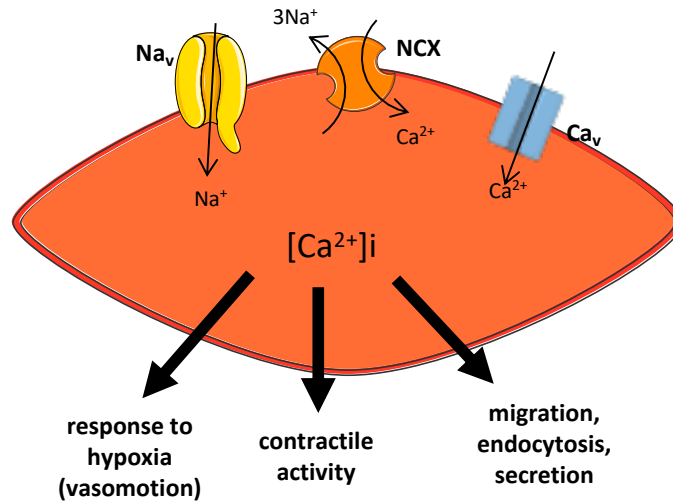


Figure 17 : Les canaux Na_v du myocyte artériel, des acteurs du couplage excitation-contraction

Les canaux Na_v sont exprimés dans les myocytes et exerceraient différents rôles. 1) Ils seraient des acteurs du couplage stimulation-contraction, en modulant la [Ca²⁺]_i (couplage avec les NCX et les canaux Ca_v) (Tableau 5 et 6). 2) Ils interviendraient dans des processus cellulaires, tels que la migration, l'endocytose et la sécrétion (Meguro et al., 2009). 3) Les canaux Na_v participeraient dans l'induction de contraction spontanée dans les conditions d'hypoxie (vasomotion) (Virsolvy et al., 2021).

3.2.3. Les canaux Na_v et l'implication physiopathologique

Si les canaux Na_v sont impliqués dans de nombreuses canalopathies, leur implication dans les mécanismes physiopathologiques vasculaire restent hypothétiques. Dans les études sur les CMLV dissociées, on retrouve des changements phénotypiques des cellules en culture tels qu'une dédifférenciation ou encore un phénotype prolifératif (Boccaro et al., 1999; Fort et al., 2009; Meguro et al., 2009). Par ailleurs, une augmentation de l'expression des canaux Na_v et un gain de fonction ont été corrélées à ces changements phénotypiques du myocyte de l'aorte, ce qui justifieraient la contribution de ces canaux dans le remodelage et l'hyperplasie (Meguro et al., 2009). Dans des conditions d'hypoxie, l'étude sur les artères utérines humaines (Virsolvy et al., 2021) est la seule qui révèle une augmentation d'activité des canaux Na_v en relation avec une augmentation des contractions artérielle spontanée. Aucune étude n'a exploré les effets de certains variants des canaux Na_v sur la fonction vasculaire, comme par exemple des variants conduisant à une perte de fonction ou un gain de fonction du Na_v1.5 qui est exprimé dans le myocyte vasculaire.

OBJECTIFS

Au regard de la littérature, il s'avère que les connaissances sur l'expression des canaux Na_v dans le tissu artériel et sur leur contribution dans la vasomotricité sont incomplètes et contradictoires. De plus, aucune donnée n'était disponible au début de ma thèse sur leur statut dans le contexte de l'hypertension artérielle. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été de préciser l'expression des canaux Na_v chez la souris, dans différentes artères et notamment dans les CE et CMLV, en caractérisant les différentes isoformes. Nous avons également cherché à déterminer la variation de l'expression des canaux Na_v dans des conditions physiopathologiques. Étant exprimés au niveau des artères, dans l'endothélium, la média, mais aussi dans les terminaisons nerveuses, nous avons voulu décrypter l'implication des canaux Na_v dans la vasomotricité des artères de résistance, telles que les MA, par des approches pharmacologiques.

Dans un premier temps, le niveau d'expression de chaque isoforme des canaux Na_v n'étant pas évalué au niveau des artères de souris, nous avons envisagé de réaliser une RT-qPCR avec une méthode de quantification absolue sur différentes artères à savoir l'aorte, les MA et les artères fémorales. Cette technique permet de définir précisément le nombre de copies de gènes dans une quantité d'échantillon donnée et de comparer le niveau d'expression entre les gènes, les artères et les différentes conditions. Les artères étant composées de différentes couches, la distribution des canaux Na_v peut y être différente. Dans le but de déterminer les isoformes exprimées dans les CE et CMLV des MA, la technique d'isolement cellulaire a été réalisée. Dans des conditions pathologiques vasculaires comme l'HTA et le vieillissement, les artères sont sujettes au remodelage et l'expression de certains canaux ioniques est modulée. Afin d'évaluer la variation de l'expression des canaux Na_v dans ce contexte, nous souhaitons utiliser un modèle de souris hypertendues par infusion d'AngII et des souris âgées.

Ensuite, l'expression des canaux Na_v dans les différentes couches des MA nous a mené à nous concentrer sur leur rôle dans la vasomotricité. À l'aide des techniques de myographie et d'artériographie évaluant la réactivité vasculaire, nous avons étudié l'impact de l'activité des canaux Na_v sur la vasomotricité des MA par l'utilisation des toxines spécifiques de ces canaux, à savoir la VTD (activateur) et la TTX (bloqueur). Cependant, les artères sont des organes innervés présentant des terminaisons nerveuses périvasculaires. Afin de s'affranchir des effets neuronaux et d'évaluer uniquement les effets des canaux Na_v vasculaires, nous avons tenté d'appliquer un mélange de substances inhibitrices des neurotransmetteurs. Au niveau des MA de souris, l'étude du rôle des canaux Na_v dans la vasomotricité nous a permis d'identifier le NCX endothélial en tant que médiateur important des effets observés. Pour mieux comprendre le mécanisme de la réponse obtenue, nous avons envisagé de réaliser des expériences sur un modèle cellulaire endothélial avec l'utilisation des différentes molécules, notamment les inhibiteurs spécifiques des NCX.

Enfin, cette thèse a pour but de comprendre le rôle des canaux Na_v dans la vasomotricité dans des conditions physiopathologiques à des échelles tissulaires et cellulaires par des approches pharmacologiques. Cette étude pourrait nous permettre d'évaluer les canaux Na_v en tant que cible thérapeutique potentielle dans un contexte pathologique vasculaire.

MATÉRIELS

et

MÉTHODES

1. Modèle animal

Les expériences sur les animaux ont été réalisées en accord avec les directives 2020/63/UE du Parlement européen et du Conseil sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Le protocole a été approuvé par le Comité d'Éthique de la région Pays de la Loire (APAFIS #24014-202001311653562).

Dans cette étude, nous avons utilisé des souris C57BL6/J mâles et femelles âgées de 5 à 6 mois. Elles ont été hébergées dans des pièces dont la température et l'humidité sont contrôlées, avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les animaux ont un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau de boisson.

Le rôle des canaux Na_v dans les MA a été étudié principalement sur les souris contrôles. En parallèle, nous avons mis en place un modèle d'HTA murin afin d'exploiter la variation transcriptionnelle des canaux Na_v entre ces différentes conditions

1.1. Modèle d'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II

1.1.1. Préparation des pompes osmotiques

L'HTA a été induite par une diffusion d'AngII, à l'aide de pompes osmotiques (modèle 2002, 0,5 µL/h, Alzet®). La solution d'AngII et la pompe ont été préparées selon le poids de l'animal afin que chacun reçoive une dose de 1 mg/kg/jour pendant 14 jours. Pour ce faire, l'AngII (#4006473, Bachem) a été pesée puis dissoute dans du NaCl 0,9% stérile. La solution a été injectée à l'aide d'une seringue dans les pompes dans des conditions stériles. Les pompes ont ensuite été plongées dans une solution de NaCl 0,9% puis incubées à 37°C toute la nuit. Cette étape a pour but d'activer la diffusion passive de l'AngII avant de les implanter chez l'animal.

1.1.2. Chirurgie d'implantation des pompes osmotiques

Le lendemain de la préparation des pompes osmotiques, les souris C57BL6/J mâles âgées de 4 mois et demi ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (5% dans la boîte puis 2% dans le masque). Une dose d'analgésique (0,1 mg/kg, Temgésic®) a été injectée en sous-cutané afin de prévenir la douleur per- et post-chirurgicale. Dans un premier temps, la nuque de l'animal a été rasée puis nettoyée avec une solution de Bétadine® scrub puis de Bétadine® dermique. Après l'incision de la peau, la peau du dos a été décollée pour permettre l'introduction de la pompe osmotique en sous-cutané. La peau incisée a été suturée à l'aide d'un fil de suture 5.0 non-résorbable. Les souris ont ensuite été placées dans une couveuse à 28°C pendant le réveil. Pour le groupe sham, les animaux ont subi les mêmes gestes chirurgicaux sans l'introduction de la pompe. Au bout de 14 jours de traitement, les animaux ont été sacrifiés pour le prélèvement des artères d'intérêt.

1.1.3. Mesure de pression artérielle par photopléthysmographie

La photopléthysmographie (Visitech Systems, BP-2000®) est une technique de mesure non-invasive de la PAS (Figure 17). Une contention de la souris a été réalisée à l'aide d'une cage noire métallique placée sur une plaque chauffante. La queue de l'animal a été positionnée dans un brassard caudal gonflable et est immobilisée avec un ruban adhésif. L'enregistrement de la PAS est composé de 5 premières mesures, permettant d'habituer

les animaux, suivies de 15 mesures successives. Chaque mesure a été espacée de 1,5 secondes. Seules les 15 dernières valeurs ont été prises en compte pour l'évaluation de la PAS.

Avant l'opération, les mesures ont été réalisées quotidiennement pendant une semaine pour habituer les animaux à la mesure de la PA. La semaine suivante, la PAS basale des animaux a été mesurée pendant 5 jours. A partir du lendemain de l'opération, les mesures de la PAS ont été prises 5 jours par semaine jusqu'au sacrifice (14 jours de traitement). L'évolution de la PAS et la comparaison entre le groupe sham et le groupe AngII ont été représentées sous forme de courbes.

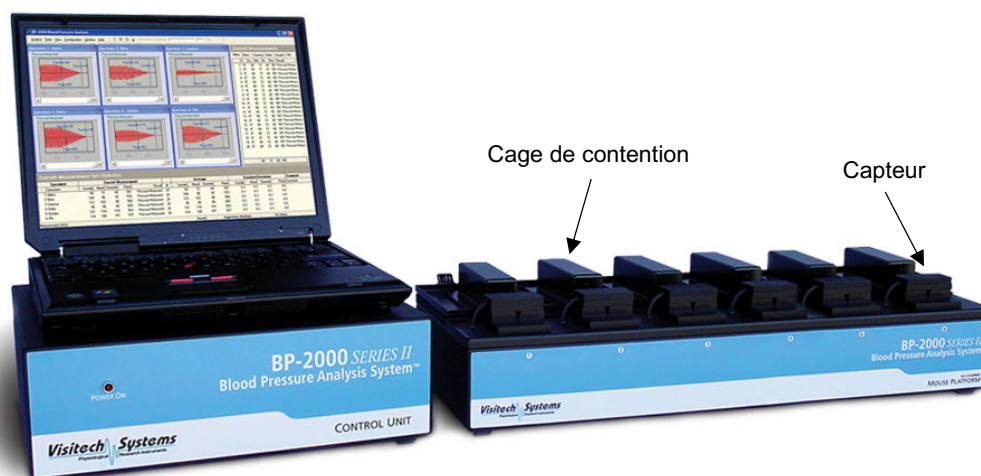


Figure 18 : Dispositif de photopléthysmographie adapté pour les souris

L'image illustre, à gauche, l'unité centrale permettant d'enregistrer les valeurs de la pression artérielle systolique et l'unité contrôlant la photopléthysmographie. À droite, les cages de contention sont placées sur une plaque chauffante et sont accompagnées d'un manchon gonflable et d'un capteur de pression.

1.2. Sacrifice et prélèvement

Les souris contrôles (mâles et femelles, 5 mois) ont été sacrifiées par inhalation de CO₂ (appareil automatisé, TemSega). Plusieurs types artériels tels que l'aorte, les artères fémorales et les MA ont été prélevés. Ces différentes artères ont été utilisées pour caractériser l'expression des canaux Na_v et des NCX dans les tissus artériels et également pour étudier leur implication dans la vasomotricité, en particulier des MA. Il faut noter que dans cette étude, nous avons travaillé sur les différents types de MA nommées 1^{er} ordre de MA (FOMA) et artère cécocolique (CA) (Figure 18). Elles diffèrent par la zone d'irrigation des intestins. Les FOMA irriguent le jéjunum et l'iléon, alors que la CA irrigue le *caecum*, partie la plus proche du côlon. La CA a un diamètre plus important (environ 300 µm) que les FOMA (environ 200 µm).

Les souris normotendues et hypertendues (mâles, 5 mois) ont été euthanasiées de la même façon et les mêmes artères ont été prélevées afin d'étudier la variation transcriptionnelle des canaux Na_v.

Les tissus artériels prélevés ont été placés dans une solution physiologique froide à pH 7,4 (en mM : NaCl 130 ; KCl 3,7 ; MgSO₄(7H₂O) 1,2 ; NaHCO₃ 14,9 ; CaCl₂(2H₂O) 1,6 ; HEPES 5 ; KH₂PO₄ 1,2 ; D-glucose 11). Après avoir retiré la graisse périvasculaire, les artères ont été soit utilisées pour les études de réactivité vasculaire,

soit conservées dans un milieu de protection nommé Allprotect tissue reagent (#76405, Qiagen), permettant de préserver les protéines et les ARN pour la caractérisation de l'expression des canaux Na_v et des échangeurs NCX. Les segments artériels ont également été placés à $-80^{\circ}C$ dans le milieu de cryoconservation OCT (Optimal Cutting Temperature, Thermo Fisher Scientific) pour l'étude immunohistochimique.

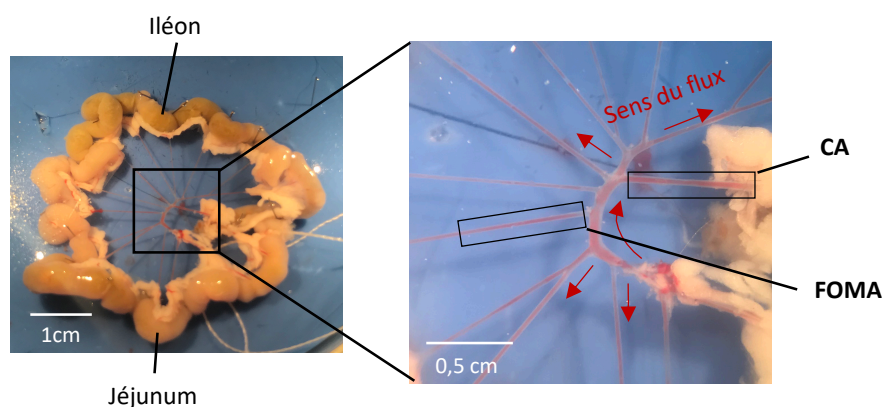


Figure 19 : Présentation des artères méésentériques de souris et ses branches

À gauche, l'image illustre les MA de souris reliées au jéjunum et à l'iléon, après avoir retiré la graisse périvasculaire. Les intestins sont sectionnés en aval du duodénum et en amont du caecum. À droite, les deux types de branches des MA : l'artère céocolique (CA) et les MA de 1er ordre (FOMA) sont représentées. Les CA irriguent le caecum, et les FOMA irriguent le jéjunum et l'iléon.

2. Isolement des cellules endothéliales et musculaires lisses

Afin de caractériser les isoformes des canaux Na_v dans les CE et les CMLV des MA, un isolement cellulaire a été réalisé. Dans un premier temps, deux souris mâles ont été euthanasiées par inhalation de CO_2 (appareil automatisé, TemSega). L'abdomen de l'animal a été nettoyé soigneusement avec de la Bétadine® scrub, puis de la Bétadine® dermique. Après avoir rincé l'excédent de Bétadine avec une solution de NaCl 0,9% stérile, la peau de l'abdomen a été incisée avec les instruments stérilisés au préalable. Les MA ont été prélevées puis placées dans une coupelle désinfectée contenant du NaCl 0,9% stérile. Après avoir disséqué l'ensemble des MA du premier au quatrième ordre, les artères ont été placées dans une solution de digestion enzymatique composée d'Endothelial Cell Growth Basal medium 2 (EBM-2, #CC-3156, Lonza) supplémentée de 1000 UI de collagénase de type 2. À l'aide de microciseaux désinfectés, les artères ont été découpées en morceaux puis ont été mises en douce agitation pendant 45 min dans l'incubateur à $37^{\circ}C$, 5% CO_2 . Après la digestion, la suspension a été dilacérée plusieurs fois à l'aide d'une pipette P1000 jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de morceaux d'artères visibles. Cette suspension cellulaire obtenue a été filtrée sur un filtre de $30 \mu m$ (Miltenyi biotec) puis centrifugée 10 min à 300g. Après avoir dénombré les cellules, le culot cellulaire a été resuspendu dans un tampon contenant une quantité adaptée de microbilles conjuguées au CD146 (marqueur spécifique des CE) (Microbeads, Miltenyi biotec), puis incubé pendant 15 min à $4^{\circ}C$. Les cellules ont été lavées avec du tampon physiologique (PBS, EDTA 2 mM, SVF 0,5%, pH 7,2) avant de procéder à la séparation magnétique sur colonne MS (Miltenyi biotec). Lors de la séparation magnétique, les cellules non retenues par la colonne MS ont d'abord été récupérées. Après lavage, elles ont étéensemencées dans du milieu DMEM/F12 (PAN Biotech) supplémenté de 10% de SVF (Eurobio

Scientific) dans un puit de plaque 6 puits. Ces cellules ont été identifiées comme étant les CMLV des MA. Ensuite, les cellules retenues par la colonne ont été collectées puis lavées. Elles ont été ensemencées dans un puit de plaque 12 puits avec du milieu Endothelial Growth medium-2 (EGM-2, Lonza) supplémenté de 20% de SVF. Les cellules marquées par CD146 ont été identifiées comme les CE. Après 48h d'adhésion, les deux types de cellules collectées ont été lavés puis laissés en prolifération jusqu'à confluence dans leur milieu adapté (pour les CE : EGM-2 avec 5% de SVF ; pour les CMLV : DMEM/F12 avec 10% de SVF) dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂. Après 10 à 13 jours de croissance, les ARN des cellules ont été extraits pour une analyse transcriptionnelle.

Gènes	Numéro d'accesion	Protéines	Fournisseurs	Vecteurs
<i>Scn1a</i>	NM_018733.2	Nav1.1	GeneCust	pUC57
<i>Scn2a</i>	NM_001099298.2	Nav1.2	Promega	pGEMTEasy
<i>Scn3a</i>	NM_018732.3	Nav1.3	Promega	pGEMTEasy
<i>Scn4a</i>	NM_133199.2	Nav1.4	GeneCust	pUC57
<i>Scn5a</i>	NM_021544.4	Nav1.5	Promega	pGEMTEasy
<i>Scn8a</i>	NM_001077499.2	Nav1.6	GeneCust	pUC57
<i>Scn9a</i>	NM_001290674.1	Nav1.7	New England BioLabs	pMiniT2.0
<i>Scn10a</i>	NM_001205321.1	Nav1.8	Promega	pGEMTEasy
<i>Scn11a</i>	NM_011887.3	Nav1.9	Promega	pGEMTEasy
<i>Scn1b</i>	NM_011322.3	Navβ1	Genomics	pCMV-SPORT6
<i>Scn2b</i>	NM_001014761.2	Navβ2	Genomics	pYX-Asc
<i>Scn3b</i>	NM_178227.4	Navβ3	Genomics	pCMV-SPORT6
<i>Scn4b</i>	NM_001013390.2	Navβ4	Genomics	pCR4-TOPO
<i>Slc8a1</i>	NM_001112798.2	NCX1	Genomics	pYX-Asc
<i>Slc8a2</i>	NM_148946.2	NCX2	Genomics	pYX-Asc
<i>Slc8a3</i>	NM_080440.3	NCX3	Genomics	pYX-Asc
<i>Nos3</i>	NM_008713.4	eNOS	GeneCust	pUC57
<i>Desmin</i>	NM_010043.2	Desmin	GeneCust	pUC57

Tableau 7 : Liste des vecteurs plasmidiques utilisés pour la RT-qPCR absolue

3. Etude moléculaire par RT-qPCR avec une méthode de quantification absolue

À partir des tissus artériels prélevés et conservés dans le Allprotect tissue reagent (Qiagen) à -20°C, les ARN ont été extraits par broyage tissulaire avec du Qiazol (#79306, Qiagen), du chloroforme (Sigma-Aldrich) et le miRNeasy Micro Kit (#74004, Qiagen), selon les recommandations du fabricant. Les ARN des différents modèles cellulaires tels que les cellules primaires isolées des MA et *Mile Sven 1* (MS1, lignée de CE microvasculaires des îlots de Langerhans de souris, ATCC®) ont également été extraits utilisant les mêmes réactifs. Une quantité comprise entre 300-500 ng a été transformée en ADN complémentaire (ADNc) avec le QuantiTect Reverse Transcription Kit (#205314, Qiagen). La PCR quantitative en temps réel a été réalisée avec 6 ng d'ADNc/point en utilisant le SYBR select master mix (#4472908, Applied Biosystems) sur le Light cycler 480 (Real Time PCR

system). Pour pouvoir quantifier le nombre de copies, les vecteurs plasmidiques spécifiques à chaque gène et dont on connaît la taille en pb ont été utilisés. Les concentrations des vecteurs comprises entre 2×10^{-5} et 2×10^2 amol/ μ L ont été utilisées afin d'établir les gammes étalons pour chaque gène. Le nombre précis de copies pour chaque quantité de vecteur a été calculé grâce à la formule suivante (Lee et al., 2006) :

$$\text{ADN (copie)} = \frac{6,02 \times 10^{23} (\text{copie. mol}^{-1}) \times \text{quantité d'ADN(g)}}{\text{Taille d'ADN(pb)} \times 660 (\text{g. mol}^{-1}. \text{pb}^{-1})}$$

Ainsi, les courbes de Ct (cycle threshold) en fonction de nombre de copies ont été établies pour chaque gène. Celles-ci ont été utilisées pour déterminer le nombre de copies d'un gène se trouvant dans les échantillons (Lee et al., 2006). Les vecteurs plasmidiques possédant les inserts ont été commandés chez différents fournisseurs (Tableau 5). La liste des oligonucléotides utilisés est représentée dans le tableau 6.

Gènes	Numéro d'accension	Protéines	Amorces sens (5'-3')	Amoces anti-sens (5'-3')
<i>scn1a</i>	NM_018733.2	Nav1.1	ttgcaaggggcttctgttta	agggtccacaactccgtcac
<i>scn2a</i>	NM_001099298.2	Nav1.2	gggttgcatatggtttccaa	cccaaggcatttgagttta
<i>scn3a</i>	NM_018732.3	Nav1.3	tcctcagtagtggtgcttgg	gatgtaagtgaagactttgtcagca
<i>scn4a</i>	NM_133199.2	Nav1.4	gaaaacatcacggtcatcc	tccgagagcttttcacagac
<i>scn5a</i>	NM_021544.4	Nav1.5	gccagatctctatggcaacc	ttgccttattcagcacgat
<i>scn8a</i>	NM_001077499.2	Nav1.6	ctggtgctggttgacttc	gccagggcattagcataa
<i>scn9a</i>	NM_001290674.1	Nav1.7	gctgagcctatcaatgcaga	acttgccagcatggaatct
<i>scn10a</i>	NM_001205321.1	Nav1.8	tggttagcttatggcttcaaa	ctatgagcctgtgagggaga
<i>scn11a</i>	NM_011887.3	Nav1.9	ttcataatgtgtgcaactgg	ttattgcacgtggaaccatc
<i>scn1b</i>	NM_011322.3	Nav β 1	tgctacaagaagattgctgctg	aatggccaggtattctgagg
<i>scn2b</i>	NM_001014761.2	Nav β 2	caggagtgaacaattgcacaga	gggttccttgagaactccac
<i>scn3b</i>	NM_178227.4	Nav β 3	cccctagcttctctagtgctca	ctgtctccgagggtactctaca
<i>scn4b</i>	NM_001013390.2	Nav β 4	tgaagaagaccgagagaaga	accgttctctgtgtgtca
<i>slc8a1</i>	NM_001112798.2	NCX1	ccatctagcgagcaca	tcgtcttctaattgagttgtcca
<i>slc8a2</i>	NM_148946.2	NCX2	cattacgaggatgctgtgg	catcatcactatcttgacctga
<i>slc8a3</i>	NM_080440.3	NCX3	ggaagccatcactgttagtgc	tgcatgacgtagcaagcag
<i>nos3</i>	NM_008713.4	eNOS	ccagtgccctgctcatc	gcagggcaagtaggatcag
<i>desmin</i>	NM_010043.2	Desmin	gccacctaccggaagctact	gcagagaaggctgtagtagaa

Tableau 8 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour la RT-qPCR absolue

4. Immunohistochimie

4.1. Western blot

Afin de vérifier l'expression protéique de NCX1 des cellules *Mile Sven 1* (MS1, #CRL-2279, ATCC®), les protéines de cette lignée cellulaire ont été extraites avec du tampon RIPA froid à pH 8 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Na deoxycholate 12 mM, SDS 0,1%, Triton X-100 1%) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et d'EDTA (1:100, #87786, Thermo Fisher Scientific). Après avoir laissé le tampon d'extraction agir pendant 30

min à 4°C, l'homogénat a été centrifugé à 14 000 g pendant 20 min à 8°C. Les protéines présentes dans le surnageant ont été quantifiées à l'aide du Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Les échantillons de 10 ou 30 µg de protéines ont été préparés dans une solution de Laemmli diluée au 1/5^{ème}. Après la dénaturation pendant 5 min à 90°C, les protéines ont été déposées et migrées sur un gel de polyacrylamide 10% puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. La présence des protéines a été vérifiée à l'aide d'une solution de rouge Ponceau. La membrane a été rincée trois fois avec une solution de TBS-Tween 0,1% puis a été saturée pendant 1h30 dans une solution de TBS-Tween 0,1% contenant BSA 5%. Ensuite, la membrane a été incubée pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-NCX1 obtenu chez le lapin (1/500, #ANX-011, Alomone) ou anti-HSC70 obtenu chez la souris (1/10000, #SC-7298, Santa Cruz), utilisée comme témoin de charge. L'anticorps secondaire a été incubé pendant 1h, puis les protéines ont été révélées à l'aide du kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific). La révélation des membranes a été effectuée par l'appareil de lecture LAS-3000 Imaging System.

4.2. Immunomarquage

Pour localiser les canaux Na_v et les NCX1 dans les différentes tuniques artérielles, un immunomarquage a été réalisé. Les artères cryoconservées dans l'OCT ont été coupées transversalement avec une épaisseur de 10 ou 12 µm à -25°C à l'aide d'un Cryostat (Leica). Les coupes d'artères ont été placées sur des lames SuperFrost Plus. Après avoir séché les lames 20 min à température ambiante, les coupes ont été réhydratées avec 500 µL de PBS pendant 10 min. Les coupes d'artères ont été perméabilisées avec 200 µL de PBS-BSA 10%-Triton 0,1% pendant 40 min, puis ont été saturées avec 200 µL de PBS-BSA 10% pendant 40 min. Les anticorps primaires dirigés contre les canaux Na_v (anti-PanNa_v obtenu chez le lapin, 1/200, #ASC-003, Alomone Labs) ou le NCX1 (anti-NCX1 obtenu chez la souris, 1/500, #R3F1, Swant) ont été incubés toute la nuit à 4°C à l'abri de la lumière. Les anticorps anti-CD31 couplé au FITC (1/50, #10-0311-85, eBiosciences) et le DAPI (1/500, Molecular probes, Invitrogen) ont été utilisés pour localiser respectivement l'endothélium et les noyaux. Après plusieurs lavages au PBS, les coupes d'artères ont été incubées avec l'anticorps secondaire conjugué Alexa Fluor 568 anti-lapin (1/200, #A10042, Invitrogen) ou anti-souris (1/200, #A11004, Invitrogen) pendant 3h à 4°C à l'abri de la lumière. Après le lavage, les coupes d'artères ont été montées entre lame et lamelle avec une goutte de milieu de montage Fluoromount G (#F4686, Sigma-Aldrich Merck) et ont été laissées pour sécher pendant 1h à l'abri de la lumière. La révélation a été effectuée à l'aide d'un microscope confocal Nikon Eclipse TE2000-S. L'acquisition des images a été réalisée par le logiciel Metamorph. Afin de vérifier la spécificité de l'immunomarquage, un contrôle négatif de la fluorescence a été réalisé sans les anticorps primaires.

5. Étude de la réactivité vasculaire des artères

5.1. Myographie

La myographie permet d'évaluer les forces contractiles induites par les segments d'artères en réponse à des molécules pharmacologiques. Pour réaliser cette technique, les deux types de MA, à savoir les FOMA et la CA ont été prélevés à partir des souris C57BL6/J mâles et femelles âgées de 5 mois. Après avoir disséqué le tissu

adipeux périvasculaire, les segments d'artères de 2 mm ont été montés entre 2 fils de Tungstène de 40 μm de diamètre dans une cuve du myographe contenant 5 mL de solution physiologique (en mM : NaCl 130 ; KCl 3,7 ; $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ 1,2 ; NaHCO_3 14,9 ; $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$ 1,6 ; HEPES 5 ; KH_2PO_4 1,2 ; D-glucose 11) avec un pH maintenu à 7,4 grâce au bullage (pO_2 160 mmHg et pCO_2 37 mmHg) (Figure 19.A). Le myographe est relié, d'un côté, à un micromètre permettant d'étirer les artères jusqu'à les aplanir afin d'appliquer une tension sur celles-ci et, de l'autre côté, à un transducteur de force permettant de mesurer la force contractile générée par les artères. Après avoir stabilisé la température du milieu à 37°C grâce à la plaque chauffante, les artères ont été prétendues de façon progressive jusqu'à 90 mmHg, puis laissées se stabiliser pendant 40 min. Le niveau de contraction maximale de chaque segment d'artère a été évalué par une solution riche en KCl (même composition que solution physiologique sauf NaCl 55,8 mM et KCl 78,8 mM) supplémentée de 3 μM de Phe (#P6126, Sigma-Aldrich). Afin de vérifier l'intégrité de l'endothélium, les artères ont été stimulées par la Phe (2 μM) puis Ach (2 μM , #A6625, Sigma-Aldrich) induisant une relaxation. Les artères ayant une vasorelaxation inférieure à 80% ont été exclues des résultats.

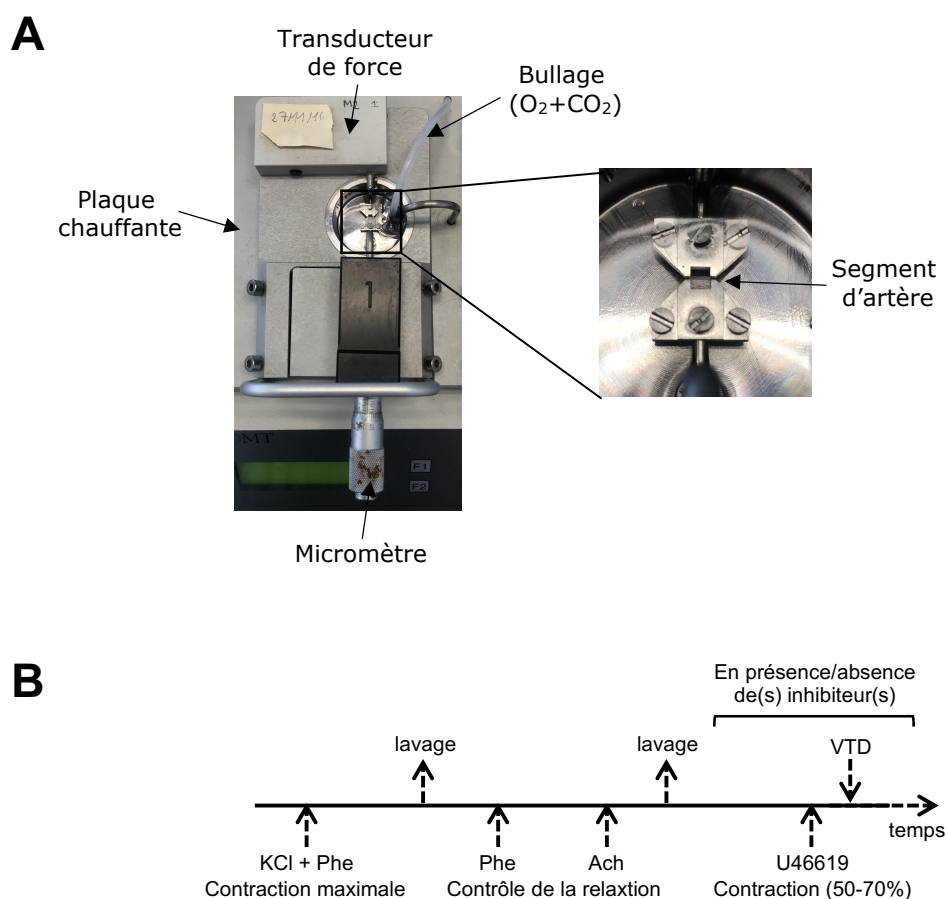


Figure 20 : Dispositif pour l'étude par myographie des petites artères et le protocole expérimental

(A) L'image illustre un segment d'artère mésentérique de souris montée dans une cuve du myographe placée sur une plaque chauffante. Le segment d'artère est monté entre deux fils de tungstène dont l'un est relié au transducteur de force et l'autre au micromètre permettant d'écarter la lumière de l'artère. La cuve contient une solution physiologique oxygénée et carbogénée par bullage avec un mélange de O_2 et CO_2 pour maintenir à pH

7,4. (B) Diagramme représentant le protocole expérimental. Ach : acétylcholine, Phe : phényléphrine, VTD : véralridine.

Pour caractériser le rôle des canaux Na_v dans le tonus vasculaire, les FOMA et CA ont d'abord été contractées à environ 50% de la contraction maximale par un analogue du thromboxane A₂, U46619 (15-90 nM, #16450, Cayman Chemical), puis elles ont été stimulées par 30 μM de VTD (activateur des canaux Na_v , #SC-201075, Santa Cruz) (Figure 19.B). Dans un premier temps, ce protocole a été réalisé en présence des différents antagonistes : la prazosine (PZ, 1 μM , antagoniste des α_1 -adrenocepteurs, #P7791, Sigma-Aldrich), l'atropine (AP, 100 nM, antagoniste des récepteurs muscariniques, #A0257, Sigma-Aldrich) et/ou la suramine (SUR, 100 μM , antagoniste des récepteurs P2Y, #S2671, Sigma-Aldrich), afin d'inhiber les effets de la noradrénaline, de l'Ach et de l'ATP libérés par les terminaisons nerveuses périvasculaires lors de l'application de la VTD. Les artères ont été pré-incubées avec ces antagonistes pendant 20 min avant la stimulation à la VTD. Dans un second temps, pour étudier les effets de la VTD observés au niveau des CA, le protocole a été réalisé en présence de L-NNA (20 μM , inhibiteur de NO synthase, #N5501, Sigma-Aldrich), de KB-R7943 (10 μM , inhibiteur des échangeurs NCX, #K4144, Sigma-Aldrich) ou de SEA0400 (1 et 10 μM , inhibiteur sélectif de NCX1, #SML2054, Sigma-Adrich). La TTX (bloqueur spécifique des canaux Na_v , #L8503, Latoxan) a été utilisée soit en pré-incubation, soit en application aigüe pour confirmer les effets de l'activation des canaux Na_v .

5.2. Artériographie

L'artériographie est une technique permettant d'évaluer la réactivité vasculaire en réponse à des variations de flux ou de pression dans une configuration physiologique des artères. La cuve d'artériographie est équipée d'un moniteur et d'un système d'analyse d'images permettant de mesurer le diamètre interne de l'artère (Henrion et al., 1997) (Figure 20). Ici, nous avons évalué la dilatation des artères en réponse aux flux croissants à une pression constante de 75 mmHg. Les FOMA et CA ont été prélevées à partir des souris C57BL/6J de 5 mois mâles et femelles (Figure 18), puis la graisse périvasculaire a été retirée. Chaque extrémité des artères a été canulée sur des micropipettes de verre placées dans la cuve d'artériographie, formant un circuit fermé. En amont de l'artère, la pompe 1 régule le volume entrant dans l'artère et générant un flux. En aval de l'artère, la pompe 2 contrôle le volume sortant. Ces deux pompes sont reliées au système de servo-contrôle maintenant la pression à 75 mmHg tout au long du protocole (Figure 20). Dans la cuve d'artériographie, les segments d'artère ont été plongés dans un bain de 10 mL de solution physiologique à 37°C (en mM : NaCl 130 ; KCl 3,7 ; $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ 1,2 ; NaHCO_3 14,9 ; $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$ 1,6 ; HEPES 5 ; KH_2PO_4 1,2 ; D-glucose 11) avec un pH maintenu à 7,4 grâce au bullage (pO_2 160 mmHg et pCO_2 37 mmHg). L'intégrité de chaque artère a été évaluée par application de la Phe (1 μM) puis de l'Ach (1 μM). Les artères développant une dilatation inférieure à 80% en réponse à l'Ach n'ont pas été prises en compte dans les résultats.

Pour évaluer la capacité dilatatrice en réponse au flux, les artères ont été contractées avec 1 μM de Phe. Après la stabilisation de la contraction, un flux croissant allant de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ a été appliqué avec une durée de 2-3 min pour chaque valeur de flux. Ce protocole a également été réalisé en présence de TTX pour étudier l'implication des canaux Na_v dans la DFD. Pour ce faire, les artères ont été pré-incubées avec 1 μM de TTX pendant 10 min avant l'application du flux. À la fin de chaque expérience, la contraction avec une solution

riche en KCl (80 mM) a été évaluée. Ensuite, les artères ont été placées dans une solution physiologique sans calcium ($\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$ remplacée par 2 mM d'EGTA) supplémentée de nitroprussiate de sodium (10 μM , #71778, Thermo Fisher Scientific) et de papavérine (100 μM , P3510, Sigma-Aldrich). Les valeurs croissantes de la pression (10 à 120 mmHg) ont été appliquées en absence du flux afin de déterminer le diamètre passif de chaque artère, correspondant au diamètre maximal de l'artère pour les pressions imposées.

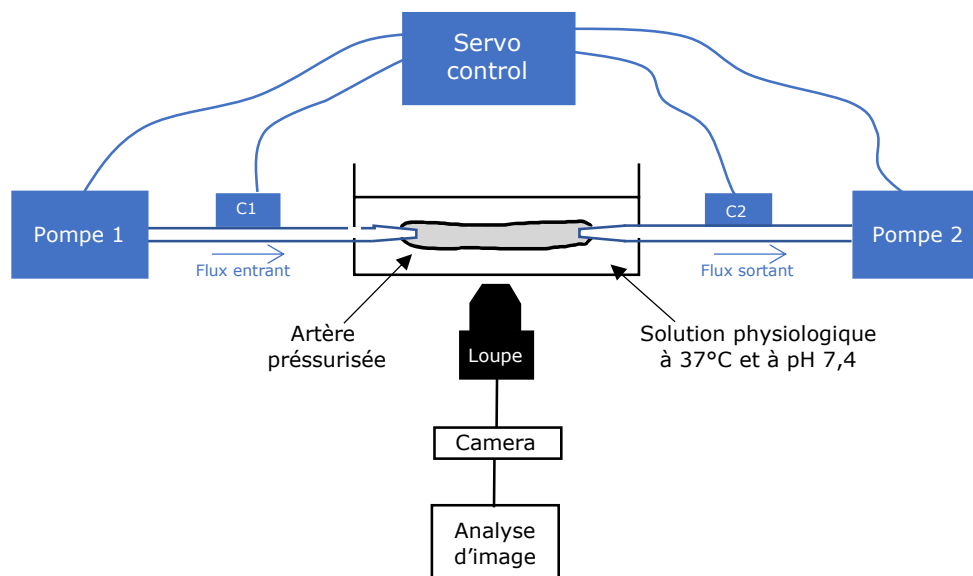


Figure 21 : Représentation schématique simplifiée de la configuration expérimentale pour l'artériographie

Le schéma illustre un segment d'artère monté entre deux micropipettes de verre dans une cuve d'artériographie, formant un circuit fermé. Les micropipettes sont reliées aux tuyaux puis aux pompes 1 et 2. Les capteurs (C1 et C2) placés sur les tuyaux mesurent la pression. La solution physiologique est maintenue à 37°C et à pH 7,4 par un bullage. Une loupe reliée à une caméra enregistre la variation du diamètre de l'artère.

6. Dosage du Ca^{2+} intracellulaire par le Fura-2-AM

Pour l'étude de la signalisation Ca^{2+} , nous avons utilisé deux modèles cellulaires : 1) CE mésentériques primaires de C57BL/6 (#M1168, Cell biologics) et 2) la lignée cellulaire endothéliale MS1 (#CRL-2279, ATCC®) qui sont des CE issues de la microcirculation des îlots de Langerhans de souris. Les CE mésentériques primaires ont été cultivées dans le milieu adapté recommandé par le fournisseur (#M1168, Cell Biologics) et les cellules MS1 ont été cultivées dans un milieu DMEM/F12 (#P04-41550, PAN Biotech) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (#CVFSVF00-01, Eurobio Scientific), 1% de pénicilline/streptomycine (#P06-07100, PAN biotech) et 1% de L-glutamine (#P04-80100, PAN Biotech) dans un incubateur à 37°C et 5% de CO_2 . Lors des passages et pour l'utilisation des cellules, une solution de trypsine/EDTA a été utilisée pour décoller les cellules. Les cellules ont étéensemencées dans une microplaque noire à fond plat transparent de 96 puits (Corning®, Costar). 9 000 cellules de CE mésentériques primaires et 20 000 cellules de MS1 ont été déposées dans 100 μL de milieu adapté par puit. La microplaqueensemencée a été incubée pendant 24h à 37°C, 5% de CO_2 , temps nécessaire pour l'adhésion cellulaire.

Pour procéder au dosage de la mobilisation Ca^{2+} cytoplasmique, une sonde Ca^{2+} fluorescente ratiométrique Fura-2-acétoxyméthyl ester (Fura-2-AM, #F1201, Invitrogen) a été utilisée. Les cellules ont d'abord été lavées avec le tampon Ca^{2+} puis incubées avec le tampon Fura (Fura-2-AM 5 μM et acide pluronique 0,02% dissous dans le tampon Ca^{2+}) pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après avoir lavé 2 fois les cellules, elles ont été incubées dans le tampon Ca^{2+} pendant 45 min à température ambiante et à l'abri de la lumière afin de procéder la desestérification complète du Fura-2-AM en Fura-2. Ensuite, afin d'évaluer la variation de la $[\text{Ca}^{2+}]$ cytoplasmique, la microplaque a été introduite dans la FlexStation® 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices). Les cellules ont été excitées aux longueurs d'ondes 340 et 380 nm. L'émission de la fluorescence a été enregistrée à 510 nm pendant 180 sec avec 0,25 Hz de fréquence d'acquisition par le logiciel de SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices). Les cinétiques de la fluorescence du Fura-2 sont représentées grâce au ratio de l'émission de fluorescence ($I_{\text{ex } 340 \text{ nm}}/I_{\text{ex } 380 \text{ nm}}$). Pour étudier les effets de l'activation des canaux Na_v , 1 et 10 μM de BTX (#L8301, Latoxan) et de PbTX (fournie par Andréa Bordelais d'University of North Carolina Wilmington) ont été automatiquement injectés dans les puits après 30 sec de lecture. Afin de mimer l'activation de la voie du NO, les cellules ont été stimulées par l'Ach (de 0,1 nM à 10 μM). Pour étudier les effets de l'inhibition des NCX, les deux inhibiteurs de NCX : KB-R7943 (10 μM) et SN-6 (10 μM) ont été co-injectés avec l'Ach. La stimulation des cellules par l'Ach a également été réalisée dans un tampon appauvri en Na^+ (Low Na^+ buffer) ou dépourvu de Ca^{2+} (Ca^{2+} free buffer) (Tableau 7). Afin de vider le stock interne de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique, les cellules ont été pré-incubées avec la thapsigargine (5 μM , inhibiteur de pompe SERCA, #586005, Calbiochem) pendant 15 min avant l'injection de l'Ach. L'AP (1 μM) a été utilisée pour valider la spécificité de la réponse à l'Ach. L'ensemble des expériences a été réalisé en triplicata et répété 3 fois.

Tampon Ca^{2+}		« Low Na^+ buffer »		« Ca^{2+} free buffer »	
Molécules	Concentration (mM)	Molécules	Cocnetration (mM)	Molécules	Cocnetration (mM)
KCl	5,33	KCl	5,33	KCl	5,33
KH_2PO_4	0,41	KH_2PO_4	0,41	KH_2PO_4	0,41
NaCl	137,93	Chlorure de choline	137,93	NaCl	137,93
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,34	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,34
D-Glucose	5,56	D-Glucose	5,56	D-Glucose	5,56
CaCl_2	2,50	CaCl_2	2,50	EGTA	2,50
MgCl_2	1,00	MgCl_2	1,00	MgCl_2	1,00
Hepes	5	Hepes	5	Hepes	5
BSA	0,5 (%)	BSA	0,5 (%)	BSA	0,5 (%)

Tableau 9 : Composition des tampons utilisés pour le dosage du Ca^{2+} intracellulaire

De gauche à droite, les tableaux illustrent la composition des 3 tampons utilisés : tampon Ca^{2+} (tampon de contrôle), tampon Ca^{2+} appauvri en Na^+ (Low Na^+ buffer) et tampon sans Ca^{2+} (Ca^{2+} free buffer). La concentration des molécules sont représentées en mM sauf pour la BSA (%)

7. Analyses statistiques

Les données sont représentées en moyenne \pm SEM (Standard error of the mean). Les courbes et les histogrammes ont été établis à l'aide du logiciel GraphPad PRISM (version 8.0). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du même logiciel. La normalité de la distribution des résultats a été évaluée grâce au test de Shapiro-Wilk. La significativité entre les différents groupes ou les différentes conditions a été évaluée par des tests paramétriques ou non paramétriques, selon si les données obtenues suivaient une distribution normale. L'analyse entre deux groupes a été effectuée grâce au test t (test paramétrique, résultats appariés ou non appariés), au test de Wilcoxon (test non paramétrique pour les résultats appariés) ou au test de Mann-Whitney (test non paramétrique pour les résultats non appariés). La comparaison multiple a été réalisée grâce au test de Kruskal-Wallis (pour les résultats non appariés) ou au test de Friedman (pour les résultats appariés) suivi d'un test de Dunn. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les symboles suivants signifient : ns non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

RÉSULTATS

1. Étude n°1 : Contribution des canaux Na_v dans le tonus vasculaire et leur remodelage transcriptionnel dans les modèles physiopathologiques

L'expression des canaux Na_v a été décrite dans la littérature dans différents types d'artères et dans des espèces différentes, à savoir l'aorte (Homme, rat, souris, lapin et boeuf), les artères pulmonaires (Homme), les artères fémorales (rat), les artères coronaires (Homme), les artères crémastériques (souris), les artérioles cutanées (Homme), les artères utérines (Homme) et les MA (rat) (Andrikopoulos et al., 2011b; Bocquet et al., 2010; Fort et al., 2009; Meguro et al., 2009; Traub et al., 1999; Platoshyn et al., 2005; Jo et al., 2004; Bocquet et al., 2010; Figueroa et al., 2007; Frank L Rice et al., 2015; Virsolvy et al., 2021; Ho et al., 2013). En outre, l'identification précise de leurs isoformes a été rapportée pour les CE et les CMLV à l'aide des techniques de RT-PCR ou RT-qPCR relative, voire de l'immunomarquage. Par exemple, les transcrits *SCN5A*, *8A* et *9A* ont été détectés dans les CMLV des artères pulmonaires humaines par RT-PCR (Jo et al., 2004). Le transcrite codant $\text{Na}_v1.7$ a été identifié dans les CMLV de l'aorte à la fois chez l'Homme et chez le lapin (Meguro et al., 2009). Quant aux CE, les isoformes $\text{Na}_v1.2$, 1.6 et 1.9 ont été mises en évidence dans les artères crémastériques de souris (Figueroa et al., 2007) et l'isoforme $\text{Na}_v1.7$ dans les artérioles cutanées humaines par immunohistochimie (Frank L Rice et al., 2015). Les canaux Na_v exprimés dans les cellules vasculaires se sont avérés fonctionnels. En effet, plusieurs études électrophysiologiques ont enregistré les courants Na^+ supprimés par la TTX dans les CMLV des artères pulmonaires, des artères coronaires, de l'aorte, des MA, des artères utérines (Berra-Romani et al., 2005; Boccara et al., 1999; Cox, 2005; Jo et al., 2004; Meguro et al., 2009; Okabe et al., 1988; Platoshyn et al., 2005; Quignard et al., 1997; Virsolvy et al., 2021, 2015) et dans les CE des artères interlobaires rénales et des microvaisseaux cardiaques (Gordienko and Tsukahara, 1994; Walsh et al., 1998).

Au début de ma thèse, quelques études ont démontré l'implication des canaux Na_v dans la contractilité des artères de conductance comme l'aorte et les artères fémorales chez l'Homme et chez le rat (Bocquet et al., 2010; Fort et al., 2009; Ho et al., 2013; Shinjoh et al., 1991; Virsolvy et al., 2015). Cependant, très peu de données concernant les artères de résistance ont été publiées. Seuls deux articles ont suggéré un potentiel rôle physiologique des canaux dans la résistance périphérique, sur la base de la réactivité à la VTD. En revanche, les auteurs ont observé des effets différents de la toxine, à savoir une vasodilatation des artères crémastériques de souris et une vasoconstriction des MA de rat (Figueroa et al., 2007; Ho et al., 2013).

Ces réponses différentes nous ont menés à étudier le rôle précis des canaux Na_v dans la vasomotricité des artères de résistance. Par ailleurs, les MA de souris, qui sont un modèle adéquat des artères de résistance, n'ont jamais été exploitées dans ce contexte. Dans cette première étude, nous avons donc voulu caractériser l'expression des canaux Na_v dans plusieurs types d'artères de souris, notamment les MA. Les modèles cellulaires des CE et les CMLV ont également été explorés afin de déterminer la distribution des canaux Na_v à l'échelle cellulaire au sein des MA. Ensuite, dans le but d'approfondir le rôle de ces canaux dans la vasomotricité, nous avons étudié l'impact de la TTX sur le tonus vasculaire.

Enfin, *Meguro et al.* ayant publié que l'expression du sous-type $\text{Na}_v1.7$ est augmentée dans un modèle d'hyperplasie intimale aortique (Meguro et al., 2009), l'hypothèse de leur implication dans la mise en place de mécanismes physiopathologiques a alors été émise. Nous avons donc envisagé de caractériser d'éventuelles variations de la transcription des gènes des canaux Na_v dans les artères des modèles murins physiopathologiques

d'HTA et de vieillissement. Cette étude est présentée sous la forme d'un article suivi de quelques résultats supplémentaires.

1.1. Article n°1

**New insights into the role of voltage-gated Na⁺ channels in arteries:
contribution to vascular tone and transcriptional remodeling in physiopathological models**

Joohee Park, Coralyne Proux, William Ehanno, Emilie Vessières, Julie Favre, Gilles Kauffenstein,
César Mattei, Hélène Tricoire-Leignel, Daniel Henrion, Claire Legendre, Christian Legros

Refusé dans le journal « Vascular pharmacology »
Nouvelle prochaine soumission dans le journal « *Molecules* »

1 **New insights into the role of voltage-gated Na⁺ channels in arteries:**
2 **contribution to vascular tone and transcriptional remodeling in**
3 **physiopathological models**

4
5 **Joohee Park¹, Coralyne Proux¹, William Ehanno¹, Emilie Vessières¹, Julie Favre¹, Gilles**
6 **Kauffenstein^{1,2}, César Mattei¹, Hélène Tricoire-Leignel¹, Daniel Henrion¹, Claire Legendre¹,**
7 **Christian Legros^{1,*}**

8 ¹Univ Angers, INSERM, CNRS, Equipe CarME, SFR ICAT, ANGERS, FRANCE

9 ²present address : UMR INSERM 1260, CRBS, Strasbourg University, STRASBOURG,
10 FRANCE

11 * Correspondence: christian.legros@univ-angers.fr (C. Legros), Tel.: +33-244 688 273

12
13 **Abstract**

14 Voltage-gated sodium (Nav) channels are expressed in both endothelium and media of arteries and their
15 implication has been suggested in vasomotor control. However, their functions are not understood in physiological
16 and pathological conditions. Here, Nav channels were immunolocalized in endothelium and media of mesenteric
17 arteries (MA) and aorta, in which *Scn2a*, *Scn1b* and *Scn2b* were the most abundant transcripts measured by
18 absolute RT-qPCR. We investigated the role of Nav channels in vascular tone of MA. The Nav channel blocker,
19 tetrodotoxin (TTX) suppressed U46619-induced contraction and potentiated flow-mediated dilation response of
20 isolated MA, indicating the contribution of Nav channels of myocytes to contractile responses. In aorta, the
21 expression of *Scn2a* was decreased by 5-fold in angiotensin II-induced hypertensive mice and by 2.5-fold during
22 aging compared to controls. In aorta from hypertensive mice, *Scn1b* and *Scn2b* transcription decreased by 2-fold
23 and 3.3-fold, respectively. In MA, we only observed an increase of *Scn2b* expression level by 3.7-fold in old mice
24 compared to young mice. In conclusion, our data evidence a contribution of Nav channels in vascular tone and in
25 shear stress mechanosensing. Moreover, the transcriptional changes of *Navα* and *Navβ* subunit genes in aorta in
26 hypertension and aging models suggest their involvement in the pathomechanism of vascular dysfunction.

27
28 **Keywords**

29 Voltage-gated Na⁺ channels, aorta, mesenteric arteries, arterial hypertension, aging, transcriptional remodeling

30 **Highlights**

- 31 • Voltage-gated Na⁺ channels are expressed in endothelium and media of arteries.
- 32 • Voltage-gated Na⁺ channels contribute to vascular tone of murine resistance arteries.
- 33 • Voltage-gated Na⁺ channels are involved in shear stress mechanotransduction.
- 34 • *Scn2a* expression is downregulated in aorta from hypertensive and old mice.

35

36 **Abbreviations**

37 Ach, acetylcholine; AP, atropine; CA, cecocolic arteries; EC, endothelial cells; FOMA, first-order mesenteric
38 arteries; MA, mesenteric arteries; Nav channels, voltage-gated Na⁺ channels; Phe, phenylephrine; PZ, prazosin;
39 VSMC, vascular smooth muscle cells; VTD, veratridine; SUR, suramin; TTX, tetrodotoxin.

40

41 **Introduction**

42 Voltage-gated Na⁺ (Nav) channels are members of the voltage-gated ion channel superfamily, consisting in
43 a pore-forming α -subunits (Nav1.1-9) encoded by 9 distinct genes (*Scn1a-5a*, *Scn8-11a*) with one or two auxiliary
44 subunits (Nav β 1-4) encoded by four genes (*Scn1b-4b*) in mammals [1]. Nav channels are pharmacologically
45 classified according to their sensitivity to tetrodotoxin (TTX): in TTX-sensitive (TTX-S) Nav channels (IC₅₀ in
46 the nanomolar range) and in TTX-resistant (TTX-R) Nav channels (IC₅₀ in the micromolar range) [2]. By allowing
47 the Na⁺ influx through the plasma membrane of excitable and non-excitable cells, Nav channels exhibit different
48 physiological roles [1,3]. In excitable cells, Nav channels are key components of electrical signaling, allowing the
49 generation of action potential and their propagation [1]. In non-excitable cells, they play noncanonical roles, such
50 as i) Na⁺/K⁺-ATPase and cell death regulation in astrocytes, ii) ATP release in keratinocytes for sensory
51 transduction, iii) phagocytosis invasion of macrophages, iv) Ca²⁺ entry and positive selection of CD4⁺ of T
52 lymphocytes and vi) invasiveness and migration of numerous cancer cells [3–9]. In the vasculature, Nav channels
53 are expressed and generate Na⁺ currents in both endothelial cells (EC) and vascular smooth muscle cells (VSMC)
54 isolated from aorta, pulmonary, mesenteric, coronary, uterine and cremaster arteries [10–23]. Their involvement
55 in vascular contractile response have been demonstrated in rat mesenteric arteries (MA) [16]. Moreover, Nav
56 channels endogenously expressed in EC have been suggested to participate to conducted vasodilator response in
57 murine cremaster arteries [20]. In addition, endothelial Nav channels could be activated by shear-stress [24] and
58 participate to VEGF-MAP-Kinase signaling associated with proliferation, migration and tubulogenesis of EC [21].
59 It has been shown that vascular Nav channels are functionally coupled with Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX), mediating
60 Ca²⁺ entry and thereby the contraction of VSMC or angiogenesis activation of EC [16,21].

61 Nav channels has been also suggested to be involved in physiopathological mechanisms of vascular diseases.
62 In an intimal hyperplasia model, Nav1.7 channel which expression increased in aortic myocytes after balloon
63 injury may be involved in arterial remodeling [14]. In hypoxic condition, it has been shown that Nav channels
64 mediate the arterial contractility elevation of rat femoral [25] and human uterine arteries [23]. However, these
65 reports led to controversial conclusions. Nav channel inhibition was proposed as therapeutical strategy to prevent
66 deleterious increase of arterial tonus induced by hypoxia [25], while the enhancement of vasomotion through Nav
67 channel activation has been proposed to be a protective mechanism against tissue hypoperfusion [23].

68 In this work, we characterized the gene expression profile of α and β Nav channel subunits in a conductance
69 artery (aorta), and a resistant artery (MA) from mice. By using immunochemistry and absolute RT-qPCR, we
70 showed that both arteries mainly expressed Nav1.2 isoform with Nav β 1. TTX abolished U46619-contraction of
71 MA, demonstrating that endogenous Nav channels contribute to vascular tone. Besides, TTX potentiated flow-
72 mediated dilation response in MA, suggesting that Nav channels are implicated in shear stress mechanosensing.
73 Finally, Nav channels gene expression was modulated in angiotensin II-induced hypertensive mice and during
74 aging. These outcomes bring new insights into the contribution of Nav channels in vascular tone regulation and
75 their putative implication in pathomechanism of vascular dysfunction.

76 **Materials and Methods**

77 **Chemicals and reagents**

78 TTX was from Latoxan (Valence, France). Veratridine (VTD) was from Santa Cruz Biotechnology (Dallas,
79 Texas, USA). Sodium nitroprusside and Optical Cutting Temperature (OCT) compound were from Thermo Fisher
80 Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). All other reagents such as acetylcholine (Ach), phenylephrine (Phe),
81 prazosin, atropine, suramin and papaverine were obtained from Sigma-Aldrich Merck (Saint-Louis, MO, USA).

82 **Ethical approval, animals and artery preparations**

83 All animal experiments were conducted in accordance with the European Community council directive
84 2010/63/EU for the care and use of laboratory animals. The experimental procedures used in this work were
85 approved by our respective local ethical committees in addition to the French Ministry of Agriculture (N^o
86 A49007002, APAFIS#24014-202001311653562 authorization). The NC3R's ARRIVE guidelines were followed
87 in the conduct and reporting of all experiments using animals. Five-months-old (5M) and 18-month-old (18M)
88 male mice C57BL/6j (Janvier Labs, France) were used in this work. Animals were housed in individual cages
89 (internal dimensions in mm: 369 x 165 x 132, L x W x H for 5 mice) in controlled temperature room (21–23 °C)

90 of the Animal Facilities Unit of the Hospital University of Angers (SCAHU). They were maintained under a 12 h
91 light/dark cycle with free access to water and food.

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

102 **Blood pressure measurement and angiotensin II-induced hypertension**

103 Hypertension was induced by angiotensin II (AngII)-infusion in 5-month C57BL/6j male mice with 0.5
104 mg/kg/day for 4 weeks. Mice were randomly divided in two groups: AngII-treated group and control group. To
105 induce arterial hypertension, osmotic minipumps (model 2004/0.5Ang-4w, Alzet, Cupertino, CA) releasing AngII
106 (Bachem, Bubendorf, Switzerland; no. 4006473, solubilized in NaCl 0.9%) were subcutaneously inserted under
107 isoflurane anesthesia (2%). The control group (sham) underwent the same procedure without AngII-treatment. To
108 reduce pain, subcutaneously injection of buprenorphine (Temgesic, 0.1 mg/kg) was performed before surgery. The
109 systolic blood pressure (SBP) of mice was measured by photoplethysmography (BP-2000 Blood Pressure Analysis
110 System; Visitech Systems). Mice were habituated to the procedure for 1 week and then, SBP was daily monitored
111 for 1 week before and 4 weeks after surgery, according to AngII-infusion protocol. At the end of AngII-treatment,
112 mice were sacrificed with CO₂. Aorta and MA were isolated and stored at -20 °C in Allprotect Tissue Reagent
113 (Qiagen) for RT-qPCR characterization.

114 **Isolation of endothelial and smooth muscle cells from mesenteric arteries**

115 EC and VSMC were isolated from two 10-month C57BL/6j males. The mesenteric bed was ligated below
116 the duodenum and above the caecum and, then excised. All the arteries from the first to the fourth order of the
117 mesenteric bed were dissected and placed in a digestion solution composed of Endothelial Cell Growth Basal
118 medium 2 (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 1000 IU of collagenase type 2. The arteries were cut

119 into pieces using sterilized micro-scissors, and they were incubated with gentle agitation at 37°C in 5% CO₂
120 incubator for 45 min. The suspension obtained was filtered through a 30 µm Miltenyi filter and then centrifuged
121 10 min at 300 g. CD146-labeled Miltenyi Microbeads were added to the cell pellets and incubated for 15 min at
122 4°C. Cells were washed before magnetic separation onto MS Miltenyi column. The cells that were not retained
123 onto the column were seeded after washing in DMEM F12, supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) in 6-
124 well plate and were morphologically identified as non-endothelial cells. The cells retained by the column were
125 eluted and then washed before being seeded into 12-well plate in Endothelial Growth medium Micro Vascular
126 (EGM2MV) with 20% FCS. After 24-48 h incubation at 37°C in 5% CO₂ incubator, cells were washed and
127 cultured until confluence in EGM2MV medium (Lonza).

128 **Immunohistochemistry**

129 Aorta and MA frozen in embedding medium were transversally cryosectioned at 10 or 12 µm thick by
130 Cryostat (Leica) at -25°C. Artery slices were transferred to SuperFrostPlus slides (Thermo Fisher Scientific, USA)
131 and dried at room temperature. Immunofluorescence staining is processed using the rabbit primary anti-PanNav
132 (1:200, SP19, ASC-003, Alomone labs) or the rabbit primary anti-Navβ1 (1:100, ASC-041, Alomone labs), and/or
133 the rabbit primary anti-PECAM1 antibodies (anti-CD31 labeled with FITC, 1:50, eBioscience, USA) overnight at
134 4°C. Nuclei were stained with DAPI 10 µg/mL (Molecular probes, Invitrogen). After washing, arteries were
135 incubated with Alexa fluor 568 conjugated goat anti-rabbit antibodies (1:200, Invitrogen) for 3 h. After washing,
136 the aqueous mounting medium (Fluoromount, Sigma-Aldrich Merck, USA) was used before placing a lamella on
137 slide. Fluorescent staining was visualized using a confocal microscope Nikon Eclipse TE2000-S. The imaging
138 acquisition was performed with Metamorph software (Molecular Devices, California, USA). Negative control
139 experiments excluding the primary antibody were performed to verify the specificity of the immunofluorescence
140 labelling.

141 **RNA extraction and RT-qPCR**

142 Total RNAs were extracted from arteries using the RNeasy micro kit (Qiagen) as described, previously
143 (PMID: 33264773, JVR Daniel 2021). At least 300 ng (up to 1 µg, depending on RNA extraction yield) of total
144 RNA were used for cDNA synthesis using random hexamers and the QuantiTect Reverse Transcription kit
145 (Qiagen). RT-PCR experiments were run on a LightCycler 480 Instrument II (Roche, Meylan, France) using
146 Sybr® Select Master Mix (Applied Biosystems®). PCR were performed with 4 or 6 ng of cDNA in duplicate and
147 Nav channel gene-specific primers (Table 1), which were designed using the Primer3 Software. Differences in

148 transcript expression levels were determined using the cycle threshold method, as described earlier [26]. Peak-
149 melting curve was performed at the end of the amplification process to check amplification specificity and
150 amplicon sizes were verified by agarose gel electrophoresis. Relative quantification of gene expression was
151 normalized to the mean of expression of three validated housekeeping genes using the $2^{-\Delta C_t}$ method, where C_t is
152 the threshold cycle: GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), HPRT (hypoxanthine
153 phosphoribosyltransferase) and GUSB (beta-glucuronidase). For absolute quantification method, synthetic cDNA
154 spanning each PCR amplicons were cloned into pUC57 or its derivatives. All cDNA sequences were verified by
155 sequencing (DNA sequencing facility of Angers CHU) and compared to those available in the GenBank. For
156 absolute quantification, cDNA copies were evaluated using the calibration curve method, which consist in the
157 recombinant double stranded plasmid DNA molecule determination as already described [27]. The cDNA copy
158 numbers of eight dilutions of pure plasmids were used to build the calibration curves for each gene, allowing PCR
159 efficiency determination (~100% for each gene).

160 **Myography**

161 Cecocolic arteries (CA) were macrodissected under microscope from MA of 5-month male mice (fig. 1A).
162 Arterial rings of 2 mm length were mounted in a Mulvany-Halpern-type wire myograph (Danish MyoTechnology,
163 DMT, Aarhus, DK). 2 tungsten wires with 40 μm diameter were inserted into the arterial lumen and fixed to a
164 micrometer and a force transducer. Arterial segments were bathed in a 5 mL PSS maintained at 37°C and at pH
165 of 7.4 (pO₂ 160 mmHg and pCO₂ 37 mmHg). Arterial wall tension was normalized and then, arteries were
166 stabilized for 40 min. To evaluate the maximal contractile capacity, a K⁺ rich PSS (80 mM) with 3 μM Phe was
167 used. To control the endothelial integrity, contraction was induced with 2 μM Phe, and then 2 μM Ach was added
168 to elicit vasorelaxation. To investigate the involvement of Nav channels in vascular reactivity, first, a cocktail of
169 prazosin (PZ, 1 μM) and atropine (AP, 100 nM) or a cocktail of PZ, AP and suramin (SUR, 100 μM) was added
170 in the medium to inhibit the effects of noradrenaline, Ach and ATP, respectively, which could be released by
171 terminal nerve endings. Afterwards, U46619 (10 to 100 nM, thromboxane A₂ analogue) was applied to reach
172 50% of maximal contraction, followed by VTD at 30 μM . After the stabilization of VTD-induced effects, 1 μM
173 TTX was added in the bath.

174 **Flow-mediated dilation in mesenteric arteries**

175 MA were harvested from male 5-month mice. CA and first order MA (FOMA) (Fig. 1A) were cannulated at
176 both ends on glass microcannulas mounted in a video-monitored perfusion system [28] (Living System, LSI,

177 Burlington, VT, USA). Each artery segment was bathed in a 10 mL PSS maintained at 37°C and at pH of 7.4 (pO₂
178 160 mmHg and pCO₂ 37 mmHg). The perfusion of the arteries was monitored with two peristaltic pumps, one
179 controlling the flow rate and the other under the control of a pressure-servo control system. The pressure was set
180 at 75 mmHg. Contraction to Phe (1 μM) and dilation to Ach (1 μM) were assessed. Afterwards, to evaluate flow-
181 mediated dilation (FMD), we constricted the arteries with phenylephrine (1 μM) and then, increased flow (3 to 50
182 μL/min) by steps. To investigate the involvement of Nav channels in FMD, the experiments were carried out with
183 or without TTX (Nav channel blocker, 1 μM). At the end, contraction to KCl (80 mM) was tested and arteries
184 were bathed in a Ca²⁺-free PSS with sodium nitroprusside (10 μM) and papaverine (100 μM). Pressure steps from
185 10 to 125 mmHg were performed to determine the passive diameter of the arteries.

186 **Data acquisition and analyses**

187 The recording of myography and arteriography data were performed with AcqKnowledge software (Biopac,
188 CA, USA). Statistical analysis and graphs were made with GraphPad Prism 7.02 software (La Jolla, CA, USA).
189 The non-parametric Mann-Whitney test was used to analyze data from independent groups. The myography data
190 were analyzed using the Friedman test (ns: not significant, * for p<0.05, ** for p<0.01, *** for p<0.001).

191 **Results**

192 **Nav channels are expressed in both intima and media of murine arteries**

193 To characterize the expression of Nav channels, we used aorta and two distinct segments of MA, called first
194 order MA (FOMA) and cecocolic arteries (CA) from mice (Fig. 1A). By immunohistochemistry we showed that
195 Nav channels are expressed in FOMA, CA and aortae (Fig. 1). A strong immunofluorescence labelling with anti-
196 PanNav antibodies was observed in both intima and media of FOMA, CA and aortae (Fig. 1B and C). A clear co-
197 immunodetection of Nav channels and PECAM1 was observed in endothelium of FOMA and CA (Fig. 1B). In
198 addition, Navβ1 subunit was immunodetected in aorta (Fig. 1C). Altogether, these immunohistochemical data
199 indicate the expression of Nav channels at the protein level in both MA and aorta from mice.

200 To establish the gene expression pattern of Nav channel isoform, RT-qPCR with absolute quantification were
201 performed on MA and aorta, allowing the comparison of expression levels of all Nav channel genes from each
202 other. In aorta, *Scn2a* and *Scn3a* encoding Nav1.2 and Nav1.3 were detected, while *Scn2a* and *Scn5a*, encoding
203 Nav1.2 and Nav1.5 were seen in MA (Fig. 2A-C). In both arteries, *Scn2a* appears to be the most abundant
204 transcript. In FOMA and CA, *Scn5a* expression levels were very low (<6 copies, Fig. 2B and C).

205

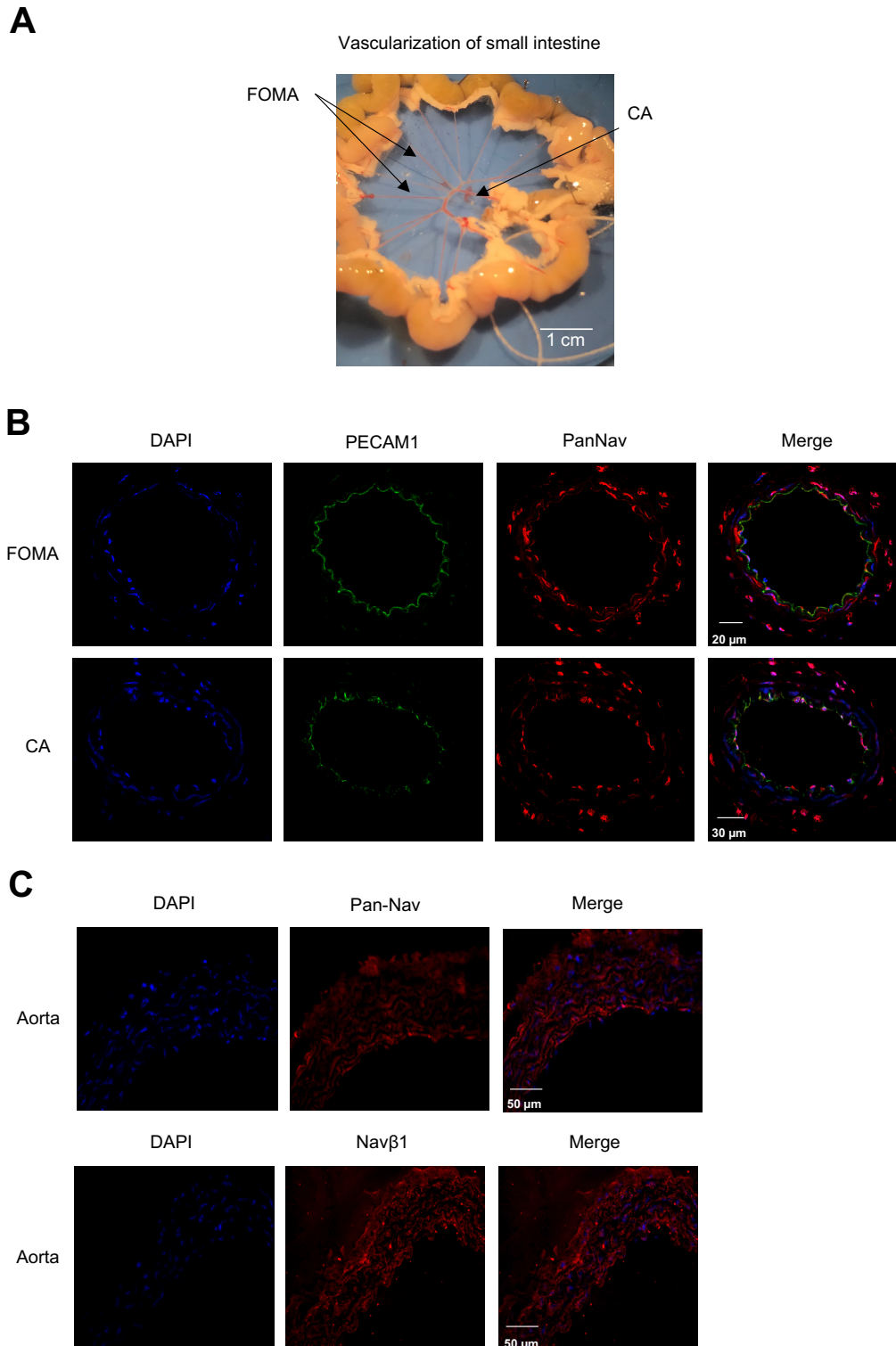


Fig. 1. Immunolocalization of Nav channels in murine arteries. (A) Image representing murine mesenteric arteries and their different branches: cecocolic artery (CA) and first order mesenteric arteries (FOMA). (B) Immunodetection of Nav channels in FOMA and CA. Nav channels were detected by anti-PanNav antibodies (red). Endothelium was indicated by anti-PECAM1 antibodies (green). Overlay images (right) show the expression of Nav channels in both intima and media of FOMA and CA. (C) Immunolocalization of Nav channels and Navβ1 subunit in aorta. Nav channels and Navβ1 were identified using anti-PanNav antibodies (upper pannel, red) and anti-Navβ1 antibodies (lower pannel, red), respectively. Nucleus was detected by DAPI (blue) on all images. White arrows indicate the endothelium.

207 Concerning isolated EC and VSMC from MA, in addition to *Scn2a* and *Scn5a* which were also detected in FOMA
 208 and CA, one additional α isoform gene *Scn3a* was detected (Fig. 2D and E). In isolated EC and VSMC, the
 209 expression levels of *Scn2a*, *Scn3a* and *Scn5a* were not significantly different from each other (Fig. 2D and E).

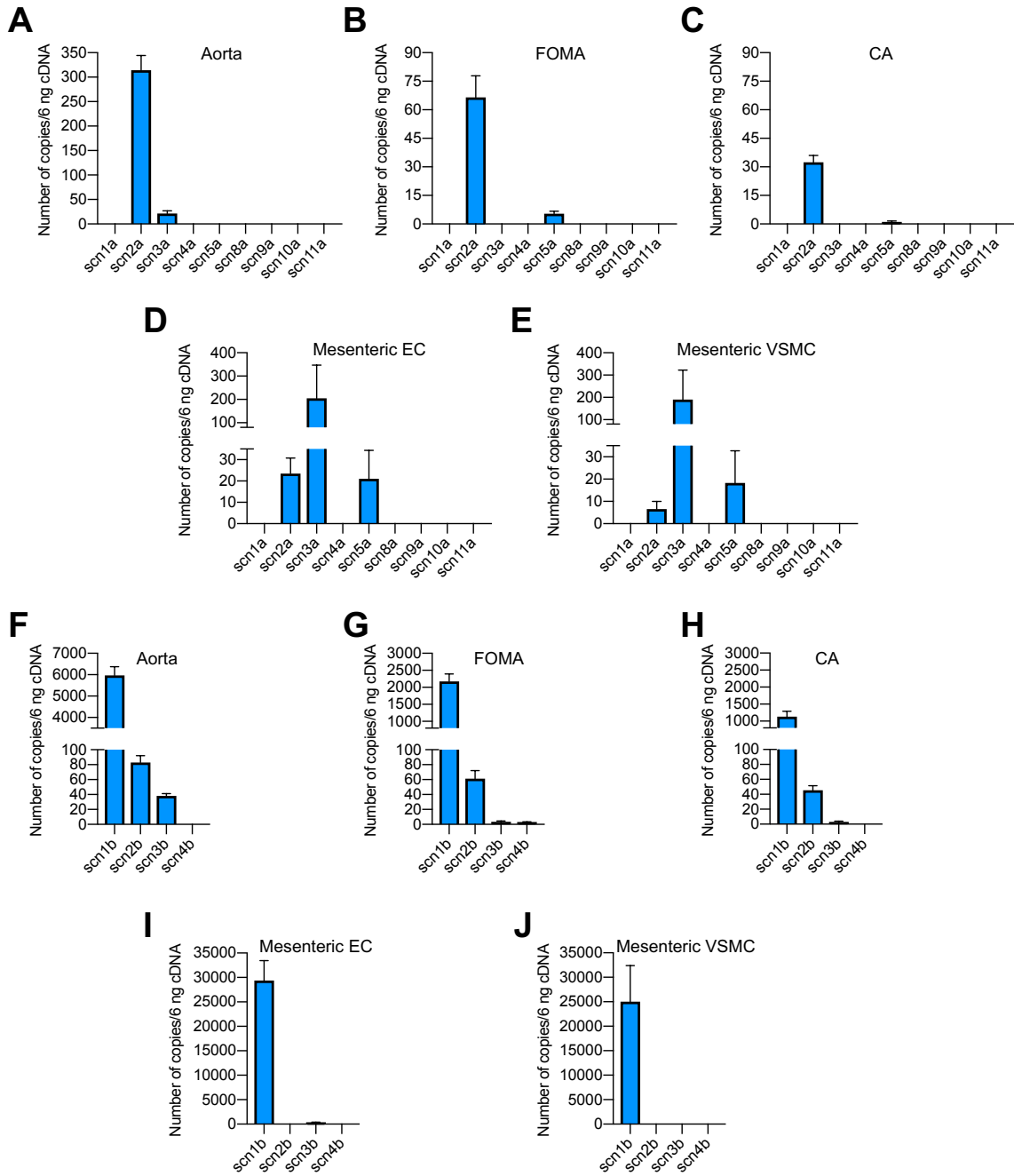


Fig. 2. Gene expression profiles of Nav channels in murine arteries and isolated cells. The expression levels of Nav channels were determined by absolute RT-qPCR. (A-C) The gene expression profile of Nav α subunits was established in: (A) aorta, (B) first order mesenteric arteries (FOMA), (C) cecocolic arteries (CA), (D) isolated endothelial (EC) and (E) vascular smooth muscle cells (VSMC). (F-J) The gene expression levels of Nav β subunits were defined in: (F) aorta, (G) FOMA, (H) CA, (I) isolated EC and (J) VSMC. EC and VSMC were isolated from murine mesenteric arteries. n=6 for arteries, n=3 for isolated cells. Values are means \pm SEM.

210 The rank order of the absolute mRNA abundance of Nav β -subunit transcripts was *Scn1b* (Nav β 1) >> *Scn2b*
 211 (Nav β 2) > *Scn3b* (Nav β 3) in aorta, FOMA and CA (Fig. 2F-H). Very low expression levels were found for *Scn3b* in
 212 both FOMA and CA (<6 copies, Fig. 2G and H), while *Scn4b* (Nav β 4) was only detected in FOMA (<3 copies,
 213 Fig. 2G). In isolated EC and VSMC from MA, *Scn1b* mRNAs are also the most abundant transcripts (Fig. 2I et J).
 214 However, *Scn2b* was no detected in these cells and a very low expression of *Scn3b* was detected in EC from MA
 215 (Fig. 2I and J). *Scn1b* expression level is 10.0 (p<0.05) and 24.0-fold (p<0.05) higher in isolated cells than in
 216 FOMA and CA, respectively. The comparison of *Scn1b* expression levels between MA and isolated cells shows
 217 an important upregulation of *Scn1b* transcription.

218 In conclusion, *Scn2a* and *Scn1b* transcripts are the most abundant Nav channel mRNAs expressed in murine
 219 aorta and MA. In isolated MA cells, we observed a profound transcriptional remodeling, with the emergence of
 220 the expression of *Scn3a*, a loss of *Scn2b* expression and a huge increase of *Scn1b* expression.

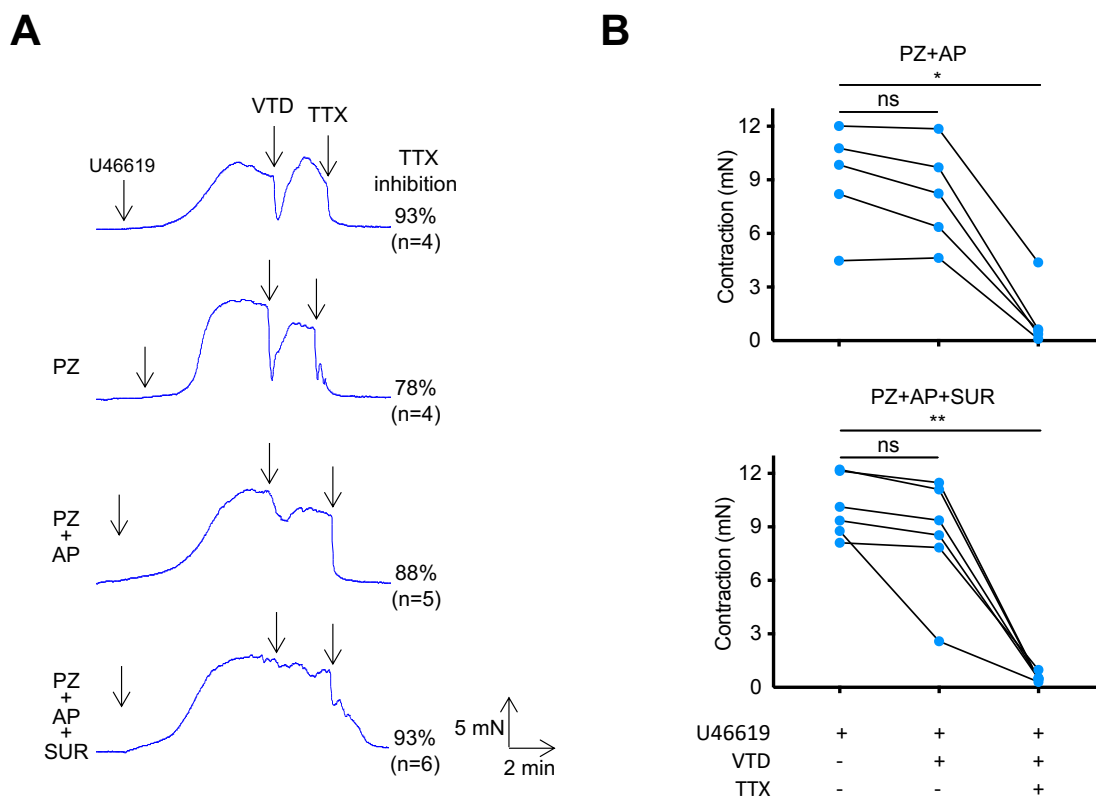


Fig. 3. Effects of TTX on contractile responses induced by U46619 of mesenteric arteries. Each artery was contracted to reach 50% of maximal contraction by U46619, a thromboxane A2 analogue in different conditions. After stabilization, VTD (30 μ M) and then TTX (1 μ M) were applied. (A) Examples of representative myograph traces. In these experiments, ceocolic arteries were treated with different antagonists such as prazosin (PZ, 1 μ M), atropine (AP, 100nM) and/or suramin (SUR, 100 μ M). (B) The graphs represent the evolution of contraction levels induced by U46619, VTD and TTX in the presence of PZ and ATR (upper panel) or PZ, ATR and SUR (lower panel). These experiments were carried out in mice. ** p<0.01, Friedman test. The values are means \pm SEM.

221 **Implication of Nav channels in vascular tone of mesenteric arteries**

222 To explore the role of Nav channels in the vascular tone, we first investigated the effects of TTX on
 223 contractile response of CA, a branch of MA by myography (Fig. 3). We used VTD to activate all Nav channels in
 224 arteries, including those expressed in terminal nerve endings. To discriminate any effects of the release of
 225 neurotransmitters, such as noradrenaline, Ach and ATP, we challenged the action of TTX in the presence of
 226 prazosin (PZ), atropine (AP) and suramin (SUR), to antagonize α 1-adrenoreceptors, muscarinic and ATP
 227 receptors, respectively (Fig. 3A). The application of VTD dilated the contractile responses induced by U466619,
 228 a thromboxane A2 analogue in control and in presence of PZ, while VTD did not modify the contractile responses
 229 induced by U466619 in presence of PZ and AP and/or SUR (Fig. 3B). Whatever the presence or not of
 230 adrenoceptor, cholinergic and P2Y receptor antagonists, the subsequent addition of TTX triggered a fast and
 231 almost complete relaxation of arteries to a similar extent, $93.0 \pm 2.1\%$, $78.3 \pm 8.2 \%$, $88.4 \pm 6.5\%$ ($p=0.06$) and
 232 $92.5 \pm 1.6\%$ ($p<0.05$), respectively (Fig. 3). Altogether, our data demonstrate that TTX induced a full relaxation
 233 of CA, suggesting that Nav channels can be activated and then participate to contractile response of MA.

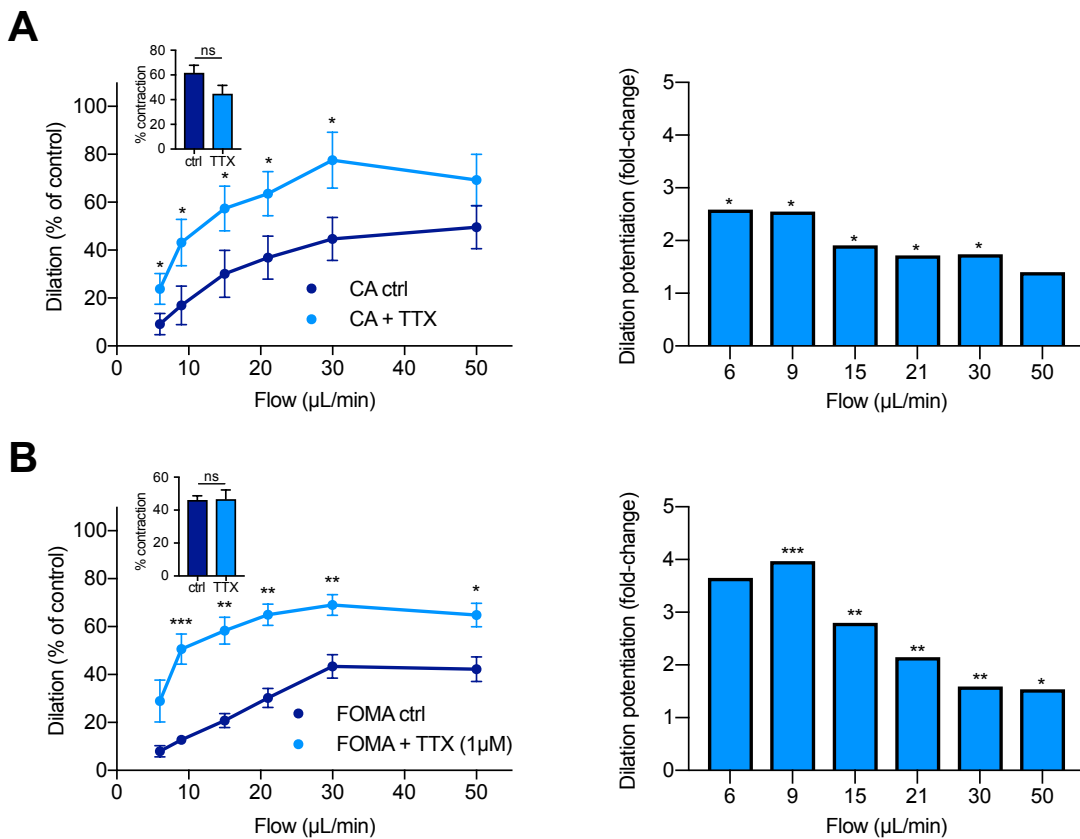


Fig. 4. Effects of TTX on flow-mediated dilation of mesenteric arteries. (A and B) Flow-mediated dilation was evaluated on cecocolic arteries (CA) and first order mesenteric arteries (FOMA) from mice by arteriography in the presence or the absence of TTX (1 μ M). In inset of graphs on the left, the histogram shows the initial contraction level induced by phenylephrine (1 μ M) before increasing flow rate. The histograms on the right illustrate the dilation potentiation of CA and FOMA induced by TTX. ctrl = control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Mann-Whitney test, control vs TTX. $n=7$. The values are means \pm SEM

234 Next, in order to challenge the implication of Nav channels in FMD, we characterized the effects of TTX on
235 the dilation capacity of CA and FOMA in response to flow elevation by arteriography. For each artery, the initial
236 contraction level induced by Phe was not significantly different in presence or absence of TTX. CA and FOMA
237 progressively developed FMD from 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ to 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, as expected (Fig. 4). We observed that TTX
238 potentiates FMD responses of CA and FOMA. Indeed, these arteries exhibit a higher dilation in response to
239 increasing flow rate in the presence of TTX compared to control (Fig. 4). Concerning CA, TTX induced a
240 significant amplification ($p<0.05$) of the dilation capacity from 6 to 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 9 to 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ for CA and
241 FOMA, respectively (Fig. 4). For CA, the highest potentiation of TTX-induced dilation was observed at 6 and 9
242 $\mu\text{L}/\text{min}$ compared to control (2.6-fold, $p<0.05$, Fig. 4A, left panel). Concerning FOMA, TTX induced a potentiation
243 of dilation up to 4.0-fold ($p<0.001$, Fig. 4B, left panel). In conclusion, the blockade of Nav channel amplifies FMD
244 of MA, which suggests that Nav channels contribute to the contractility of VSMC.

245 **Arterial hypertension modulates Nav channel gene expression in arteries**

246 Since Nav channels appear to contribute to the regulation of vascular tone, as shown here and by others
247 [16,23], we hypothesized that their expression in arteries could be changed in arterial hypertension (AHT) as it is
248 known for other ion channels such as Cav1.2, BKCa and Kv channels [29]. Then, we investigated whether the
249 expression of Nav channel gene is changed in arteries of AngII-induced hypertensive mice. After four weeks of
250 AngII-infusion, the SBP of mice reached 174 ± 4 mmHg and 121 ± 4 mmHg of treated and control groups,
251 respectively. By RT-qPCR, we showed that in aortae, the expression level of *Scn2a* is 5-fold lower ($p<0.05$) for
252 AngII-treated group than for control. Concerning Nav β subunits, the expression levels of *Scn1b* and *Scn2b* were
253 significantly 2-fold ($p<0.05$) and 3.3-fold ($p<0.05$) lower in aortae from AngII-treated group compared to
254 normotensive group, respectively. *Desmin*, a SMC marker, is massively increased (29.7-fold, $p<0.05$) from AngII-
255 treated group compared to control, suggesting an arterial remodeling (Fig. 5A). However, no difference of
256 expression levels was found in MA for *Scn2a*, *Scn1b*, *Scn2b* and *Desmin* (Fig. 5B).

257 **Aging and Nav channels gene expression**

258 Since a profound vascular remodeling occurs during aging, which is associated to important modification of
259 ion channels such as BKCa [30], we also evaluated the Nav channel gene expression in old mice. We compared
260 their expression levels of aortae and MA from 5-month-old and 18-month-old mice by RT-qPCR (Fig. 5C and D).
261 First, in aortae, we observed that the expression level of *Scn2a* was 2.5-fold ($p<0.01$) lower in old mice compared
262 to young mice. Concerning Nav β subunits, the expression levels of *Scn1b* and *Scn2b* were similar in both old and
263 young mice (Fig. 5C). In MA, the expression levels of *Scn2a* and *Scn1b* were comparable at both age, while that

264 of *Scn2b* was significantly increased by 3.7-fold ($p < 0.01$) in old mice compared to young mice (Fig. 5D). For
 265 *Desmin*, as in AngII-induced hypertensive group, the transcription expression level was dramatically increased
 266 only in aortae (64.3-fold, $p < 0.05$) in old mice compared to young mice (Fig 5C).

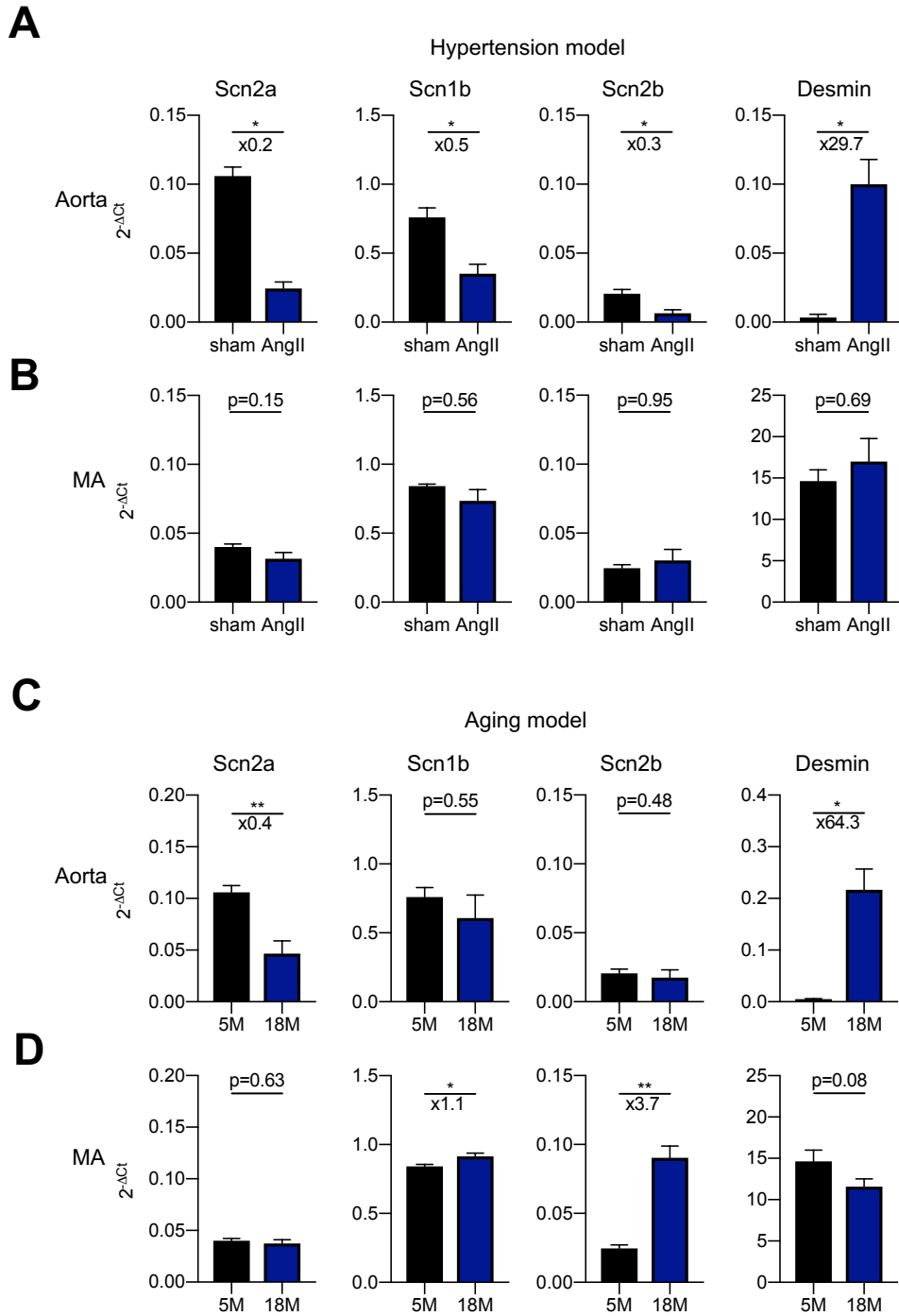


Fig. 5. Comparison of Nav channel gene expression in aorta and mesenteric arteries from hypertension models and aging model. Comparison of mRNA expression levels of *Scn2a*, *Scn1b*, *Scn2b* and *Desmin* in aorta and mesenteric arteries (MA) from: (A and B) hypertensive mice and their control (sham) and (C and D) 5-month-old (5M) and 18-month-old (18M) mice Arterial hypertension model was induced in male mice by angiotensin II (AngII)-infusion with 0.5 mg/kg/day for 28 days. The data were obtained by relative RT-qPCR. Transcript levels were normalized to expression levels of *Gusb*, *Hprt* and *Gapdh*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mann-Whitney test, sham vs AngII, $n=4$. 5M vs 18M, $n=4-6$. Values are means \pm SEM.

267 **Discussion**

268 In this study, we evidenced that Nav1.2 and Nav β 1 subunits are the major isoforms of Nav channels expressed
269 in mouse aorta and MA. To unmask Nav channels contribution in vascular tone, we pretreated isolated MA with
270 VTD and then observed a total relaxation under TTX. More interestingly, we demonstrated that Nav channels
271 participate to the contractile response during FMD, implying their contribution to the arterial
272 mechanotransduction. Finally, we found that arterial Nav channel gene expression are subjected to transcriptional
273 change during cell-culturing and also during hypertension or aging.

274 We used RT-qPCR absolute quantification method to evaluate the expression of Nav channels genes in
275 arteries. Our data showed that *Scn2a* can be considered as the most abundant Nav channel α -subunit gene expressed
276 in both murine aorta and MA. While a low expression of *Scn3a* was exclusively observed in aorta, a low expression
277 of *Scn5a* was found in MA only. This is partially in agreement with other reports. In the rat, besides the most
278 abundant *Scn2a* transcript, *Scn3a* and *Scn5a* expression have been also detected in aorta by RT-qPCR relative
279 quantification method [13] and in MA by classical RT-PCR [16]. However, in the media of rat aorta, only *Scn2a*
280 has been found [13]. In human uterine arteries, *Scn2a*, *Scn3a*, *Scn5a* and *Scn9a* have been shown to be expressed,
281 but their relative abundance has not been discussed [23]. We also showed that *Scn1b* encoding Nav β 1 subunit is
282 the most abundant Nav channel auxiliary subunit expressed in both murine aorta and MA. In addition, *Scn2b* and
283 *Scn3b* are also expressed, but to a much lower extent. Indeed, the expression of Nav β subunits have been hardly
284 ever studied in arteries but similarly as our data, *Scn1b*, *Scn2b* and *Scn3b* expression have been reported in rat
285 aorta [13] and *Scn1-4b* in human uterine arteries [23]. We also evidenced the expression of Nav channels at the
286 protein level in both endothelium and media of murine MA and aorta in agreement with previous investigations
287 performed on murine cremaster arteries [20], human subcutaneous arterioles [31] and human uterine arteries [23].
288 Here, we evidenced the expression of Nav β 1 subunit at the protein level in both EC and VSMC of murine aorta.
289 These data bring together an important sum of evidence for the presence at both transcriptional and protein levels
290 of Nav channel α - and β -subunits in both VSMC and EC of conductance and resistant arteries and support that
291 these channels might contribute to their physiology.

292 In dissociated EC and VSMC from MA, we showed the expression of *Scn2a* as seen in arteries and two other
293 Nav channel transcripts, *Scn3a* and *Scn5a*. In addition, our data demonstrated that cell culturing and proliferation
294 was associated to an important increase of the of *Scn1b* expression, and to the expression of *Scn3b* in isolated EC.
295 Transcriptional change of Nav channel expression has been initially reported for rabbit and human aorta and has

296 been proposed to reflect phenotypic switch during aorta injury leading to intimal hyperplasia [14]. Indeed, there is
297 a weak expression of *SCN2A* and *SCN8A* beside a significant expression of *SCN9A* in cultured human aortic SMC
298 [14]. In freshly dissociated rat aortic SMC, only *Scn2a* has been detected [13] and freshly dissociated SMC from
299 mice MA [17] exhibit TTX-S Na⁺ currents, thus reinforcing the ideas that VSMC from both resistant and
300 conductance arteries express Nav1.2 channels in rodents. Concerning the expression of Nav channels in EC, as we
301 observed in dissociated EC from MA, an immunohistochemical study has shown that Nav1.2 channels are
302 expressed in EC of cremaster arterioles [20]. However, in these latter, Nav1.6 and Nav1.9 have also been detected.
303 While in Human, Nav1.5, Nav1.6 and Nav1.7 transcript isoforms are detected in HUVEC [21] and Nav1.7 in the
304 endothelium of cutaneous arterioles [31]. In conclusion, Nav1.2 appears the common Nav channel isoform
305 expressed in VSMC and EC from arteries of rodents, while Nav1.7 channel is its counterpart in Human arteries.

306 We proved that TTX caused full arterial relaxation unmasking an unexpected contribution of endogenous
307 vascular Nav channels in vascular tone. So far, the contribution of Nav channels in contraction has been explored
308 by pharmacological approach consisting essentially in their activation by VTD in isolated arteries [13,16,20,23,32].
309 However, VTD can activate all Nav channels including those of perivascular nerve endings which lead to the
310 release of neurotransmitters, such as noradrenalin, acetylcholine, ATP, serotonin... In this way, the inhibition of
311 α 1-adrenoreceptor by PZ abolishes the VTD-induced contractile response of rat aortic rings [13] and of human
312 uterine arteries [23], while in the presence of this antagonist, a weaker VTD-induced contractile response is still
313 seen in MA from rat [16]. In our study, the arteries were strongly challenged by U46619 and VTD and then TTX
314 induced a complete vasorelaxation. Thus, the contribution of Nav channels in contractile response unmasked by
315 TTX could hardly be extrapolated to physiological conditions. However, our results highlight that Nav channels
316 of VSMC might be recruited during contraction.

317 In this study, we found that TTX considerably potentiates FMD response in pressurized murine MA,
318 revealing the contribution of Nav channels in arterial mechanotransduction response to shear stress. The
319 mechanosensitivity of Nav channels is supported by strong evidence that membrane deformations can trigger Nav
320 channel activation [33–35]. Moreover, this response is regulated by both Nav β 1 and Nav β 3 subunits [36]. Hence,
321 we propose that Nav channels are activated in VSMC in pressurized arteries, and likely contribute to develop
322 vascular tone by mechanotransduction in physiological conditions. This could partially explain why a vascular
323 tone decrease occurs in mammal tetrodotoxification, causing a significant reduction of peripheral resistance and

324 subsequent arterial hypotension [37]. Since Nav channels inhibition leads to a decrease of the VSMC contractility
325 under shear stress, it is reasonable to suggest these channels as a novel target to reduce arterial hypertension.

326 More recently, it has been shown that TTX suppresses a spontaneous contractile oscillation of human uterine
327 arteries, and thus, Nav channels are thought to be involved in vasomotion through an electrogenic action in VSMC
328 [23]. This assumption is reinforced by other data showing that TTX strongly reduces the upstroke of action
329 potential induced by electrical stimulation in arteriolar SMC from murine skeletal muscle [38]. Hence, VSMC Nav
330 channels might be electrically activable and likely participate in the membrane depolarization leading to
331 sarcolemmal Ca^{2+} entry and subsequent arterial myocytes constriction.

332 Nav channels in both EC and VSMC interfere with both endothelium-dependent relaxation and myocyte-
333 dependent contractile responses, rendering particularly challenging the understanding of their implication to the
334 vascular tone. This relies to a common mechanism in which Na^+ entry mediated by Nav channels modulates thanks
335 to plasmalemmal NCX activation in Ca^{2+} entry mode in both cell types. Indeed, the NCX blocker KB-R7943
336 reduces VTD-induced contractile responses of femoral and mesenteric arteries from rat [16,25]. This mechanism
337 has been clearly demonstrated in human coronary myocytes from ischemic heart. In these cells, the Nav channel
338 activation by VTD triggers Ca^{2+} increase, which is suppressed by NCX inhibition [18]. This functional coupling
339 between Nav channels and NCX has been also demonstrated in HUVEC [21,24]. Then, it seems that Nav channels
340 and NCX interplay to link Ca^{2+} and Na^+ homeostasis.

341 Since ion channels, such as Ca^{2+} and K^+ channels exhibit a major role in both endothelial function and in the
342 regulation of the vascular tone, and that variation of their expression are involved in physiopathological
343 mechanisms [29], we have focused our attention on Nav channel expression in AHT and aging mice models.
344 Interestingly, a decrease of *Scn2a* expression occurs mainly in aorta in both models, which could lead to a
345 subsequent loss of function of Nav1.2. As mentioned above, a remodeling of Nav channel expression has been
346 already discussed during aorta injury. However, in this case, an increase of *SCN9A* expression occurs, suggesting
347 the implication of Nav1.7 in intimal hyperplasia [14]. In hypoxic condition, it has also been demonstrated that the
348 activation of Nav channels increase contractile response of rat femoral arteries [25] and more recently, of human
349 uterine arteries [23]. The decrease or the loss of function of Nav1.2 that we observed in aorta of hypertensive and
350 old mice could be an adaptative response or the reflect of phenotypic change. Further experiments would allow to
351 address whether this decrease of *Scn2a* expression affects the contractile response of aorta.

352 Concerning the Nav β subunit transcripts, it is interesting to see that *Scn1b* and *Scn2b* expression levels are
353 decreased in hypertensive mice. In addition, an important increase of *Scn2b* expression is seen in MA from old
354 mice. This profound transcriptional remodeling might be the reflect of their functional contribution during vascular
355 remodeling. Nav β subunits are particularly interesting proteins since they contribute to Nav channel regulation,
356 including trafficking and gating properties. However, Nav β subunits are also cell adhesion molecules, acting as
357 intra/extracellular signaling proteins [39], even so, their roles in vascular function remain to be elucidated.

358 **Conclusion**

359 Nav channels are expressed in endothelium and media of arteries. TTX unmask their contribution in
360 contractile responses of mesenteric arteries induced by U46619 or by flow. This reveals their contribution to the
361 mechano-signaling of VSMC. Their expression is subjected to remodeling at the transcriptional level during
362 hypertension and aging, suggesting their importance in physiopathological mechanisms affecting vascular function.

363 **Authorship contribution**

364 JP, CP, WE, JF, GK & EV performed the experiments. DH, CL, JP & ChL designed the research study and
365 analysed the data. CM, HTL, DH, GK, JP, CL & ChL discussed the results. JP & ChL wrote the manuscript.

366 **Funding**

367 The work was supported by the “Region Pays de la Loire, Paris scientifique 2017, SODIVASC”.

368 **Conflict of Interest**

369 The authors declare no conflict of interest.

370 **Acknowledgments**

371 We thank Romain Baudat, Florian Beignon, Jordan Rivron, Elodie Le Seac’h, Anne-Laure Guihot, Linda
372 Grimaud, Agnès Barbelivien, Jennifer Bourreau and Louis Gourdin for their expert technical assistance. We also
373 thank Dr Céline Marionneau and Dr Vincent Paillé for their expertise and helpful discussions.

374

375 **References**

- 376 [1] W.A. Catterall, A.L. Goldin, S.G. Waxman, International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature
 377 and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 397–
 378 409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>.
- 379 [2] L.M. Durán-Riveroll, A.D. Cembella, Guanidinium Toxins and Their Interactions with Voltage-Gated
 380 Sodium Ion Channels, *Mar. Drugs.* 15 (2017). <https://doi.org/10.3390/md15100303>.
- 381 [3] J.A. Black, S.G. Waxman, Noncanonical Roles of Voltage-Gated Sodium Channels, *Neuron.* 80 (2013) 280–
 382 291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.012>.
- 383 [4] L.W. Pappalardo, O.A. Samad, S. Liu, P.J. Zwinger, J.A. Black, S.G. Waxman, Nav1.5 in astrocytes plays
 384 a sex-specific role in clinical outcomes in a mouse model of multiple sclerosis, *Glia.* 66 (2018) 2174–2187.
 385 <https://doi.org/10.1002/glia.23470>.
- 386 [5] J.A. Black, S.G. Waxman, Sodium channels and microglial function, *Exp. Neurol.* 234 (2012) 302–315.
 387 <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.030>.
- 388 [6] P. Zhao, T.P. Barr, Q. Hou, S.D. Dib-Hajj, J.A. Black, P.J. Albrecht, K. Petersen, E. Eisenberg, J.P. Wymer,
 389 F.L. Rice, S.G. Waxman, Voltage-gated sodium channel expression in rat and human epidermal
 390 keratinocytes: evidence for a role in pain, *Pain.* 139 (2008) 90–105.
 391 <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.03.016>.
- 392 [7] W.-L. Lo, D.L. Donermeyer, P.M. Allen, A voltage-gated sodium channel is essential for the positive
 393 selection of CD4(+) T cells, *Nat. Immunol.* 13 (2012) 880–887. <https://doi.org/10.1038/ni.2379>.
- 394 [8] O. Lopez-Charcas, P. Pukkanasut, S.E. Velu, W.J. Brackenbury, T.G. Hales, P. Besson, J.C. Gomora, S.
 395 Roger, Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of
 396 cancers, *IScience.* 24 (2021) 102270. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102270>.
- 397 [9] H. Sun, J. Jiang, L. Gong, X. Li, Y. Yang, Y. Luo, Z. Guo, R. Lu, H. Li, J. Li, J. Zhao, N. Yang, Y. Li,
 398 Voltage-gated sodium channel inhibitor reduces atherosclerosis by modulating monocyte/macrophage
 399 subsets and suppressing macrophage proliferation, *Biomed. Pharmacother.* 120 (2019) 109352.
 400 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109352>.
- 401 [10] K. Okabe, K. Kitamura, H. Kuriyama, The existence of a highly tetrodotoxin sensitive Na channel in freshly
 402 dispersed smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery, *Pflugers Arch.* 411 (1988) 423–428.
 403 <https://doi.org/10.1007/bf00587722>.
- 404 [11] K.B. Walsh, M.B. Wolf, J. Fan, Voltage-gated sodium channels in cardiac microvascular endothelial cells,
 405 *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 274 (1998) H506–H512.
 406 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.2.H506>.
- 407 [12] R.H. Cox, Z. Zhou, T.N. Tulenko, Voltage-Gated Sodium Channels in Human Aortic Smooth Muscle Cells,
 408 *J. Vasc. Res.* 35 (1998) 310–317. <https://doi.org/10.1159/000025600>.
- 409 [13] A. Fort, M. Cordaillat, C. Thollon, G. Salazar, I. Mechaly, N. Villeneuve, J.-P. Vilaine, S. Richard, A.
 410 Virsolvy, New Insights in the Contribution of Voltage-Gated Nav Channels to Rat Aorta Contraction, *PLOS*
 411 *ONE.* 4 (2009) e7360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007360>.
- 412 [14] K. Meguro, H. Iida, H. Takano, T. Morita, M. Sata, R. Nagai, T. Nakajima, Function and role of voltage-
 413 gated sodium channel Nav1.7 expressed in aortic smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.*
 414 296 (2009) H211–H219. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00960.2008>.
- 415 [15] J.F. Quignard, F. Ryckwaert, B. Albat, J. Nargeot, S. Richard, A novel tetrodotoxin-sensitive Na⁺ current
 416 in cultured human coronary myocytes, *Circ. Res.* 80 (1997) 377–382.
- 417 [16] W.-S.V. Ho, A.J. Davis, P.S. Chadha, I.A. Greenwood, Effective contractile response to voltage-gated Na⁺
 418 channels revealed by a channel activator, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 304 (2013) C739–C747.
 419 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00164.2012>.
- 420 [17] R. Berra-Romani, M.P. Blaustein, D.R. Matteson, TTX-sensitive voltage-gated Na⁺ channels are expressed
 421 in mesenteric artery smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 289 (2005) H137–H145.
 422 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01156.2004>.
- 423 [18] G. Boccara, C. Choby, J.M. Frapier, J.F. Quignard, J. Nargeot, G. Dayanithi, S. Richard, Regulation of Ca²⁺
 424 Homeostasis by Atypical Na⁺ Currents in Cultured Human Coronary Myocytes, *Circ. Res.* 85 (1999) 606–
 425 613. <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.7.606>.
- 426 [19] O. Platoshyn, C.V. Remillard, I. Fantozzi, T. Sison, J.X.-J. Yuan, Identification of functional voltage-gated
 427 Na(+) channels in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells, *Pflugers Arch.* 451 (2005) 380–
 428 387. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1478-3>.
- 429 [20] X.F. Figueroa, C.-C. Chen, K.P. Campbell, D.N. Damon, K.H. Day, S. Ramos, B.R. Duling, Are voltage-
 430 dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone?, *Am. J. Physiol. - Heart*
 431 *Circ. Physiol.* 293 (2007) H1371–H1383. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01368.2006>.
- 432 [21] P. Andrikopoulos, S.P. Fraser, L. Patterson, Z. Ahmad, H. Burcu, D. Ottaviani, J.K.J. Diss, C. Box, S.A.
 433 Eccles, M.B.A. Djamgoz, Angiogenic Functions of Voltage-gated Na⁺ Channels in Human Endothelial

- 434 Cells MODULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) SIGNALING, J.
 435 Biol. Chem. 286 (2011) 16846–16860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187559>.
- 436 [22] A. Virsolvy, C. Farah, N. Pertuit, L. Kong, A. Lacampagne, C. Reboul, F. Aimond, S. Richard, Antagonism
 437 of Nav channels and α_1 -adrenergic receptors contributes to vascular smooth muscle effects of ranolazine,
 438 Sci. Rep. 5 (2015) 17969. <https://doi.org/10.1038/srep17969>.
- 439 [23] A. Virsolvy, A. Fort, L. Erceau, A. Charrabi, M. Hayot, F. Aimond, S. Richard, Hypoxic Conditions Promote
 440 Rhythmic Contractile Oscillations Mediated by Voltage-Gated Sodium Channels Activation in Human
 441 Arteries, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 2570. <https://doi.org/10.3390/ijms22052570>.
- 442 [24] O. Traub, T. Ishida, M. Ishida, J.C. Tupper, B.C. Berk, Shear Stress-mediated Extracellular Signal-regulated
 443 Kinase Activation Is Regulated by Sodium in Endothelial Cells, J. Biol. Chem. 274 (1999) 20144–20150.
 444 <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20144>.
- 445 [25] A. Bocquet, S. Sablayrolles, B. Vacher, B. Le Grand, F 15845, a new blocker of the persistent sodium current
 446 prevents consequences of hypoxia in rat femoral artery, Br. J. Pharmacol. 161 (2010) 405–415.
 447 <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00912.x>.
- 448 [26] T.B. Morrison, J.J. Weis, C.T. Wittwer, Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green
 449 I monitoring during amplification, BioTechniques. 24 (1998) 954–958, 960, 962.
- 450 [27] C. Lee, J. Kim, S.G. Shin, S. Hwang, Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number
 451 in Escherichia coli, J. Biotechnol. 123 (2006) 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.014>.
- 452 [28] D. Henrion, F. Terzi, K. Matrougui, M. Duriez, C.M. Boulanger, E. Colucci-Guyon, C. Babinet, P. Briand,
 453 G. Friedlander, P. Poitevin, B.I. Lévy, Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from
 454 mice lacking vimentin, J. Clin. Invest. 100 (1997) 2909–2914. <https://doi.org/10.1172/JCI119840>.
- 455 [29] J. Cheng, J. Wen, N. Wang, C. Wang, Q. Xu, Y. Yang, Ion Channels and Vascular Diseases, Arterioscler.
 456 Thromb. Vasc. Biol. 39 (2019). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312004>.
- 457 [30] L. Toro, J. Marijic, K. Nishimaru, Y. Tanaka, M. Song, E. Stefani, Aging, ion channel expression, and
 458 vascular function, Vascul. Pharmacol. 38 (2002) 73–80. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(02\)00128-3](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(02)00128-3).
- 459 [31] F.L. Rice, P.J. Albrecht, J.P. Wymer, J.A. Black, I.S. Merckies, C.G. Faber, S.G. Waxman, Sodium Channel
 460 Nav1.7 in Vascular Myocytes, Endothelium, and Innervating Axons in Human Skin, Mol. Pain. 11 (2015)
 461 s12990-015–0024. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0024-3>.
- 462 [32] M. Shinjoh, T. Nakaki, Y. Otsuka, N. Sasakawa, R. Kato, Vascular smooth muscle contraction induced by
 463 Na⁺ channel activators, veratridine and batrachotoxin, Eur. J. Pharmacol. 205 (1991) 199–202.
- 464 [33] C.E. Morris, Voltage-Gated Channel Mechanosensitivity: Fact or Friction?, Front. Physiol. 2 (2011).
 465 <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00025>.
- 466 [34] P.R. Strege, A. Mercado-Perez, A. Mazzone, Y.A. Saito, C.E. Bernard, G. Farrugia, A. Beyder, SCN5A
 467 mutation G615E results in Na^v 1.5 voltage-gated sodium channels with normal voltage-dependent function
 468 yet loss of mechanosensitivity, Channels. 13 (2019) 287–298.
 469 <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1632670>.
- 470 [35] J. Körner, J. Meents, J.-P. Machtens, A. Lampert, β 1 subunit stabilises sodium channel Nav1.7 against
 471 mechanical stress: Nav β 1 subunit as mechanical stabiliser, J. Physiol. 596 (2018) 2433–2445.
 472 <https://doi.org/10.1113/JP275905>.
- 473 [36] M. Maroni, J. Körner, J. Schüttler, B. Winner, A. Lampert, E. Eberhardt, β 1 and β 3 subunits amplify
 474 mechanosensitivity of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5, Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol. 471
 475 (2019) 1481–1492. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02324-w>.
- 476 [37] T. Zimmer, Effects of Tetrodotoxin on the Mammalian Cardiovascular System, Mar. Drugs. 8 (2010) 741–
 477 762. <https://doi.org/10.3390/md8030741>.
- 478 [38] A.V. Ulyanova, R.E. Shirokov, Voltage-dependent inward currents in smooth muscle cells of skeletal
 479 muscle arterioles, PLOS ONE. 13 (2018) e0194980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194980>.
- 480 [39] J.M. Hull, L.L. Isom, Voltage-gated sodium channel β subunits: The power outside the pore in brain
 481 development and disease, Neuropharmacology. 132 (2018) 43–57.
 482 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.018>.
- 483

1.2. Résultats supplémentaires

Dans l'article n°1, nous avons établi le profil d'expression des canaux Na_v au niveau des aortes et des MA de souris, montrant l'expression majeure de *Scn2a* ($\text{Na}_v1.2$) et *Scn1b* ($\text{Na}_v\beta1$) par RT-qPCR avec une méthode de quantification absolue. Le niveau d'expression des transcrits a également été évalué au niveau des artères fémorales (Figure 21). Contrairement aux aortes et MA où plusieurs sous-unités $\text{Na}_v\alpha$ ont été détectées (Aortes : *Scn2a* et *Scn3a*, MA : *Scn2a* et *Scn5a*), seul le transcrit *Scn2a* est détecté dans les artères fémorales (Figure 21.A). De plus, le nombre de copies détectées (5 ± 2 copies) est beaucoup plus faible par rapport à ceux des aortes (314 ± 30 copies) et des MA (FOMA : 66 ± 11 copies, CA : 32 ± 4 copies). Concernant les sous-unités $\text{Na}_v\beta$, les transcrits *Scn1b* ($\text{Na}_v\beta1$) et *Scn2b* ($\text{Na}_v\beta2$) sont détectés avec l'expression majeure de *Scn1b* (436 ± 27 copies vs 7 ± 5 copies) (Figure 21.B). Comme observé pour les sous-unités $\text{Na}_v\alpha$, le niveau d'expression de *Scn1b* des artères fémorales est moins important que ceux des autres artères : aorte 5965 ± 407 copies, FOMA 2175 ± 220 copies, CA 1132 ± 156 copies. En conclusion, *Scn2a* et *Scn1b* sont les isoformes majeures de toutes les artères étudiées (aortes, FOMA, CA et artères fémorales) avec, cependant, un niveau d'expression variable en fonction des artères.

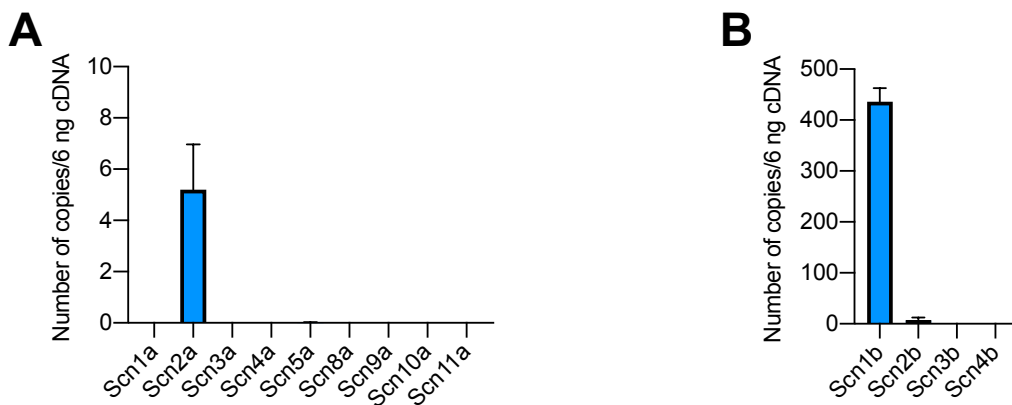


Figure 22 : Expression des canaux Na_v dans les artères fémorales de souris

Le niveau d'expression des gènes codant les sous-unités α (A) et β (B) a été établi à partir d'ARN extraits d'artères fémorales. Les résultats ont été obtenus par RT-qPCR avec une méthode de quantification absolue. Les artères ont été prélevées sur des souris mâles âgées de 5 mois ($n=6$). Les données sont les moyennes \pm SEM.

Les résultats de l'article n°1 ont montré l'évolution de l'expression des gènes des canaux Na_v dans un modèle d'HTA induite par l'AngII à une dose de 0,5 mg/kg/j pendant 28 jours (« modèle article »). Durant ma thèse, j'ai également exploré la variation de leur expression au niveau des différentes artères chez des souris hypertendues grâce à l'administration d'AngII à 1 mg/kg/j pendant 14 jours (« modèle de thèse ») (Figure 22). La PAS a été mesurée chez les animaux traités avec 1 mg/kg/j pendant 14 jours. La PAS des souris traitées (AngII) est significativement plus élevée que celle des souris non-traitées (sham) dès le 5^{ème} jour de traitement ($149,9 \pm 6,5$ mmHg vs $120,2 \pm 5,0$ mmHg, $p<0,01$). Au 13^{ème} jour de traitement, la PAS des animaux traités atteint $168,7 \pm 4,4$ mmHg, alors que la valeur de PAS du groupe sham reste stable ($116,2 \pm 5,0$ mmHg) (Figure 22.A). Par ailleurs, deux méthodes différentes ont été utilisées pour la quantification des transcrits : dans l'article

n°1, l'expression des transcrits a été évaluée par RT-qPCR relative, alors qu'une méthode de quantification absolue a été utilisée pour le « modèle de thèse » afin de définir le nombre exact de copies.

Dans le « modèle de thèse » d'HTA, le niveau d'expression de *Scn2a* dans les aortes est inchangé après le traitement, alors qu'il est diminué significativement dans le « modèle d'article ». Concernant les sous-unités $Na_v\beta$, les niveaux d'expression de *Scn1b* et *Scn2b* sont 1,7 ($p < 0,05$) et 2,8 ($p < 0,01$) fois augmentés dans le groupe AngII par rapport au groupe sham, respectivement (Figure 22.B). A l'inverse, les résultats du « modèle d'article » montrent plutôt une diminution significative de l'expression de *Scn1b* et *Scn2b* (2 et 3 fois, respectivement). Au niveau des MA, comme observé dans le « modèle d'article », aucune variation significative de l'expression des transcrits *Scn1a*, *Scn1b* et *Scn2b* n'a été mise en évidence (Figure 22.C). Les artères fémorales ne montrent aucune différence d'expression des transcrits des canaux Na_v entre les groupes sham et AngII (Figure 22.D). Le niveau d'expression du gène de la *Desmin*, un marqueur des CMLV, est significativement augmenté seulement au niveau des MA (1,7 fois, $p < 0,01$) (Figure 22.C). Cette augmentation n'est pas retrouvée dans le « modèle d'article » ($p = 0,69$). Par ailleurs, le niveau d'expression de la *Desmin* n'est pas modifié dans les aortes dans le « modèle de thèse » ($p = 0,7$) (Figure 22.B), alors que cette expression augmente fortement dans le cas du « modèle d'article » (29,7 fois, $p < 0,05$). Ces variations d'expression du gène de la *Desmin* mettent tout de même en évidence un remodelage des vaisseaux étudiés. Pour résumer, lors de l'HTA, le niveau d'expression des canaux Na_v évolue uniquement dans les aortes et ce niveau n'est pas modifié dans les MA et artères fémorales. Étonnamment, le sens de variation de l'expression des transcrits dans les aortes est opposé entre le « modèle d'article » et le « modèle de thèse » (diminution et augmentation, respectivement). La durée d'induction étant deux fois plus courte dans le « modèle de thèse » que dans le « modèle d'article », ces résultats indiquent que les niveaux d'expression des canaux Na_v pourraient varier différemment au cours de l'HTA et selon le type de vaisseaux. Ces canaux pourraient alors influencer dans un sens ou dans l'autre la mise en place de la pathologie.

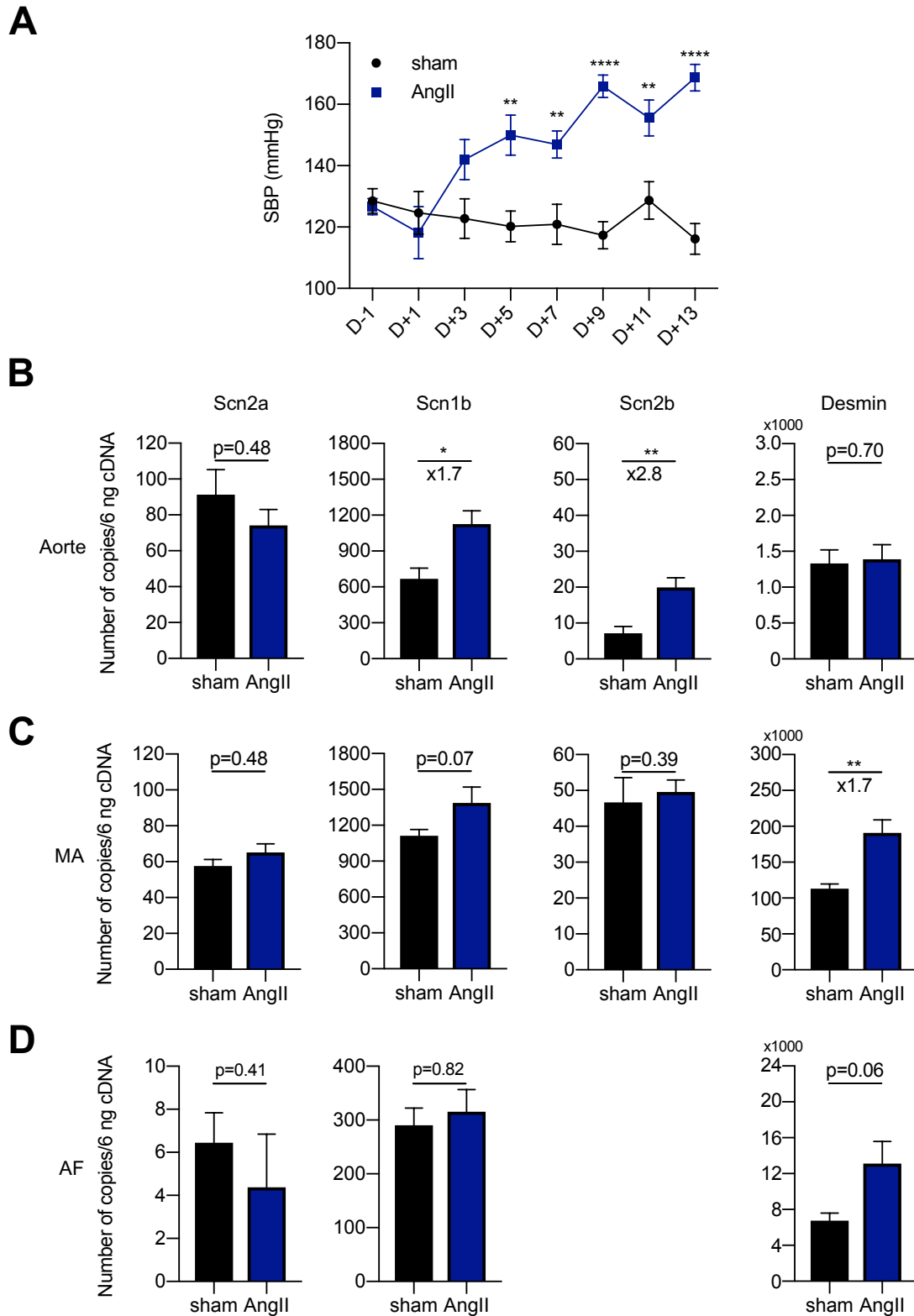


Figure 23 : Évolution de l'expression des canaux Na_v dans les aortes, les artères mésentériques et fémorales chez les souris hypertendues

L'hypertension artérielle a été induite par administration d'angiotensine II (AngII, 1 mg/kg/j) pendant 14 jours. (A) Les courbes représentent l'évolution de la pression artérielle systolique (SBP) chez les souris normotendues (sham) et hypertendues (AngII). Les histogrammes illustrent le niveau d'expression de Scn2a, Scn1b, Scn2b et

Desmin dans (B) les aortes, (C) les artères mésentériques (MA) et (D) les artères fémorales (AF) des groupes sham et AngII. Les données ont été obtenues par RT-qPCR avec une méthode de quantification absolue. Les artères proviennent de souris mâles âgées de 5 mois ($n=6$). Test de Mann-Whitney, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$. Les données sont les moyennes \pm SEM.

2. Étude n°2 : Effets de la vératridine induisant la libération d'acétylcholine entraînant la vasorelaxation des artères céecocoliques

La première étude nous a permis de démontrer l'expression des canaux Na_v dans l'intima et la média des artères de souris, en particulier, des différentes branches des MA (FOMA et CA) et de proposer leur rôle potentiel au niveau des CMLV dans le développement du tonus vasculaire. Les canaux Na_v , jouant un rôle important dans l'excitabilité membranaire, se trouvent également dans les systèmes nerveux central et périphérique (Yu and Catterall, 2003). Il est connu que les segments artériels utilisés dans les études de la réactivité vasculaire présentent des TN périphériques, où sont retrouvés les canaux Na_v . Il a été rapporté que trois types de nerfs sont présents au niveau des MA de rat, à savoir les nerfs sympathiques, parasympathiques et sensoriels, qui sont susceptibles de libérer des substances vasoactives comme la noradrénaline, l'Ach et le CGRP (Tangsucharit et al., 2012; Yokomizo et al., 2015). L'utilisation d'un activateur des canaux Na_v sur les artères isolées peut donc stimuler ces terminaisons aboutissant à la libération des NT. En effet, en 2013, Ho et al. ont observé que la prazosine, un inhibiteur des α_1 -adrénocepteurs a réduit la vasoconstriction des MA induite par la VTD (Ho et al., 2013). C'est pourquoi dans cette deuxième étude, nous avons tenté d'inhiber les effets des NT par leur antagoniste lors de l'application de la VTD sur les segments de MA. L'utilisation de ces molécules a pour but de caractériser les effets de l'activation des canaux Na_v des cellules vasculaires sur la vasomotricité. Étonnamment, nous avons pu révéler une innervation différente en fonction des branches de MA, notamment une innervation parasympathique au niveau des CA. De plus, nous avons pu mettre en évidence les NCX endothéliaux en tant qu'un intermédiaire des effets de la VTD. Ces échangeurs intervenant dans la régulation de l'homéostasie Ca^{2+} , leur rôle est davantage décrit dans les cellules excitables comme les CMLV et cardiomyocytes (Shattock et al., 2015; Zhang, 2013).

Peu d'études ont mis en évidence leur implication dans le contrôle de la $[Ca^{2+}]_i$ au niveau des CE (Andrikopoulos et al., 2015, 2011a; Kim et al., 2005; Lillo et al., 2018). Par exemple, l'inhibition des NCX a réduit l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'ATP dans les CE d'aorte et de MA (Kim et al., 2005; Lillo et al., 2018). Les effets de la VTD observés dans cette étude étant possiblement dus à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des CE, nous avons voulu comprendre le mécanisme de ces effets et l'implication des NCX à l'aide d'un modèle cellulaire endothélial. Ainsi, la deuxième partie de ma thèse est consacrée à l'étude des effets de l'activation des canaux Na_v sur la vasomotricité des MA de souris, puis pour caractériser les acteurs potentiellement impliqués et la voie de signalisation. Cette étude est présentée sous la forme d'un article suivi de quelques résultats supplémentaires.

2.1. Article n°2

Veratridine induces acetylcholine release and subsequent vasorelaxation of cecocolic artery through NCX1 activation in the mouse endothelium

Joohee Park, Léa Réthoré, Coralyne Proux, Linda Grimaud, Emilie Vessières, Jennifer Bourreau, César Mattei, Hélène Tricoire-Leignel, Daniel Henrion, Céline Marionneau, Claire Legendre, Christian Legros

soumis et en révision dans le journal « *International Journal of Molecular Sciences* »



Article

Veratridine induces acetylcholine release and subsequent vaso-relaxation of cecocolic artery through NCX1 activation in the mouse endothelium

Joohee Park ¹, Léa Réthoré ¹, Coralyne Proux ¹, Linda Grimaud ¹, Emilie Vessières ¹, Jennifer Bourreau ¹, César Mattei ¹, Hélène Tricoire-Leignel ¹, Daniel Henrion ¹, Céline Marionneau ², Claire Legendre ¹, Christian Legros ^{1,*}

¹ Univ Angers, INSERM, CNRS, MITOVASC, Equipe CarME, SFR ICAT, 49000 Angers, FRANCE; pakjoohee25@gmail.com (J.P.); lea.rethore@univ-angers.fr (L.R.); coralyne.proux@univ-angers.fr (C.P.); linda.grimaud@univ-angers.fr (L.G.); emilie.vessieres@univ-angers.fr (E.V.); jennifer.bourreau@inserm.fr (J.B.); cesar.mattei@univ-angers.fr (C.M.); helene.tricoire-leignel@univ-angers.fr (H.T.-L.); daniel.henrion@univ-angers.fr (D.H.); claire.legendre@univ-angers.fr (C.L.)

² Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, 44000 Nantes, France; celine.marionneau@univ-nantes.fr (C.M.)

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

Abstract: Veratridine (VTD), an activator of voltage-gated Na⁺ (Nav) channels, mediates heterogeneous vascular responses in small arteries. While VTD induces contraction in mesenteric arteries (MA), it relaxes cremaster arteries. Since vasomotor responses mainly depend on sympathetic and parasympathetic actions, we hypothesized that VTD responses might be the consequences of neuronal Nav channel activation. Here, using wire myography, we showed that VTD induced contraction in first order MA (FOMA) and vasorelaxation in cecocolic artery (CA) from mouse. VTD-induced contraction in FOMA was suppressed by prazosin, while VTD induced-relaxation in CA, was insensitive to prazosin, but abolished by atropine, revealing acetylcholine (Ach) release by parasympathetic neurons. These data show that FOMA and CA exhibits distinct neuronal vasomotor regulation. This VTD-induced vasorelaxation was also totally inhibited by the NO synthase inhibitor, L-NNA, and more interestingly, partially blocked (up to 67%) by SEA0400, a NCX1 antagonist. In CA, NCX1 expression was evidenced in endothelial cells (EC) at both transcriptional and protein levels. We showed that Ach induced intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) increase in Mile Sven 1 murine EC, which was totally inhibited by thapsigargin and strongly reduced in the absence of extracellular Ca²⁺ or Na⁺. As expected, Ach-induced [Ca²⁺]_i elevations were partially blocked by NCX antagonists. Altogether, our data highlight that VTD mainly activates Nav channels in parasympathetic neurons leading to Ach release, that in turn, induced NO synthase activation mediated by Ca²⁺ entry mode of NCX1 in the endothelium of CA.

Keywords: Voltage-gated Na⁺ channels; Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX); mesenteric arteries; vascular tone; veratridine; Ca²⁺ signaling

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

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



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The regulation of arterial blood pressure and blood flow is crucial for homeostasis and relies on the vascular tone of resistance arteries and arterioles. Vascular tone results from the equilibrium between vasoconstrictor and vasodilator mechanisms, depending on intrinsic properties of resistance arteries and neuronal inputs [1]. This equilibrium is mainly mediated by Ca²⁺ signaling pathways in both vascular smooth muscle cells (VSMC) [2,3] and endothelial cells (EC) [4,5]. It is well established that nitric oxide (NO), endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) and cyclooxygenase pathway are the main endothelium vasodilator factors of resistance arteries [6–8]. These pathways are

induced either by shear-stress or by G protein-coupled receptors, such as muscarinic receptor through Ca^{2+} signaling pathways [7–9]. Moreover, vascular tone is tightly controlled by the vascular innervation releasing different neurotransmitters by sensory motor, sympathetic and parasympathetic nerves, such as calcitonin gene-related peptide (CGRP), noradrenaline (NA) and acetylcholine (ACh), respectively [1].

In EC, Ca^{2+} homeostasis and signaling depend on the activity of various ion channels and Ca^{2+} transporters, controlling the membrane potential and Ca^{2+} influx/efflux [2,5,10,11]. The main actors of Ca^{2+} influx in EC are T-type voltage-gated Ca^{2+} (Cav) channels and transient receptor potential (TRP) channels [11]. Various isoforms of TRP channels are expressed in the endothelium, and their role in Ca^{2+} dependent vasodilation, vascular wall permeability and angiogenesis have been clearly established [12]. Besides, T-type Cav channels have also proven to be involved in endothelium-dependent vasodilation by triggering Ca^{2+} entry [13,14].

The plasmalemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers (NCX) are also a pivotal actor in intracellular Ca^{2+} regulation [15,16]. In mammals, three isoforms (NCX1, NCX2 and NCX3), are encoded by three distinct genes *Slc8a1*, *Slc8a2* and *Slc8a3*, respectively [17]. These three isoforms have tissue-specific distribution. While NCX1 is ubiquitously expressed, but abundantly in the heart, NCX2 and NCX3 are mainly located in the brain and skeletal muscle, respectively. NCX have been seen as a Ca^{2+} extruding actor for a long time, but it is now well established that they also promote Ca^{2+} entry [18]. NCX are also considered as key players in cross linking Ca^{2+} and Na^+ signaling, allowing the regulation of various functions, such as cardiac rhythm and arterial blood pressure [19,20]. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange operated by NCX is complex, but well described [15,16]. The Ca^{2+} efflux mode exchange does not require extracellular Ca^{2+} and is inhibited by high extracellular Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]_e$). The Ca^{2+} influx mode exchange is activated by an increase of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), a high intracellular Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]_i$) [15,16]. NCX activity could be also regulated through phosphorylation by PKA and PKC, which increase the affinity of Na^+ and Ca^{2+} to NCX [21].

Since the 1990's, NCX has been clearly proven to regulate Ca^{2+} homeostasis in EC [22–26], however, only few reports show its involvement in endothelium-dependent vasodilation [24,27–29]. It has been shown that the increase of $[\text{Na}^+]_i$ potentiates NO production, through $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation, which has been attributed to NCX in Ca^{2+} entry mode [24,27]. Indeed, the decrease of $[\text{Na}^+]_i$ inhibits NO-dependent relaxation, through Ca^{2+} efflux mediated by NCX [28]. Because these data have been obtained by manipulating $[\text{Na}^+]_i$, the physiological role of NCX in endothelium-dependent vasodilation remained in debate. Recently, it has been proven that NCX1 directly participates to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by ATP or ACh, leading to NO and EDHF production, using EC from rat mesenteric arteries (MA) [29].

In the endothelial cells, HUVEC, a functional coupling between NCX and voltage-gated Na^+ (Nav) channels has been evidenced and may be involved in angiogenesis [30]. Interestingly, the activation of Nav channels, with veratridine (VTD) induces the vasodilation of cremaster and retinal arterioles, suggesting the role of these ion channels in the release of endothelial vasodilator factors [13,31]. Moreover, it has been proven that the contraction of VSMC of MA induced by VTD is mediated by activation of Nav channels, and subsequent NCX activation [32]. However, the mechanisms underlying VTD-induced vasorelaxation or contraction have not been clearly defined on isolated arteries.

As a matter of facts, VTD can activate Nav channels in EC, VSMC and neuronal network in isolated arteries and the resulting contractile responses could be tricky to delineate. Hence, the present study aimed to investigate the mode of action of VTD on murine MA by using wire myography. We found that VTD induced distinct responses depending on MA types: a relaxation of cecocolic arteries (CA) and a contraction of first order MA (FOMA). Using a pharmacological approach, we explored the role of NCX in VTD-induced vasorelaxation and found that VTD triggers ACh release in CA. Moreover, by using

the Mile Sven 1 pancreatic endothelial cell line (MS1 EC) as an EC model, we showed that Ach-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation depends on NCX in Ca^{2+} influx mode.

2. Results

2.1. Effects of Veratridine on two different branches of mesenteric arteries

To investigate the effects of VTD (30 μ M) on the vascular reactivity of MA, we used CA and FOMA, two different branches of MA from mice, which were beforehand stimulated to reach 50 % of maximal contraction with the analogue of thromboxane A2, U46619, in the presence or absence of the α 1-adrenoreceptor antagonist, prazosin (PZ) at 1 μ M (Figure 1a). Surprisingly, VTD triggered sustained (Figure 1b) or transient (Figure 1c) vasorelaxant responses in CA, in the absence and presence of PZ. Vasorelaxant responses were also obtained with middle colic arteries (Supplementary Figure S1). In contrast, VTD mediated vasoconstriction in FOMA (Figure 1d), as already described by Ho *et al.* [32]. However, this contractile effect was abolished by PZ (Figure 1d).

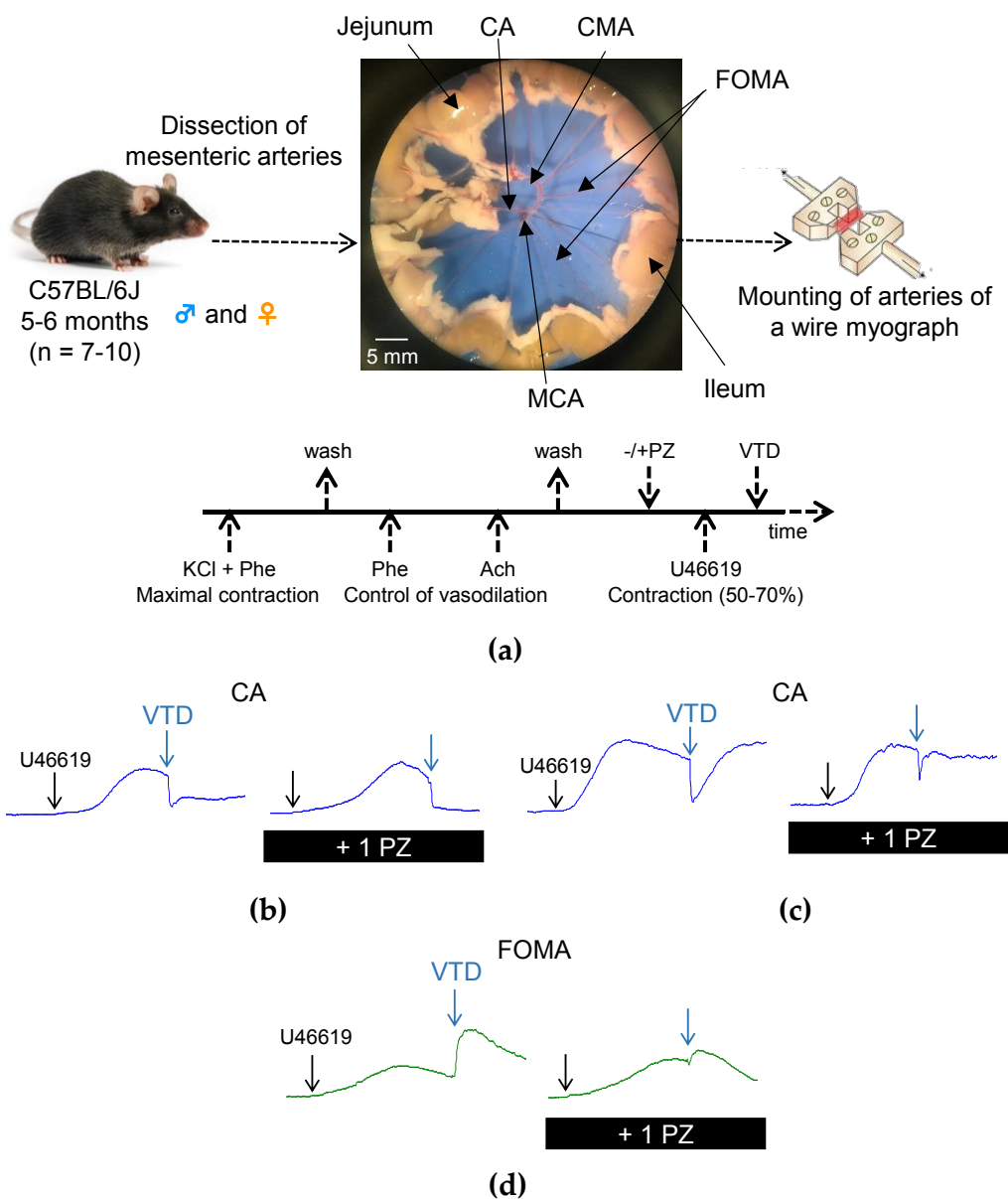


Figure 1. Vasomotor responses to veratridine in CA and FOMA. (a) Schematic diagram and illustration of the experimental protocol used in this work. The image shows murine mesenteric arteries

98
99

100
101

102
103
104
105
106
107
108
109
110

111
112
113

and their different branches: cranial mesenteric artery (CMA), cecocolic artery (CA), middle colic artery (MCA) and first order mesenteric artery (FOMA). FOMA and CA irrigate jejunum-ileum and cecum, respectively. Below, the flow chart illustrates the experimental strategy. First, each artery was contracted with KCl (80 mM) and phenylephrine (Phe, 2 μ M), given maximal contraction level. Then relaxation with Ach (2 μ M) was assayed to control endothelial response. After four washes, the arteries were stimulated with U46619 (10-90 nM) to reach 50-70 % of maximal contraction. VTD (30 μ M) was applied in the absence or the presence of 1 μ M PZ (-/+). **(b,c)** Representative force myograph traces obtained with isolated CA, illustrating vasorelaxant responses to bath application of VTD. **(d)** Representative force myograph traces showing contractile effects of VTD in FOMA. The arrows indicate bath applications of U46619 (in black) and VTD (in blue) according to the protocol shown in panel **(a)**.

To characterize the contribution of sympathetic innervation in contractile response mediated by VTD in FOMA, we analyzed in detail the wall tension development in the absence and presence of PZ (Figure 2). VTD (30 μ M) induced a significant increase of contraction levels of FOMA by 2.0-fold ($p < 0.01$) from males and by 1.6-fold ($p < 0.01$) from females (Figure 2a). However, in the presence of PZ, VTD did not modify the contraction levels of FOMA from males ($p = 0.69$) and females ($p = 0.48$) (Figure 2b). Thus, PZ totally suppressed the contraction mediated by VTD in FOMA from males ($p < 0.01$) and females ($p < 0.05$) (Figure 2c), highlighting that this Nav channel activator stimulates noradrenaline (NA) release from sympathetic nerve endings in this branch of MA.

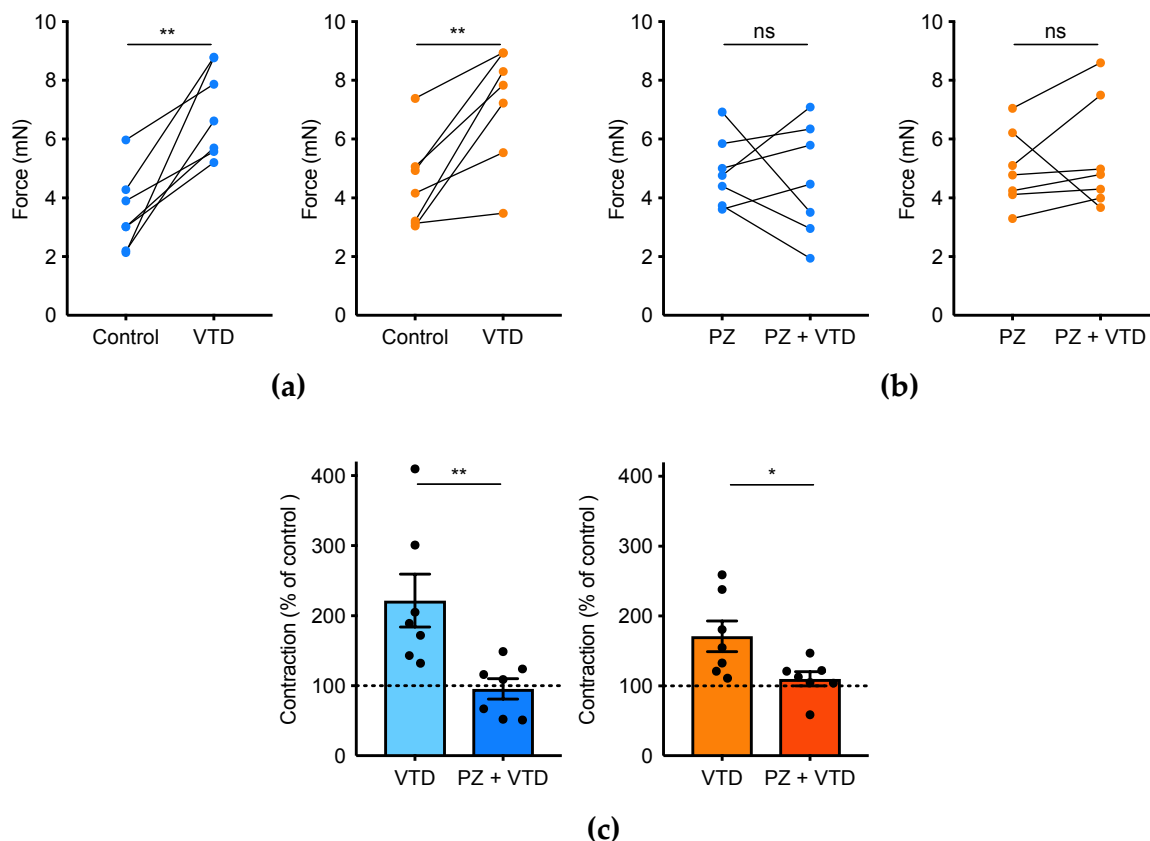


Figure 2. Veratridine induced contraction in FOMA. The levels of wall tension (Force, mN) of pre-contracted FOMA by U46619 were measured before and after application of VTD (30 μ M) in the absence **(a)** or the presence **(b)** of PZ (1 μ M). **(c)** Scatter plots illustrating normalized contraction levels of FOMA in % evoked by VTD. These analyses were performed with data shown in **(a)** and **(b)**. FOMA were isolated from male (blue) and female (orange) mice. Paired **(a, b)** and Unpaired **(c)** t test, ns non significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Values are means \pm SEM ($n = 7$).

114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124

125
126
127
128
129
130
131
132
133

134
135
136
137
138
139
140

In CA from males, VTD (30 μ M) significantly decreased contraction of CA by 3.6-fold (p<0.0001), but not in CA from females (p=0.92) (Figure 3a). In the presence of PZ, VTD induced a 5.3-fold (p<0.0001) and 3.3-fold (p<0.0001) in CA from males and females, respectively (Figure 3b). Hence, PZ unmasked the VTD-induced vasorelaxant effects on CA from females (Figure 3c). The addition of atropine (AP) at 100 nM, totally suppressed the VTD-induced relaxation of CA from males (p<0.001) (Figure 3c). We assumed that AP effects would be similar on CA from females. Thus, while PZ did not modify the VTD-induced relaxant responses (p=0.87), AP significantly abolished these effects (Figure 3c), suggesting that VTD induced Ach release from parasympathetic nerve endings in CA.

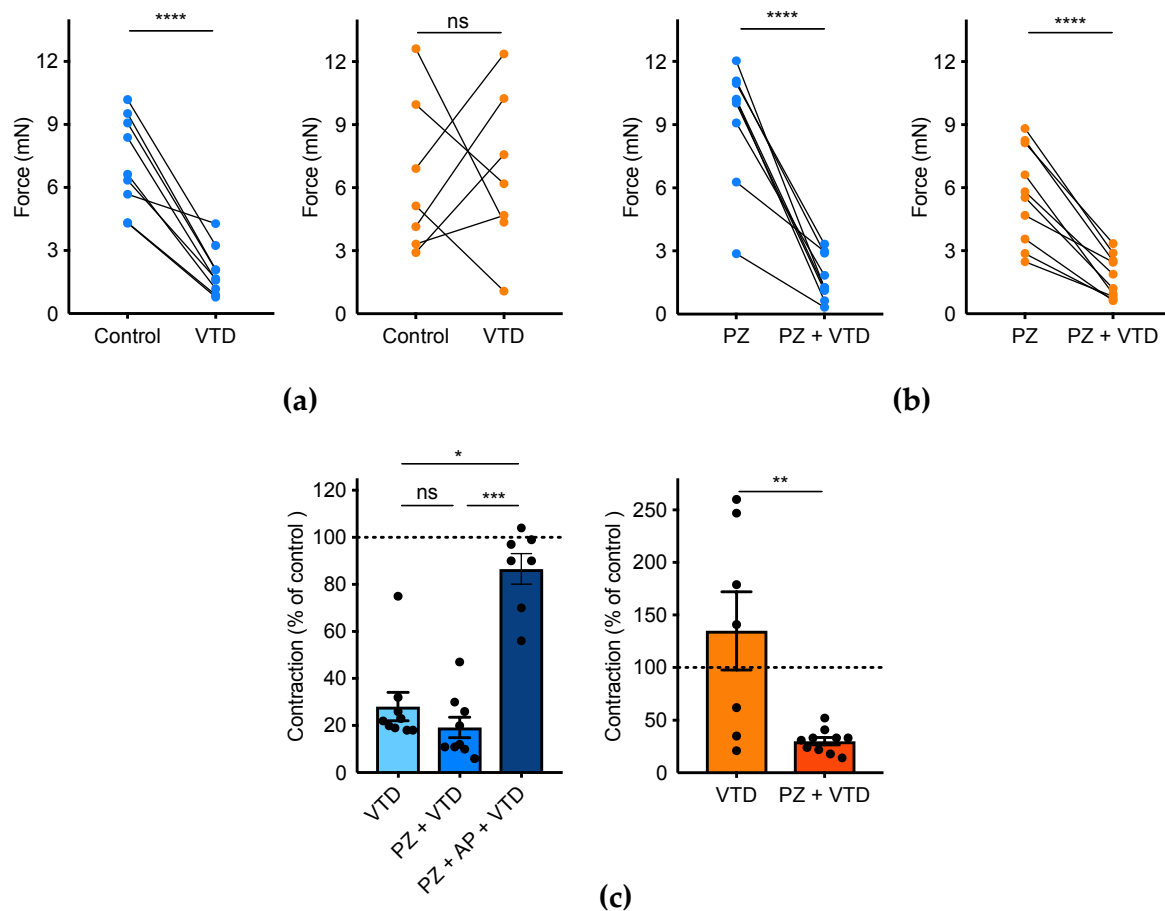


Figure 3. Veratridine induced vasorelaxation in CA. The wall tension generated by CA were measured before and after application of VTD at 30 μ M in the absence (a) or in the presence (b) of PZ at 1 μ M (n=7). (c) Scatter plots illustrate normalized contraction levels in CA (% of control) evoked by VTD. These analyses were based on data shown in (a) and (b). The left panel shows the effects of PZ (1 μ M) and AP (100 nM) on VTD-induced vasorelaxant effects in CA isolated from males. The right panel illustrates the effect of PZ in CA isolated from females. CA were contracted by U46619. Paired t test (a, b), Kruskal-Wallis test (c, left) and Unpaired t test (c, right), ns non significant, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Values are means \pm SEM.

Thus, VTD induced distinct responses in CA and FOMA. Since the contractile effects of VTD in FOMA has been already studied elsewhere [32], we focused our study on the VTD-induced vasorelaxation in CA. Such vasorelaxant effects have been reported in mouse cremaster arteries, but its mechanism has not been characterized [13].

Additionally, the VTD-induced relaxation responses were totally inhibited by the selective inhibitor of Nav channels, tetrodotoxin (TTX) used at 0.3 μ M or 1 μ M, suggesting

that the observed effects are mediated by TTX-sensitive Nav channels. (Figure 4a). As expected, this response is also largely reduced in low Na⁺ containing physiological salt solution (p<0.001) (Figure 4b).

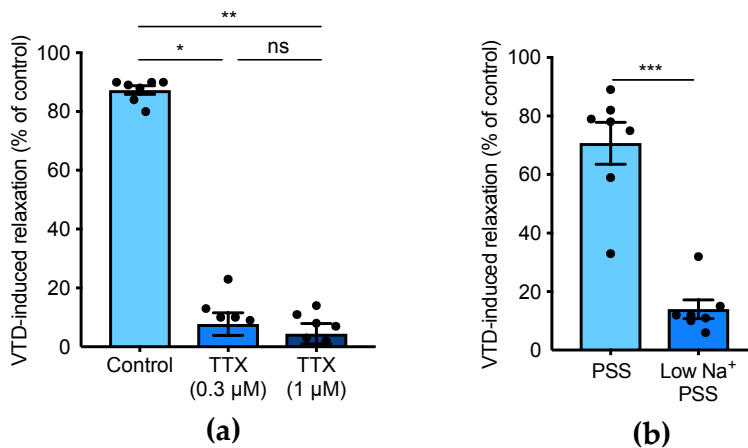
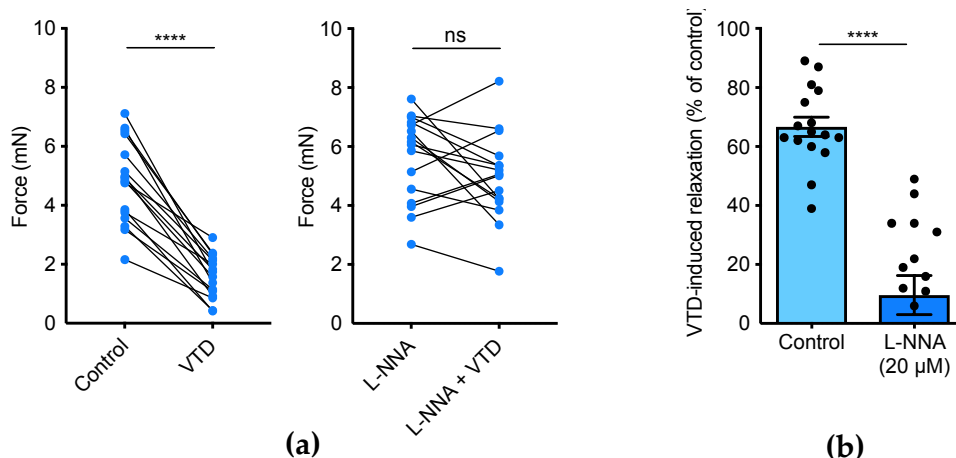


Figure 4. Effects of TTX and extracellular Na⁺ on veratridine-induced vasorelaxation in cecocolic arteries. **(a)** Scatter plots illustrating the VTD-induced relaxation (30 μM) in the presence of TTX (0.3 and 1 μM). **(b)** Scatter plots showing the reduction of VTD-induced vasorelaxant effects of CA in low Na⁺ PSS. PZ (1 μM) was used in all experiments. CA were isolated from male mice. Multiple comparison Kruskal-Wallis test **(a)** and Mann-Whitney test **(b)**, ns non significant, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Values are means ± SEM (n=7). PSS: physiological salt solution.

2.2. Implication of NO pathway in VTD-induced vasorelaxation of cecocolic arteries

Thus, we assumed that the VTD-induced vasorelaxation in CA was likely due to Ach release which could stimulate the production of vasorelaxant endothelial factors, such as NO. Then, we first investigated the implication of NO pathway by using N(ω)-nitro-L-arginine (L-NNA), a NO synthase inhibitor. In this set of experiments, each U46619-contracted artery was first stimulated by VTD in the presence of PZ, and after washing, the experiment was repeated in the presence of L-NNA (20 μM) (Figure 5). As described above, VTD significantly decreased the contraction levels of CA by 2.5-fold (p<0.0001), while in the presence of L-NNA, VTD had no more effect on the contraction of CA (p=0.18) (Figure 5a). Therefore, L-NNA totally suppressed the VTD-induced vasorelaxant responses (p<0.0001) (Figure 5b), indicating that the application of VTD on isolated CA, induced Ach release which in turn activates NO production in the endothelium, leading to vasorelaxation.



165
166
167

168
169
170
171
172
173
174

175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187

188

Figure 5. Effects of L-NNA on veratridine-induced vasorelaxation in CA. **(a)** The graph shows the contractile force generated by isolated CA before and after the application of VTD (30 μ M) (left panel). In the presence of L-NNA (20 μ M), the decrease of wall tension induced by VTD disappeared (right panel). **(b)** The scatter plots illustrate the reduction of VTD-induced vasorelaxant responses of CA by L-NNA. All experiments were carried out on precontracted CA with U46619 in the presence of PZ (1 μ M). CA were isolated from male mice. Paired t test **(a)** and Unpaired t test **(b)**, ns non significant, **** $p < 0.0001$. Values are means \pm SEM (n=16).

2.3. NCX inhibition partially abolished VTD-induced vasorelaxation of cecocolic arteries

Since NCX participates to the activation of NO production in EC [24,27,29], we decided to challenge the contribution of this Ca^{2+} transporter in VTD-induced vasorelaxation of CA, by using two antagonists, namely KB-R7943 and SEA0400 [33]. In the presence of KB-R7943 (10 μ M), the VTD-induced vasorelaxant responses were strongly decreased by 2.6-fold ($p < 0.0001$) and by 3.5-fold ($p < 0.001$) in CA from males and females, respectively (Figure 6a). In addition, SEA0400 also significantly reduced VTD-induced effects in a concentration-dependent manner in CA from males and females (Figure 6B). We did not use higher concentrations of these NCX inhibitors in order to avoid unspecific effects. These results suggested that NCX likely mediates NO pathway activation in EC in response to VTD-induced Ach release in CA.

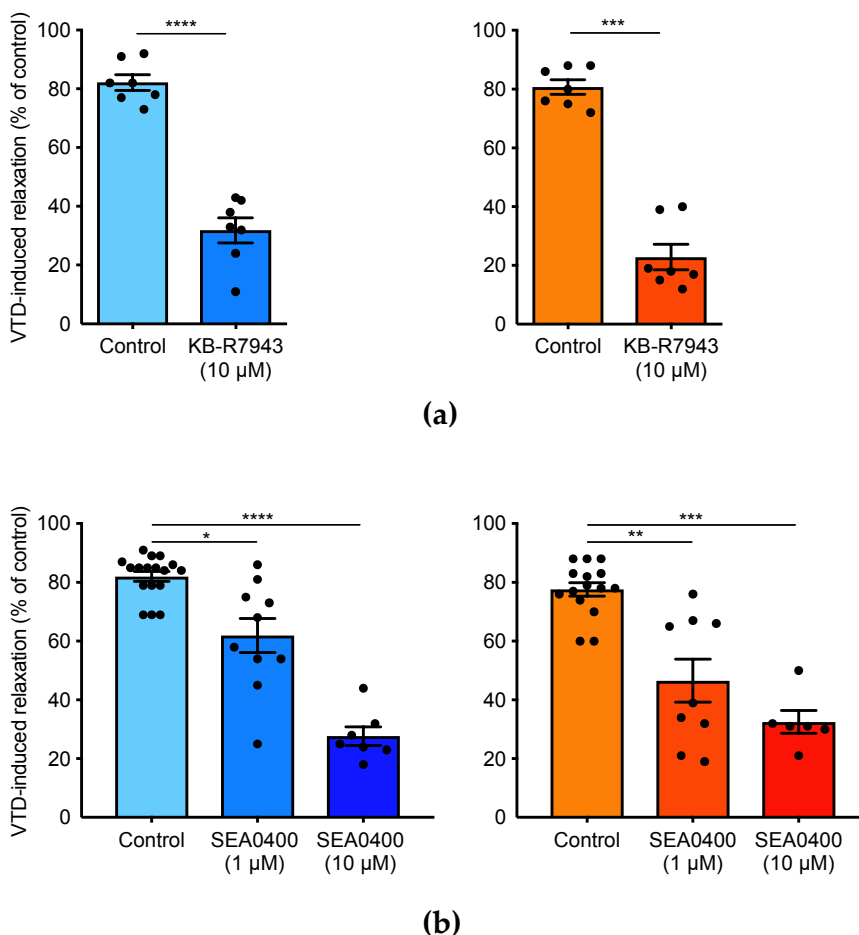
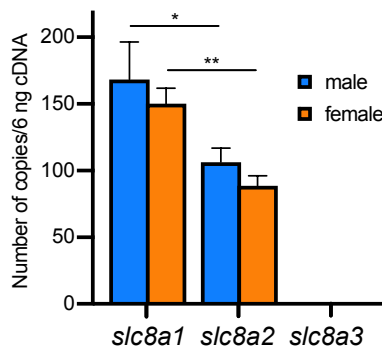


Figure 6. Effects of NCX antagonists on VTD-induced vasorelaxation of CA. The scatter plots illustrate the reduction of VTD-induced vasorelaxant responses of CA by KB-R7943 (10 μ M, NCX blocker) **(a)** or by SEA0400 (1 and 10 μ M, NCX1 blocker) **(b)**. CA were pre-contracted by U46619 in the presence of PZ (1 μ M). CA were isolated from male (blue) and female (orange) mice. Mann-Whitney test **(a)** and multiple comparison Kruskal-Wallis test **(b)**, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Values are means \pm SEM (n=7-15).

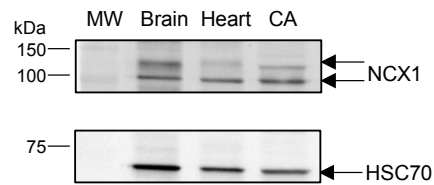
2.4. NCX inhibition partially abolished Ach-induced Ca²⁺ responses in endothelial cells

To confirm the implication of NCX in Ca²⁺ signaling of EC, we first characterized its expression in CA and isolated EC at transcriptional and protein levels. The absolute RT-qPCR data showed the expression in CA of *Slc8a1* (NCX1) and *Slc8a2* (NCX2), but not that of *Slc8a3* (NCX3). The expression levels of *Slc8a1* are 1.6-fold (p<0.05) and 1.7-fold (p<0.01) higher than that of *Slc8a2* in CA from males and females, respectively (Figure 7a). The expression of NCX1 was then characterized by western blot and immunohistochemistry. The western blot allowed the immunodetection of NCX1 in CA (Figure 7b). The anti-NCX1 antibodies showed a strong immunolabeling exclusively in EC and co-localized with the labeling of the platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM1) used as an endothelium marker (Figure 7c).

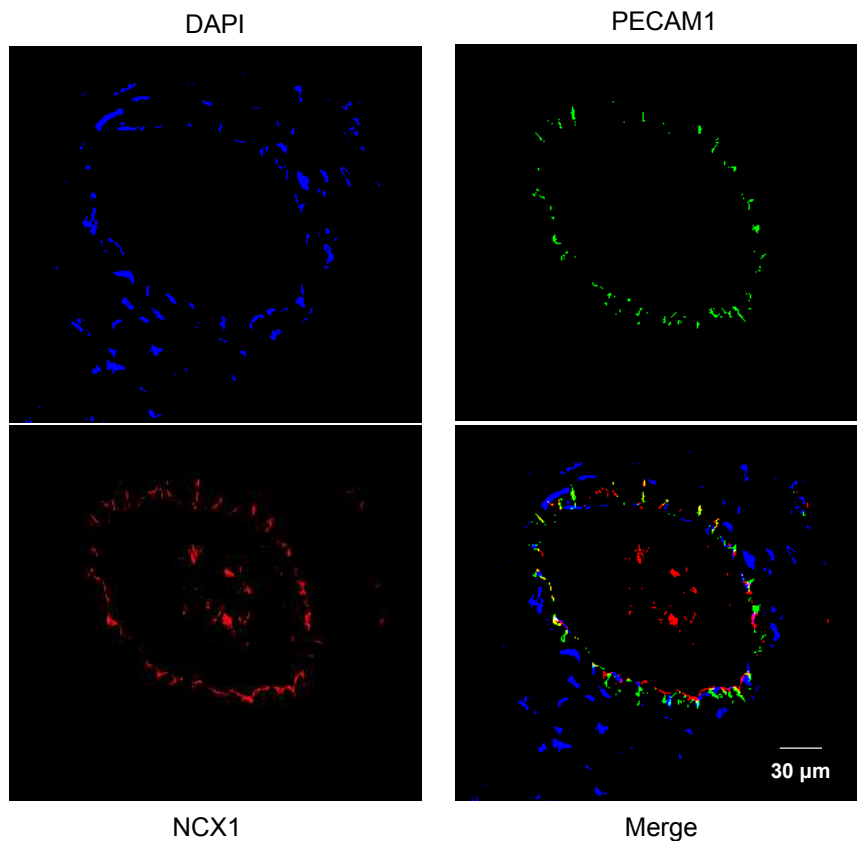
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224



(a)



(b)



(c)

Figure 7. Expression of NCX in endothelium of CA. **(a)** The histograms show the gene expression levels of NCX determined by absolute RT-qPCR in CA, collected from male and female mice. **(b)** NCX1 immunoblotting in CA. NCX1 was detected in CA at protein level by western blot with an anti-NCX1 antibodies. HSC70 was used as a loading control and mouse brain and heart as a positive control sample. The experiments were carried out with 10 µg of protein. Due to the limited size of the CA, segments of three mice were pooled. **(c)** NCX1 immunolocalization in CA. NCX1 were immunodetected in CA by anti-NCX1 antibodies (red). Endothelium was immunolabeled by anti-PECAM1 antibodies (green). Nucleus was labeled by DAPI (blue). Mann-Whitney test, * p<0.05, ** p<0.01. Values are means ± SEM (n=6). MW: Molecular Weight.

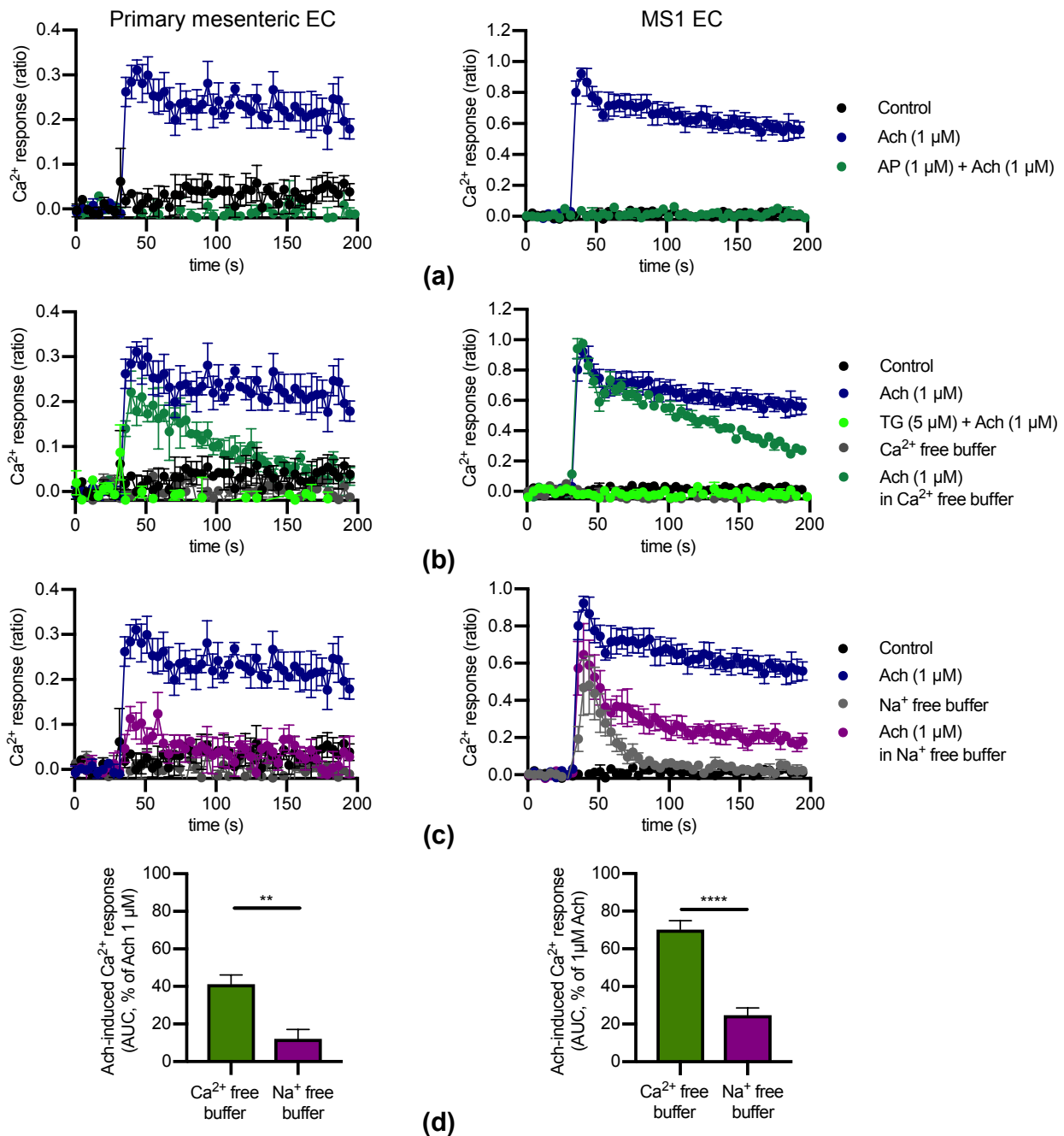


Figure 8. Comparison of Ach-induced Ca²⁺ responses in primary mesenteric and MS1 endothelial cells. The Fura-2 fluorescence assays were performed using primary mesenteric EC from mouse (left panels) and MS1 EC (right panels). **(a)** Examples of Ca²⁺ response kinetics induced by Ach. The traces represent Fura-2 fluorescent emission ratio over time before and after injection of Ach (1 µM)

226
228
229
230
231
232
233
234

235

236
238
239

and AP (1 μM) + Ach (1 μM). **(b)** Ach-induced Ca^{2+} responses in Ca^{2+} free buffer or after Ca^{2+} store depletion. The kinetic traces of Fura-2 fluorescent emission ratio were obtained after injection of Ach (1 μM) in normal Ca^{2+} buffer and in the presence of TG (5 μM , SERCA inhibitor). For comparison, the Ca^{2+} -responses of Ach (1 μM) were surimposed in Ca^{2+} free buffer. **(c)** Ca^{2+} responses induced by Ach (1 μM) in normal Ca^{2+} buffer and in Na^+ free buffer. **(d)** The histograms illustrate normalized Fura-2 emission ratio measured after Ach injection (1 μM) in Ca^{2+} free buffer and in Na^+ free buffer. These data represent the AUC calculated from kinetic traces and after normalization by Ach-induced responses at 1 μM in normal Ca^{2+} buffer, used as control. $n=2$ for primary mesenteric EC and $n=3$ for MS1 EC. Mann-Whitney test, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$. Values are means \pm SEM. AUC: area under the curve; SERCA: sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase.

To determine the role of NCX1 at the cellular level, we measured Ach-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variation in different conditions. Because the isolation of EC led to the sacrifice of a high number of mice and a low yield of cells, this technique did not allow accurate Fura-2 fluorescence assays. As such, we used a commercially-available primary cultures of mesenteric EC from mouse and the mouse EC line, MS1 EC. These two cells responded to Ach by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation with similar kinetics: the Ca^{2+} response peaked 5 s after injection, slowly decreased during about 20 s, and then reached a plateau (Figure 8a). As expected, this response was completely inhibited by AP (1 μM), indicating that Ach-induced Ca^{2+} responses are mediated by muscarinic receptors in both cellular models. Moreover, the treatment by thapsigargin (5 μM) to deplete RE Ca^{2+} store, totally suppressed Ach-induced Ca^{2+} responses for primary mesenteric and MS1 EC (Figure 8b). In the absence of extracellular Ca^{2+} , Ach-induced Ca^{2+} response exhibited a peak with the same amplitude as control, followed by a slow decrease of the signal over the time. In low Na^+ containing buffer, the ACh-induced Ca^{2+} responses were much more reduced for both cell types in comparison to control (Figure 8c). The area under the curve (AUC) of Ach-induced Ca^{2+} response was stronger reduced in low Na^+ containing buffer than in Ca^{2+} free buffer in primary mesenteric EC (1.5-fold, $p<0.01$) and MS1 EC (2.5-fold, $p<0.0001$) (Figure 8d). Taken together, our data highlighted that MS1 EC and primary mesenteric EC exhibit similar Ca^{2+} responses to Ach and that the Ach-induced Ca^{2+} responses in EC depend on i) pivotal role of store operated Ca^{2+} release and partial role of extracellular Ca^{2+} , and ii) important role of extracellular Na^+ . Moreover, since MS1 EC express also *Chrm3*, encoding M3 muscarinic receptors, and two EC markers, *Nos3* and *Pecam1* (Supplementary Figure S2A and B), we decided thus to use these EC for further investigations.

As proposed above, we assumed that VTD-induced relaxation of CA is mediated by ACh release which in turn activates NO production in EC. Since MS1 EC expressed Nav channels at both transcriptional and protein levels (Supplementary Figure S2C and D), we needed to control the effects of VTD on these cells. By using patch-clamp recordings, or the monitoring of intracellular Na^+ concentration using the Asante NaTrium Green-2 fluorescent probe, we did not observe any effects of VTD on MS1 EC (data not shown). In addition, VTD did not trigger elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in MS1 EC (data not shown). These observations are consistent with our assessment that VTD-induced relaxation of CA is due to Ach release by parasympathetic neurons and not a direct effect of VTD in EC.

Next, since i) NCX inhibition partially reduced VTD-induced vasorelaxation of CA and ii) both extracellular Ca^{2+} and Na^+ altered Ach-induced Ca^{2+} response in MS1 EC, we decided then to analyze the contribution of NCX in these EC. As such, Ach-induced Ca^{2+} responses were evaluated in the presence of three NCX antagonists, a Pan-NCX antagonist KB-R7943, and two antagonists selective of NCX1, SEA0400 and SN-6. We first characterized NCX1 expression in MS1 EC at transcriptional and protein levels. As expected, the absolute RT-qPCR data showed the expression of only *Slc8a1* (NCX1) which was confirmed at protein levels by western blot analysis (Figure 9a,b).

When Ach (10^{-7} M) is co-injected with NCX inhibitors, Ach-induced Ca^{2+} response is fully (KB-R7943) or partially (SEA0400 and SN-6) reduced (Figure 9c). Importantly, with KB-R7943, the inhibition rate depended on Ach concentrations (Figure 9d, left panel). Indeed, the inhibition levels were higher for Ca^{2+} responses induced by 10^{-7} M of Ach (87.7%

of inhibition based on AUC determination) and progressively decreased with increasing 294
Ach concentrations (Figure 9d, left panel). The peaks of Ca^{2+} responses induced by 10^{-8} 295
and 10^{-7} M of Ach were completely crushed by KB-R7943 (inhibition levels of 97.6 and 296
93.1%, respectively. $p < 0.01$) (Figure 9c, left panel) whereas at 10^{-5} M of Ach, the inhibitory 297
effects of KB-R7943 were 2.5-fold weaker when considering the amplitude of the plateau 298
than that of peak. 299

The inhibitory effects of SEA0400 on Ca^{2+} responses were the strongest at 10^{-8} M of 300
Ach. Moreover, at this Ach concentration, the inhibition reached comparable levels when 301
examining AUC, peaks or the plateau of the Ca^{2+} responses: 55.2% ($p < 0.05$), 61.6% ($p < 0.01$) 302
and 49.1% ($p < 0.05$) (Figure 9d, middle panel). 303

As observed with SEA0400, the strongest inhibitory effects of SN-6 were observed at 304
 10^{-8} M of Ach (Figure 9c, right panel). At this Ach concentration, the inhibition reached 305
similar levels: 71.1% ($p < 0.01$), 84.6% ($p < 0.01$) and 87.6% ($p < 0.05$), when the global response 306
(AUC), peak amplitude or plateau levels were measured, respectively. At higher Ach con- 307
centrations (10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} M), the inhibitory effects of SN-6 were much lower (about 308
20%) (Figure 9d, right panel). Taken together, our data showed that NCX1 mainly con- 309
tribute to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by Ach in EC. 310

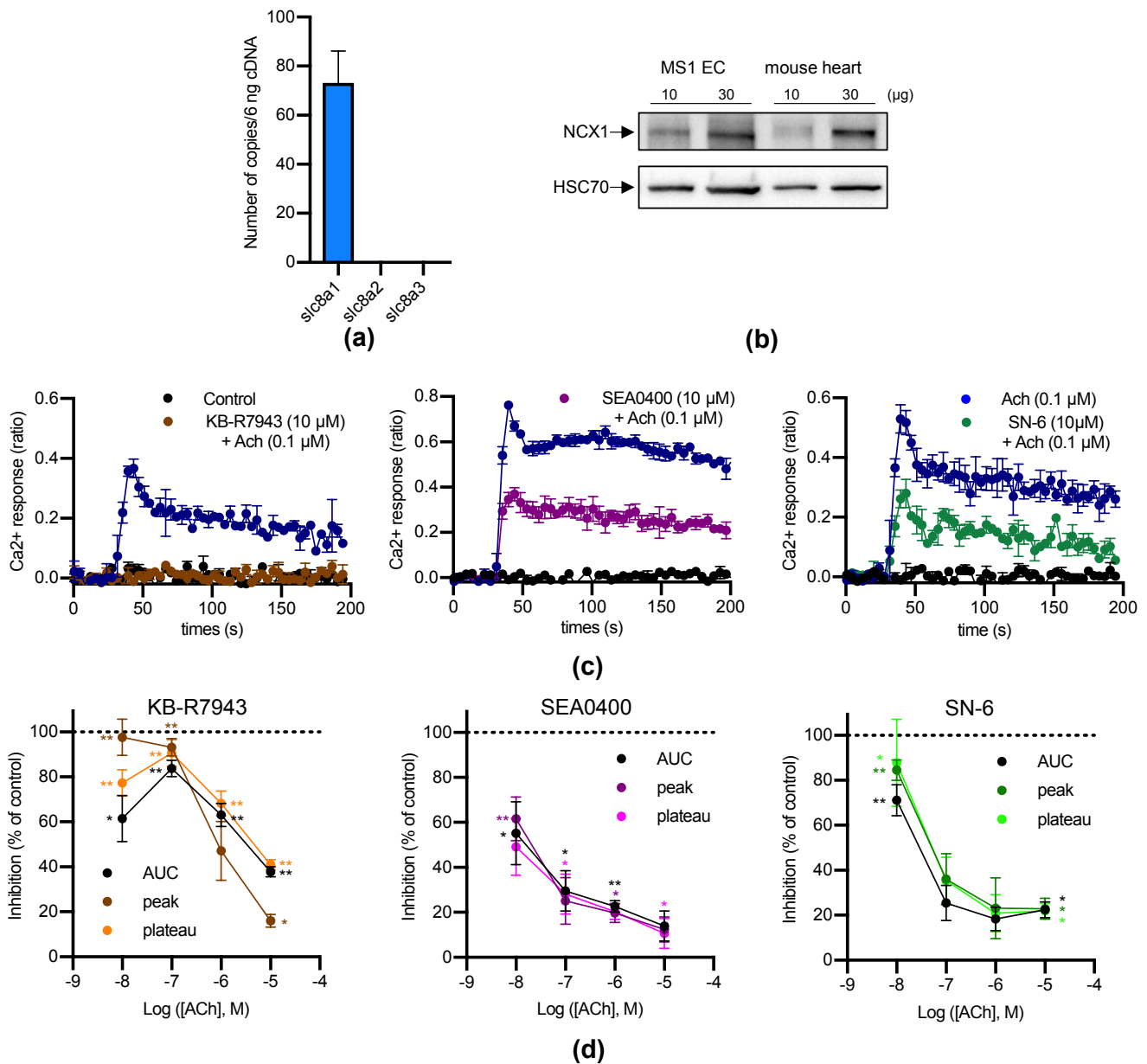


Figure 9. Effects of NCX antagonists on Ach-induced Ca²⁺ responses generated by MS1 endothelial cells. **(a)** The gene expression profile of NCX isoforms was established in MS1 EC by using absolute RT-qPCR. **(b)** NCX1 were detected in MS1 EC at protein level by western blotting. HSC70 was used as a loading control and mouse heart as a positive control sample. **(c)** The kinetic examples of Ach-induced Ca²⁺ responses in the presence of NCX antagonists. The traces represent Ca²⁺ responses induced by 0.1 μM Ach in the absence or presence of KB-R7943 (left panel), SEA0400 (middle panel) and SN-6 (right panel). **(d)** The curves illustrate the inhibitory effects of KB-R7943 (left panel), of SEA0400 (middle panel) and of SN-6 (right panel) on Ca²⁺ responses induced by 0.01, 0.1, 1 and 10 μM of Ach. The analyses were performed by using AUC, peak amplitude and plateau levels. The data (AUC) were normalized by Ach-evoked Ca²⁺ response at 10 μM. The mean values of inhibitory effects were compared to 0% using one-sample t test (* p<0.05, ** p<0.01). Values are means ± SEM (n=3).

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

2.5. Inhibition of PKC reduced Ach-induced Ca^{2+} responses in endothelial cells

Because the Ca^{2+} signaling pathway activated by Ach leads to PKC activation, which is known to increase NCX1 activity by phosphorylation [34,35], we tested the effects of its inhibition by chelerythrine (Che), a Pan-PKC inhibitor [36]. Ca^{2+} responses were induced according to the same protocol used for testing NCX inhibitors. At 10^{-5} M, Che significantly reduced Ca^{2+} responses in Ach concentration-dependent manner (Figure 10). Based on AUC determination, the inhibitory effects were the strongest at 10^{-8} M Ach (100.0%, $p < 0.01$) and were progressively decreased to reach 31.6% ($p < 0.01$) of inhibition at 10^{-5} M (Figure 10a). These Ach concentration-dependent effects of Che were also observed at peak amplitude and plateau levels (Figure 10b,c). However, the peak amplitude of Ca^{2+} responses was not significantly decreased by Che at 10^{-6} M Ach (29.8%, $p = 0.11$) and Che did not affect the peak amplitude at 10^{-5} M Ach (4.4%, $p = 0.40$) (Figure 10b).

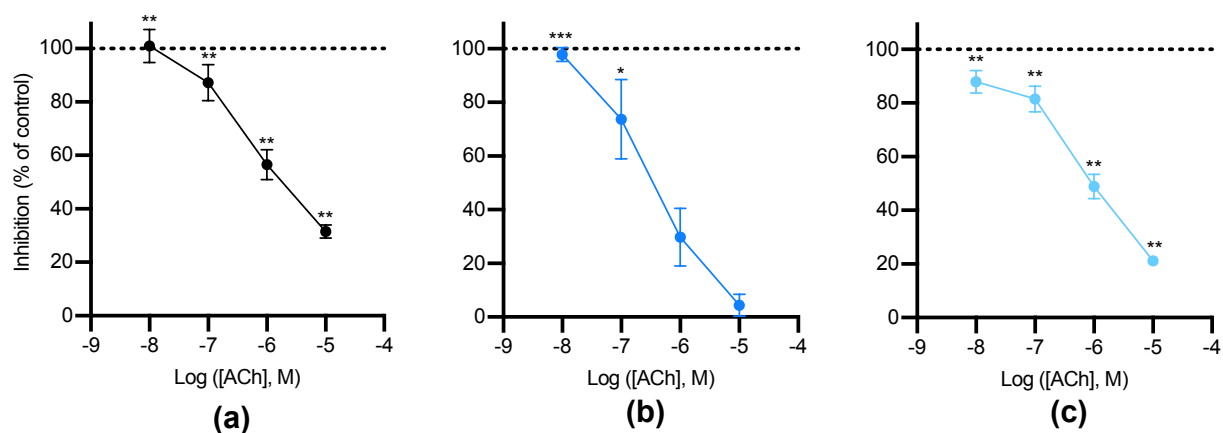


Figure 10. Effects of chelerythrine, a PKC antagonist on Ach-induced Ca^{2+} responses in MS1 EC. The curves represent the inhibitory effects of chelerythrine ($10 \mu\text{M}$) on Ca^{2+} responses induced by 0.01, 0.1, 1 and $10 \mu\text{M}$ of Ach in MS1 EC. The analyses were based on AUC (a), peak amplitude (b) and plateau levels (c). The data were normalized by Ach-induced Ca^{2+} response at $10 \mu\text{M}$. The mean values of inhibitory effects were compared to 0% using one-sample t test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Values are means \pm SEM ($n = 3$).

3. Discussion

In the present study, we determined that VTD induces vasoconstriction in FOMA, while it triggers vasorelaxation in CA, showing that this Nav channels activator induces distinct vasomotor responses within the mesenteric arterial bed. These responses were suppressed by α -1 adrenoceptor antagonist in FOMA and by muscarinic receptor antagonist in CA, revealing that VTD activates neuronal Nav channels and thus stimulates NA and Ach releases from in sympathetic and parasympathetic nerve endings. Here, we focused our study on VTD-induced vasorelaxation in CA, in which Ach release leads to the activation of eNOS and likely, to subsequent endothelial NO production. In fact, VTD had no direct effect on endothelial $[Ca^{2+}]_i$, even though they express Nav channels at both transcriptional and protein levels. However, we evidenced that Ach-induced vasorelaxation depends on the activity of NCX1 in Ca^{2+} entry mode.

We first aimed to study the role of Nav channels endogenously expressed in EC and VSMC in vasomotor regulation of small arteries. However, in FOMA and CA, the contractile responses induced by VTD were totally suppressed by α -1 adrenoceptor or muscarinic receptor antagonists, indicating that VTD affected neurotransmitter release in isolated arteries. Thus, in our conditions, the arterial responses induced by VTD did not result from the activation of vascular Nav channels. Indeed, VTD has been extensively used to study the implication of vascular Nav channels in contraction of isolated arteries [13,32,37–39].

However, the α -1 adrenoceptor antagonist PZ strongly reduced VTD-induced contraction of rat MA [32] and suppressed vasoconstriction of rat aorta [37] and human uterine arteries [38]. This indicates that VTD activates Nav channels of perivascular nerve endings, and its vascular effects arise from the release of NA. However, we could not exclude the contribution of Nav channels which are expressed in EC or VSMC in vascular motricity. In this context, the vascular effects of VTD must be carefully considered and the role of Nav channels endogenously expressed in EC and VSMC in physiological conditions remains unclear.

We demonstrated that the contractile effect of VTD on MA depend on the branch type, reflecting difference in the vasomotor innervation. Then, VTD induced contraction in FOMA and vasorelaxation in CA, which are known to be densely innervated [40]. Indeed, it is well established that FOMA and other branches of cranial mesenteric arteries (Figure 1a) are innervated by adrenergic and CGRP nerves, which are vasoconstrictor and vasodilator, respectively [40–43]. None or few cholinergic nerves have been detected in FOMA and they are not associated with vasomotor regulation [42]. Thus, our data are consistent with these statements, as VTD-induced vasoconstriction in FOMA is abolished by α -1 adrenoceptor antagonist. However, the innervation of CA has not been described in detail, but the fact that the VTD-induced vasorelaxation was abolished by muscarinic receptor antagonist strongly suggests that this branch contains vasomotor cholinergic nerves. These differences in the vasomotor innervation between FOMA and CA likely reflect differences in jejunum-ileum and cecum vascularisation to allow a fine control of the blood flow throughout the mesenteric bed. Further experiments would help to confirm the distribution and function of cholinergic nerves in CA.

Here, we assume that VTD induced Ach release from parasympathetic nerves and subsequently endothelial NO production which triggered the vasorelaxation. Indeed, we observed that L-NNA suppressed VTD-induced vasorelaxation in CA. Since endothelial NO synthase (eNOS) activity is regulated by Ca^{2+} -dependent pathway and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway, we can postulate that VTD indirectly evokes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in EC [44]. In addition, regarding that Ach induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation mediated by Gq coupled muscarinic receptors, we assume that this pathway is involved in eNOS activation observed in CA treated with VTD. Moreover, the NCX antagonists KB-R7943 and SEA0400 significantly reduced VTD-induced vasorelaxation of CA, suggesting that endothelial NCX contributes to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation and subsequently to NO production as previously described [24,27,29]. This assessment is supported by our observation showing the expression of NCX1 in the endothelium of CA and in dissociated EC.

VTD did not affect $[\text{Na}^+]_i$ concentration, nor $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in MS1 EC, thereby the Nav channels expressed in these cells are not involved in the regulation of NO production by the endothelium. Thus, we could exclude the implication of endothelial Nav channels in the VTD-induced relaxation observed in CA, which is more likely due to Ach release, and in turn, store operated Ca^{2+} release, leading to eNOS activation [45]. By monitoring $[\text{Ca}^{2+}]_i$, we found that primary EC from MA and MS1 EC exhibit similar response to Ach, with a peak and a sustained component as previously described [46]. The Ach-induced Ca^{2+} responses in both cell models are initiated by Ca^{2+} release from intracellular stores, as they were inhibited by incubation with thapsigargin. Moreover, ACh-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation is significantly reduced in Ca^{2+} free or Na^+ free media, in agreement with previous studies [24]. By the way, our data show that MS1 EC represent a suitable cellular model to investigate endothelial Ca^{2+} signaling.

Our data evidenced that only *Slc8a1* transcripts were expressed in dissociated EC from MA and MS1 EC, suggesting that only NCX1 is expressed in the endothelium. Thus, the reduction of Ach-induced Ca^{2+} elevation by NCX inhibitors in MS1 EC revealed the contribution of the Ca^{2+} exchange entry mode of NCX1 in Ca^{2+} signaling. This mechanism could explain why NCX and eNOS inhibitors also reduced VTD-induced vasorelaxation of CA. Since L-NNA totally suppressed the VTD-induced vasorelaxation of CA, we did not explore the implication of NCX1 in EDHF pathway, although the EDHF pathway has

been shown to contribute to vasorelaxation induced by Ach in MA from rat [29]. The Ca²⁺ exchange entry mode of NCX1 in EC has been also proven in other EC models, such as EC from MA, HUVEC and cardiac microvessels [25,26,29]. Our findings bring novel evidence of the Ca²⁺ entry mode of NCX1 in endothelium, which must be considered as a significant actor in Ca²⁺-dependent vasodilation.

In another physiological context, NCX inhibition has been shown to attenuate [Ca²⁺]_i elevation induced by VEGF and thrombin in HUVEC [47,48]. Indeed, NCX1 contributes to Ca²⁺-activated endothelium-mediated vasodilation in response to mediators, such as Ach, ATP and bradykinine [24,27,29] and our data reinforce this statement. In particular experimental conditions, when [Na⁺]_i is enhanced by monensine, it has been proven that NCX1 also promotes Ca²⁺ extrusion in EC [23,25,28,49]. Altogether, this highlights the pivotal role of NCX1 in the regulation of Ca²⁺ homeostasis in EC and thereby in the production of endothelium-dependent vasodilators.

Here, we showed that the inhibition of PKC decreased the Ach-induced Ca²⁺ responses in EC. Since PKC is known to be a positive regulator of NCX1 by increasing Na⁺ and Ca²⁺ affinities [35], it is possible that Ach-induced PKC activation which in turn increases NCX1 activity in EC. Importantly, PKC also requires Ca²⁺ for its translocation to the plasma membrane in order to be fully activated [50]. Notably, it has been proven that the Ca²⁺ entry mediated by NCX allows PKC translocation to the plasma membrane in HUVEC [51]. Needless to say, PKC regulates the activity of different ion channels that in turn modulate [Ca²⁺]_i, such as store-operated Ca²⁺ channels, TRP and BK_{Ca} channels [12,52,53]. Moreover, PKC also modulates Na⁺/K⁺-ATPase, sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) and plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) [54–56]. Concerning eNOS regulation by PKC, controversial conclusions have been made in the literature, some studies have revealed that PKC activation induces eNOS activation [57,58] and other have demonstrated an inhibition of eNOS by PKC stimulation [59,60]. Thus, further experiments will be necessary to evidence the involvement of PKC in Ach-induced Ca²⁺ entry by NCX1. Another aspect to be considered is that the PKC modulation in Ach-induced Ca²⁺ elevation could be the consequence of the modification of NCX1 partners, such as Na⁺/K⁺-ATPase [28,61], PMCA, SERCA [25,62] and TRPC channels [51].

4. Materials and Methods

4.1 Chemicals and reagents

VTD was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). TTX was from Latoxan (Valence, France). U46619 was from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). Fura-2-AM and Optical Cutting Temperature (OCT) compound were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). All other chemicals including Ach, phenylephrine (Phe), PZ, AP, L-NNA, KB-R7943, SEA0400, SN-6, thapsigargin, Che and pluronic®-F127 acid were obtained from Sigma-Aldrich Merck (Saint-Louis, MO, USA).

4.2 Ethical statement, animal care and conditioning

All animal procedures were carried out in accordance with the European Community council directive 2010/63/EU for the care and use of laboratory animals. The experimental procedures were approved by our respective local ethical committees (N° A49007002). The NC3R's ARRIVE guidelines were followed in the conduct and reporting of all experiments using animals. Male and female C57BL/6j (Janvier Labs, France), aged between 5 and 6 months, were used in this study. The animals were housed in individual cages (internal dimensions in mm: 369 x 165 x 132, L x W x H for 5 mice) within a controlled temperature room (21–23 °C) of the Animal facilities Unit of the Hospital University of Angers (SCAHU). They were maintained under a 12-h light/dark cycle with free access to water and food.

4.3 Wire myography

Mice were sacrificed by CO₂ inhalation using an automated chamber (Tem Segal, Pes- 470
sac, France). Two different branches of MA such as CA and FOMA were harvested and 471
their adherent tissues were removed (Figure 1a) in cold physiological salt solution (PSS, 472
in mM: NaCl, 130; KCl, 3.7; MgSO₄(7H₂O), 1.2; NaHCO₃, 14.9; CaCl₂(2H₂O), 1.6; HEPES, 473
5; KH₂PO₄, 1.2; D-glucose, 11) at pH 7.4 (pO₂ 160 mmHg and pCO₂ 37 mmHg). Arterial 474
segments with a length of 2 mm were mounted in a Mulvany-Halpern-type wire myo- 475
graph (Danish MyoTechnology, DMT, Aarhus, DK) [63]. Two tungsten wires with 40 µm 476
diameter were inserted into the arterial lumen and fixed to a micrometer and a force trans- 477
ducer. Arteries were bathed in a 5 mL PSS maintained at 37°C and at pH of 7.4 (pO₂ 160 478
mmHg and pCO₂ 37 mmHg). After wall tension normalization, arteries were stabilized 479
for 40 min. The maximal contractile capacity was evaluated using a K⁺ rich PSS (80 mM) 480
with 3 µM Phe added. To control the endothelial integrity, the arteries were contracted 481
with 2 µM Phe and then, 2 µM Ach was added to induce a vasorelaxation. Arteries which 482
did not respond to Ach, were discarded. 483

To characterize the VTD effects on vascular tone, arteries were contracted with 484
U46619 (15 to 90 nM, thromboxane A₂ analogue) to reach 50 % of maximal contraction. 485
PZ (an α-adrenoceptor inhibitor, 1 µM) or a cocktail of PZ and AP (a muscarinic receptor 486
antagonist, 100 nM) were added in chamber to inhibit the effects of NA and Ach released 487
by sympathetic and parasympathetic nerve endings, respectively, for 20 min before VTD 488
application. VTD-induced effects were analyzed in the presence of TTX (0.3 and 1 µM) or 489
in a low Na⁺ PSS (in mM: Choline chloride, 130; KCl, 3.7; MgSO₄(7H₂O), 1.2; NaHCO₃, 490
14.9; CaCl₂(2H₂O), 1.6; HEPES, 5; KH₂PO₄, 1.2; D-glucose, 11). To characterize VTD-in- 491
duced vasorelaxation responses observed with CA, experiments were performed in pres- 492
ence or absence of L-NNA (20 µM, a nitric oxide synthase inhibitor), KB-R7943 (a NCX 493
inhibitor; 10 µM) or SEA0400 (a selective NCX1 inhibitor; 1 and 10 µM). 494

4.4 Cell culture

As a model of EC, the primary murine mesenteric EC (C57BL/6 mouse primary 495
intestinal mesenteric vascular endothelial cells, M1168, Cell Biologics, Chicago, IL, USA) 496
and Mile Sven 1 MS1 murine pancreatic endothelial cell line (CRL-2279, ATCC®, authen- 497
ticated by ATCC on 03/26/2021) were used. The primary EC were cultured in complete 498
mouse endothelial cell medium (Cell Biologics) and used from passage 4 until passage 6. 499
MS1 cells were cultured from passage 8 until passage 20 at 37°C/5% CO₂ in DMEM/F12 500
(PAN-Biotech) supplemented with 10% FCS (Eurobio Scientific), 1 mM L-glutamine 501
(PAN-biotech) and 1 mM of penicillin and streptomycin solution (PAN-Biotech). 502

4.5 Quantitative real time polymerase chain reaction

To quantitate NCX transcripts expression, total RNAs were extracted from CA, iso- 503
lated mesenteric vascular cells and MS1 EC using the RNeasy micro kit (Qiagen, Courta- 504
boeuf, France), as described previously [64]. 300 ng of total RNA was processed for cDNA 505
synthesis using random hexamers and the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). 506
Real-time PCR assays were assessed on a LightCycler 480 Instrument II (Roche, Meylan, 507
France) using Sybr® Select Master Mix (Applied Biosystems®), 6 ng of cDNA in duplicate 508
and gene-specific primers (See Table 1) previously designed using the Primer3 Software. 509
The cycle threshold method was used to determine differences in transcript expression 510
levels, as described earlier [65]. Amplification specificity was confirmed by one peak-melt- 511
ing curve at the end of the amplification process. To perform the absolute quantification 512
method, mouse *Slc8a1* to 3 cDNA clones (ABIN4099663, ABIN4102124 and ABIN4102129, 513
Genomics, Aachen, Germany) were used. All cDNA sequences were verified and guaran- 514
teed by Genomics. To calculate copy numbers of transcripts, cDNA copies were evaluated 515
using the calibration curve method from the recombinant double stranded plasmid DNA 516
molecule as previously described [66]. The cDNA copy numbers of 8 plasmid dilutions 517
518
519
520

were used to establish the calibration curves for each gene, allowing PCR efficiency determination (~100% for each gene). For relative quantification method, gene expression levels were normalized to the mean of expression levels of 3 validated housekeeping genes using the $2^{-\Delta Ct}$ method: *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *Hprt* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) and *Gusb* (beta-glucuronidase).

Table 1. Sequence of primers used for real-time RT-PCR

Gene Name	Genbank Accession Number	Protein Name	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
<i>Scn1a</i>	NM_018733.2	Nav1.1	ttgcaaggggcttctgttta	aggtccacaaactccgtcac
<i>Scn2a</i>	NM_001099298.2	Nav1.2	gggttgcataatggtttccaa	cccaaggcatttgagttta
<i>Scn3a</i>	NM_018732.3	Nav1.3	tcctcagtagtggtgcttgg	gatgtaagtgaagactttgcagca
<i>Scn4a</i>	NM_133199.2	Nav1.4	gaaaccatcacgggtcatcc	tccgagagcttttccacagac
<i>Scn5a</i>	NM_021544.4	Nav1.5	gccagatctctatggcaacc	ttgcccttattcagcacgat
<i>Scn8a</i>	NM_001077499.2	Nav1.6	ctggtgctggttgacttc	gccagggcattagctataa
<i>Scn9a</i>	NM_001290674.1	Nav1.7	gctgagcctatcaatgcaga	actggcagcatggaaatct
<i>Scn10a</i>	NM_001205321.1	Nav1.8	tgggtagcttatggctcaaa	ctatgaggcttgtagggaga
<i>Scn11a</i>	NM_011887.3	Nav1.9	ttcataatgtgtggaactgg	ttattgcacgtggaaccatc
<i>Chrm1</i>	NM_001112697.1	M1 receptor	cccccaagatggattgaa	tttctcagagtaagggtcatc
<i>Chrm2</i>	NM_033269.4	M3 receptor	ttccatcatgatacacacca	aatgtcacgtgcttggtcac
<i>Chrm3</i>	XM_006499099.5	M5 receptor	cagcaagctaccctgaatcc	aagcaaaccagactgtgatcatt
<i>Slc8a1</i>	NM_001112798.2	NCX1	ccatcctagggcagcaca	tcgtctcttaatgagttgtcca
<i>Slc8a2</i>	NM_148946.2	NCX2	cattacgaggatgcttgg	catcatccactatctgacctga
<i>Slc8a3</i>	NM_080440.3	NCX3	ggaagccatcactgttagtgc	tgcatgacgtagtaaagcag
<i>Nos3</i>	NM_008713.4	eNOS	ccagtgcctgcttcatc	gcagggcaagtaggatcag
<i>Pecam1</i>	NM_008816.3	CD31	ccagtgcctgcttcatc	gcagggcaagtaggatcag
<i>Gusb</i>	NM_010368.1	Gus	ctctggtggccttacctgat	cagttgtgtcaccttcacctc
<i>Hprt</i>	NM_013556.2	Hprt	aggacctctgaagtgt	attcaaatccctgaagtactcat
<i>Gapdh</i>	NM_008084.2	Gapdh	ccggggctggcattgctctc	ggggtgggtgggtccaggggt

4.6 Immunohistochemistry

CA cryoconserved in embedding medium OCT compound were transversally cut at 10 μ m thick by Cryostat (Leica) at -25°C and placed on SuperFrostPlus slides (Thermo Fisher Scientific, USA). Artery slices were dried at room temperature. Immunofluorescence staining was performed using the anti-NCX1 mouse primary antibody (1:500, R3F1, Swant, Switzerland). The endothelium was identified with the anti-PECAM1 rabbit primary antibodies (anti-CD31 labeled with FITC, 1:50, eBioscience, USA). Nuclei were stained with DAPI 10 μ g/ml (Molecular probes, Invitrogen). All the primary antibodies and DAPI were incubated overnight at 4°C in dark room. Artery slices were washed, and then incubated with Alexa fluor 568 conjugated goat anti-mouse antibodies (1:200, Invitrogen) for 3 h, at 4°C in dark room. After washing, a drop of the aqueous mounting medium (Fluoromount, Sigma-Aldrich Merck, USA) was placed on artery slices, and a coverslip was then put on each slide. After drying for 1 h, fluorescent staining was revealed by a confocal microscope Nikon Eclipse TE2000-S. The imaging acquisition was performed with Metamorph software (Molecular Devices, California, USA). Negative control experiments excluding the primary antibody were carried out to validate the specificity of the immunofluorescence labelling.

4.7 Western blotting

MS1 EC were lysed in RIPA extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 12 mM Na Deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific)). After homogenization for 30 min at 4°C, the samples were centrifuged at 14,000 g at 8°C for 20 min. Protein quantity of the supernatant was determined using the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). 10 or 30 µg of proteins were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel) and then transferred to a nitrocellulose membrane. The non-specific binding sites were blocked with Tris-buffered saline solution containing 0.1% Tween and 5% BSA for 90 min. Next, the membranes were incubated with the rabbit anti-NCX1 (1:500, ANX-011, Alomone Labs) or the rabbit anti-Pan Nav (1:200, ASC-003, Alomone Labs) primary antibodies overnight at 4°C. The anti-β-actin (1:10,000, A3854, Sigma-Aldrich Merck) or the anti-HSC70 primary antibodies (1:10,000, SC-7298, Santa Cruz Biotechnology) were used as loading controls. After washing, the membranes were incubated with the anti-rabbit or -mouse secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1:5000, Thermo Fisher Scientific) for 90 min. Proteins were revealed using Pierce ECL Western Blotting Substrate kit (Thermo Fisher Scientific) by LAS-3000 imager (Fuji, Tokyo, Japan). The image acquisition was performed with Image Labs (Bio-Rad, California, USA).

4.8 Fluorescence assays

MS1 EC were plated at a density of 20,000 cells per wells (96 wells) in their adequate medium and assayed 24 hours after plating using a FlexStation® 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The cells were washed with Ca²⁺ buffer (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS), supplemented with 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES and 0.5% BSA with pH adjusted at 7.4. Next, MS1 EC were incubated for 1 h at room temperature in the freshly prepared Fura-2-AM buffer (5 µM Fura-2-AM and 0.02% Pluronic®-F127 acid dissolved in Ca²⁺ buffer). After washing, they were incubated in Ca²⁺ buffer during 45 min for a complete de-esterification of Fura-2-AM. To evaluate the variation of [Ca²⁺]_i, the plates were exposed at 340 nm and 380 nm excitation wavelengths. The fluorescence emission spectra were recorded at 510 nm for 180 s with 0.25 Hz of acquisition frequency. After 30 s baseline, Ach (0.1 nM-10 µM) was automatically injected to stimulate the cells. To evaluate the effects of NCX inhibition, KB-R7943 (10 µM), SN-6 (10 µM) or SEA0400 (10 µM) were co-injected with Ach. To investigate the effects of PKC inhibition was carried out by co-injection of Che (10 µM) with Ach. MS1 EC were also stimulated with Ach in Na⁺ free buffer (HBSS containing choline chloride instead of Na⁺ and supplemented with 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES and 0.5% BSA at pH 7.4) or in Ca²⁺ free buffer (HBSS supplemented with 2.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES and 0.5% BSA at pH 7.4). To empty endoplasmic reticulum Ca²⁺ storage, the cells were treated with the specific inhibitor of SERCA, thapsigargin (5 µM) before Ach-stimulation. Each condition was carried out in 3-5 wells. All experiments were repeated at least three times (n=3-4). Data acquisition was performed with SoftMax Pro 5.4.1 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.9 Statistical analysis

GraphPad Prism 7.02 (La Jolla, CA, USA) software was used for graph generation and statistical analyses. All data presented are mean ± SEM. The normality of data distribution was evaluated using Shapiro-Wilk test and significance tests between groups were performed using parametric or non-parametric tests when appropriate. To analyse the significance between two groups, t-test, Wilcoxon test or Mann-Whitney test were used when appropriate. For multiple comparisons, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test was used. Wire myography experiments were repeated with isolated arteries from at least 7 animals. Data from fluorescence assays are mean ± SEM, calculated from at least 3 independent experiments (n = 3-4). The kinetic traces of Fura-2 fluorescence were

plotted as an emission ratio (λ_{ex} 340 nm / λ_{ex} 380nm) and the integration of the fluorescence kinetics (AUC) was used for data analysis. Differences with $p < 0.05$ were considered significant (ns: not significant, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$, **** for $p < 0.0001$).

5. Conclusions

Our data demonstrate that the vasomotor responses mediated by VTD are due to the activation Nav channels expressed in perivascular nerves in mouse MA, which leads to neurotransmitters release. Indeed, we determined that VTD induced contraction response in FOMA, which is abolished by PZ, indicating NA release by sympathetic vasomotor innervation. In contrast, VTD induced vasorelaxant response in CA, which is suppressed by AP, revealing Ach release by parasympathetic vasomotor nerve endings. These data highlight that FOMA and CA exhibits distinct vasomotor regulation. In CA, Ach release exclusively causes eNOS stimulation in the endothelium, mediated by NCX1. Finally, we determine that NCX1 and PKC contribute to Ach-induced Ca^{2+} intracellular pathway of the eNOS activation in EC.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Veratridine induced transient effects on wall tension of middle colic artery. Figure S2: MS1 endothelial cells express muscarinic M3 receptor, eNOS, CD31 and Nav channels. Figure S3: Immunoblotting of protein extracts from cecocolic arteries and MS1 endothelial cells with anti-NCX1 antibodies.

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

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

Acknowledgments: We thank Vincent Paillé for helpful discussions during the work. We also thank Elodie Le Seac’h, William Ehanno, Anne-Laure Guihot, Agnès Barbelivien, and Louis Gourdin for their technical assistance during the work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

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

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

Ach	acetylcholine	631
AP	atropine	632
AUC	area under curve	633
CA	cecocolic artery	634
$[Ca^{2+}]_i$	intracellular Ca^{2+} concentration	635
EC	endothelial cell	636
FOMA	1 st order mesenteric artery	637
LNNA	N(ω)-nitro-L-arginine	638
MA	mesenteric artery	639
MS1	Mile Sven 1 murine	640
$[Na^+]_i$	intracellular Na^+ concentration	641
NA	noradrenaline	642
Nav channel	voltage-gated Na^+ channel	643
Phe	phenylephrine	644

PZ	prazosine	645
TTX	tetrodotoxin	646
TTX-R	resistant to tetrodotoxin	647
TTX-S	sensitive to tetrodotoxin	648
VSMC	vascular smooth muscle cell	649
VTD	veratridine	650

References

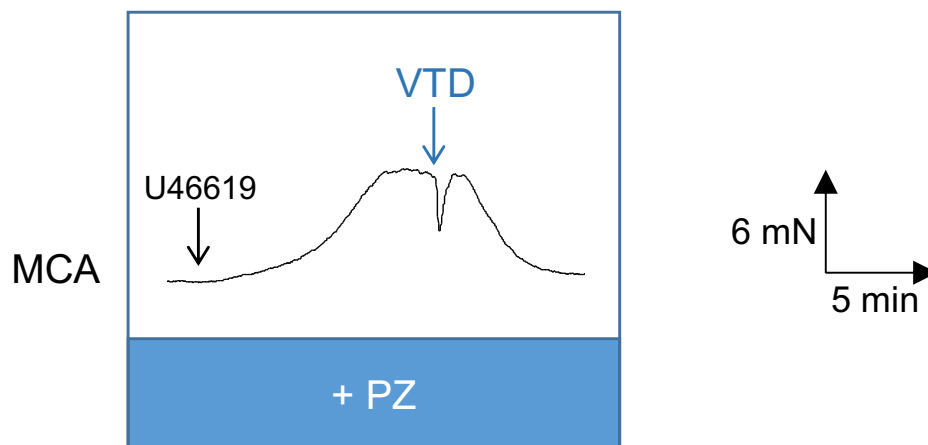
- Aalkjaer, C.; Nilsson, H.; De Mey, J. Sympathetic and Sensory-Motor Nerves in Peripheral Small Arteries. *Physiological Reviews* **2020**, physrev.00007.2020, doi:10.1152/physrev.00007.2020. 652
- Ando, J.; Yamamoto, K. Flow Detection and Calcium Signalling in Vascular Endothelial Cells. *Cardiovascular Research* **2013**, *99*, 260–268, doi:10.1093/cvr/cvt084. 653
- Ottolini, M.; Hong, K.; Sonkusare, S.K. Calcium Signals That Determine Vascular Resistance. *WIREs Systems Biology and Medicine* **2019**, *11*, e1448, doi:10.1002/wsbm.1448. 654
- Gerhold, K.A.; Schwartz, M.A. Ion Channels in Endothelial Responses to Fluid Shear Stress. *Physiology* **2016**, *31*, 359–369, doi:10.1152/physiol.00007.2016. 655
- Moccia, F.; Negri, S.; Shekha, M.; Faris, P.; Guerra, G. Endothelial Ca²⁺ Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis: Just What It Takes to Make a Blood Vessel. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 3962, doi:10.3390/ijms20163962. 656
- Watanabe, S.; Yashiro, Y.; Mizuno, R.; Ohhashi, T. Involvement of NO and EDHF in Flow-Induced Vasodilation in Isolated Hamster Cremasteric Arterioles. *JVR* **2005**, *42*, 137–147, doi:10.1159/000083652. 657
- Garland, C.J.; Dora, K.A. EDH: Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Microvascular Signalling. *Acta Physiol (Oxf)* **2017**, *219*, 152–161, doi:10.1111/apha.12649. 658
- Chawengsub, Y.; Gauthier, K.M.; Campbell, W.B. Role of Arachidonic Acid Lipoyxygenase Metabolites in the Regulation of Vascular Tone. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2009**, *297*, H495–H507, doi:10.1152/ajpheart.00349.2009. 659
- Balligand, J.-L.; Feron, O.; Dessy, C. ENOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. *Physiological Reviews* **2009**, *89*, 481–534, doi:10.1152/physrev.00042.2007. 660
- Tyckocki, N.R.; Boerman, E.M.; Jackson, W.F. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. In *Comprehensive Physiology*; Terjung, R., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 485–581 ISBN 978-0-470-65071-4. 661
- Moccia, F. Update on Vascular Endothelial Ca²⁺ Signalling: A Tale of Ion Channels, Pumps and Transporters. *WJBC* **2012**, *3*, 127, doi:10.4331/wjbc.v3.i7.127. 662
- Thakore, P.; Earley, S. Transient Receptor Potential Channels and Endothelial Cell Calcium Signaling. *Compr Physiol* **2019**, *9*, 1249–1277, doi:10.1002/cphy.c180034. 663
- Figueroa, X.F.; Chen, C.-C.; Campbell, K.P.; Damon, D.N.; Day, K.H.; Ramos, S.; Duling, B.R. Are Voltage-Dependent Ion Channels Involved in the Endothelial Cell Control of Vasomotor Tone? *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **2007**, *293*, H1371–H1383, doi:10.1152/ajpheart.01368.2006. 664
- Gilbert, G.; Courtois, A.; Dubois, M.; Cussac, L.-A.; Ducret, T.; Lory, P.; Marthan, R.; Savineau, J.-P.; Quignard, J.-F. T-Type Voltage Gated Calcium Channels Are Involved in Endothelium-Dependent Relaxation of Mice Pulmonary Artery. *Biochemical Pharmacology* **2017**, *138*, 61–72, doi:10.1016/j.bcp.2017.04.021. 665
- Blaustein, M.P.; Lederer, W.J. Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. *Physiological Reviews* **1999**, *79*, 763–854, doi:10.1152/physrev.1999.79.3.763. 666

16. Verkhatsky, A.; Trebak, M.; Perocchi, F.; Khananshvili, D.; Sekler, I. Crosslink between Calcium and Sodium Signalling. *Experimental Physiology* **2018**, *103*, 157–169, doi:10.1113/EP086534. 688
17. Khananshvili, D. Sodium-Calcium Exchangers (NCX): Molecular Hallmarks Underlying the Tissue-Specific and Systemic Functions. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **2014**, *466*, 43–60, doi:10.1007/s00424-013-1405-y. 690
18. Verkhatsky, A.; Trebak, M.; Perocchi, F.; Khananshvili, D.; Sekler, I. Crosslink between Calcium and Sodium Signalling. *Experimental Physiology* **2018**, *103*, 157–169, doi:10.1113/EP086534. 692
19. Shattock, M.J.; Ottolia, M.; Bers, D.M.; Blaustein, M.P.; Boguslavskyi, A.; Bossuyt, J.; Bridge, J.H.B.; Chen-Izu, Y.; Clancy, C.E.; Edwards, A.; et al. Na⁺/Ca²⁺ Exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the Heart. *The Journal of Physiology* **2015**, *593*, 1361–1382, doi:10.1113/jphysiol.2014.282319. 694
20. Wang, Y.; Chen, L.; Li, M.; Cha, H.; Iwamoto, T.; Zhang, J. Conditional Knockout of Smooth Muscle Sodium Calcium Exchanger Type-1 Lowers Blood Pressure and Attenuates Angiotensin II-Salt Hypertension. *Physiol Rep* **2015**, *3*, e12273, doi:10.14814/phy2.12273. 696
21. Lytton, J. Na⁺/Ca²⁺ Exchangers: Three Mammalian Gene Families Control Ca²⁺ Transport. *Biochemical Journal* **2007**, *406*, 365–382, doi:10.1042/BJ20070619. 700
22. Hansen, B.A.; Battle, D.C.; O'Donnell, M.E. Sodium-Calcium Exchange in Bovine Aortic Endothelial Cells. *Ann NY Acad Sci* **1991**, *639*, 566–569, doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb17352.x. 702
23. Goto, Y.; Miura, M.; Iijima, T. Extrusion Mechanisms of Intracellular Ca²⁺ in Human Aortic Endothelial Cells. *European Journal of Pharmacology* **1996**, *314*, 185–192, doi:10.1016/S0014-2999(96)00532-8. 704
24. Teubl, M.; Groschner, K.; Kohlwein, S.D.; Mayer, B.; Schmidt, K. Na⁺/Ca²⁺ Exchange Facilitates Ca²⁺-Dependent Activation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 29529–29535, doi:10.1074/jbc.274.41.29529. 706
25. Moccia, F.; Berra-Romani, R.; Baruffi, S.; Spaggiari, S.; Signorelli, S.; Castelli, L.; Magistretti, J.; Taglietti, V.; Tanzi, F. Ca²⁺ Uptake by the Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Rat Microvascular Endothelial Cells. *Biochemical Journal* **2002**, *364*, 235–244, doi:10.1042/bj3640235. 708
26. Girardin, N.C.; Antigny, F.; Frieden, M. Electrophysiological Characterization of Store-Operated and Agonist-Induced Ca²⁺ Entry Pathways in Endothelial Cells. *Pflugers Arch* **2010**, *460*, 109–120, doi:10.1007/s00424-010-0825-1. 712
27. Schneider, J.-C.; El Kebir, D.; Chéreau, C.; Mercier, J.-C.; Dall'Ava-Santucci, J.; Dinh-Xuan, A.T. Involvement of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in Endothelial NO Production and Endothelium-Dependent Relaxation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2002**, *283*, H837–H844, doi:10.1152/ajpheart.00789.2001. 714
28. Kim, M.Y.; Seol, G.H.; Liang, G.H.; Kim, J.A.; Suh, S.H. Na⁺ -K⁺ Pump Activation Inhibits Endothelium-Dependent Relaxation by Activating the Forward Mode of Na⁺ /Ca²⁺ Exchanger in Mouse Aorta. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2005**, *289*, H2020–H2029, doi:10.1152/ajpheart.00908.2004. 716
29. Lillo, M.A.; Gaete, P.S.; Puebla, M.; Ardiles, N.M.; Poblete, I.; Becerra, A.; Simon, F.; Figueroa, X.F. Critical Contribution of Na⁺ -Ca²⁺ Exchanger to the Ca²⁺ -Mediated Vasodilation Activated in Endothelial Cells of Resistance Arteries. *The FASEB Journal* **2018**, *32*, 2137–2147, doi:10.1096/fj.201700365RR. 718
30. Andrikopoulos, P.; Fraser, S.P.; Patterson, L.; Ahmad, Z.; Burcu, H.; Ottaviani, D.; Diss, J.K.J.; Box, C.; Eccles, S.A.; Djamgoz, M.B.A. Angiogenic Functions of Voltage-Gated Na⁺ Channels in Human Endothelial Cells MODULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) SIGNALING. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 16846–16860, doi:10.1074/jbc.M110.187559. 720
31. Kratholm, N.M.; Jensen, P.S.; Kringelhardt, S.; Simonsen, U.; Bek, T. Activation of Veratridine Sensitive Sodium Channels, But Not Electrical Field Stimulation, Dilates Porcine Retinal Arterioles with Preserved Perivascular Tissue. *Current Eye Research* **2017**, *42*, 1497. 722

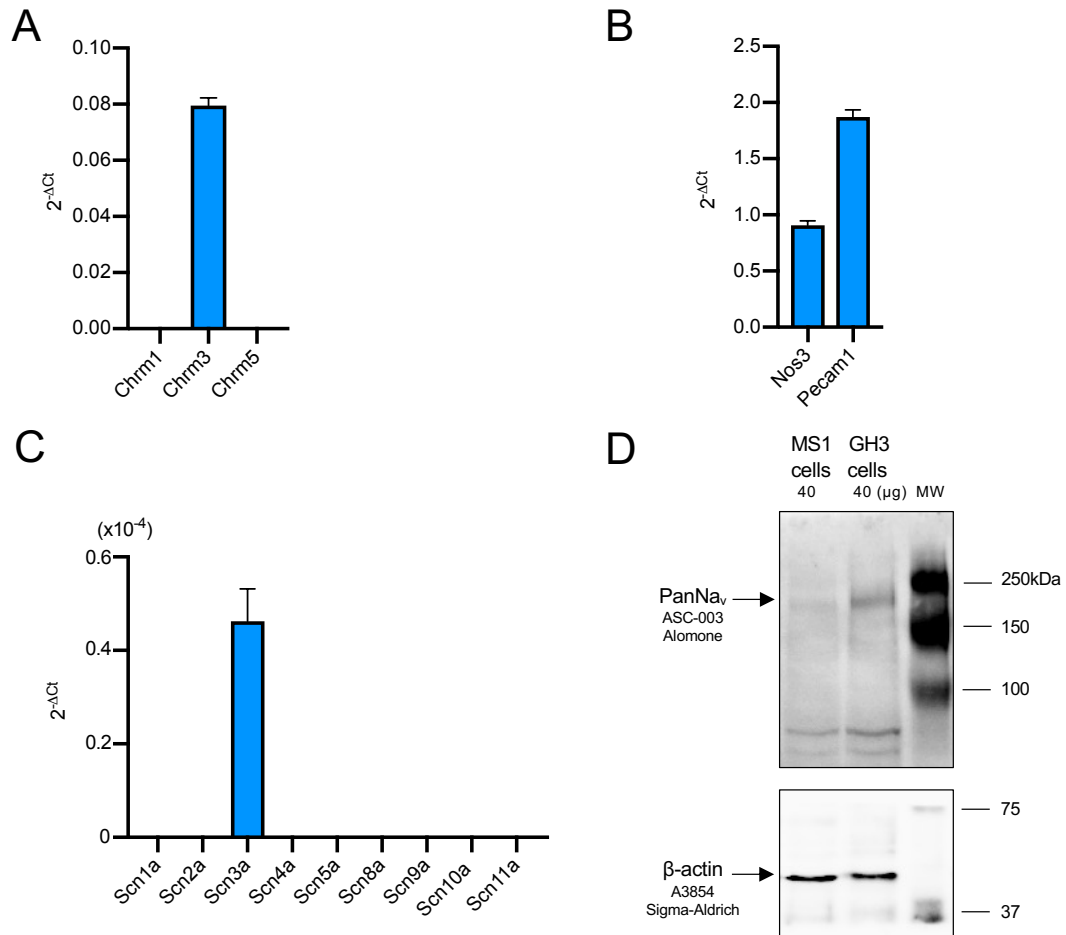
32. Ho, W.-S.V.; Davis, A.J.; Chadha, P.S.; Greenwood, I.A. Effective Contractile Response to Voltage-Gated Na⁺ Channels Revealed by a Channel Activator. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2013**, *304*, C739–C747, doi:10.1152/ajpcell.00164.2012. 730
33. Iwamoto, T.; Kita, S.; Uehara, A.; Imanaga, I.; Matsuda, T.; Baba, A.; Katsuragi, T. Molecular Determinants of Na⁺/Ca²⁺ Exchange (NCX1) Inhibition by SEA0400*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 7544–7553, doi:10.1074/jbc.M310491200. 731
34. Lytton, J. Na⁺/Ca²⁺ Exchangers: Three Mammalian Gene Families Control Ca²⁺ Transport. *Biochemical Journal* **2007**, *406*, 365–382, doi:10.1042/BJ20070619. 732
35. Annunziato, L.; Pignataro, G.; Di Renzo, G.F. Pharmacology of Brain Na⁺ /Ca²⁺ Exchanger: From Molecular Biology to Therapeutic Perspectives. *Pharmacol Rev* **2004**, *56*, 633–654, doi:10.1124/pr.56.4.5. 733
36. Ringvold, H.C.; Khalil, R.A. Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. In *Advances in Pharmacology*; Elsevier, 2017; Vol. 78, pp. 203–301 ISBN 978-0-12-811485-8. 734
37. Fort, A.; Cordaillat, M.; Thollon, C.; Salazar, G.; Mechaly, I.; Villeneuve, N.; Vilaine, J.-P.; Richard, S.; Virsolvy, A. New Insights in the Contribution of Voltage-Gated Nav Channels to Rat Aorta Contraction. *PLOS ONE* **2009**, *4*, e7360, doi:10.1371/journal.pone.0007360. 735
38. Virsolvy, A.; Fort, A.; Erceau, L.; Charrabi, A.; Hayot, M.; Aimond, F.; Richard, S. Hypoxic Conditions Promote Rhythmic Contractile Oscillations Mediated by Voltage-Gated Sodium Channels Activation in Human Arteries. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 2570, doi:10.3390/ijms22052570. 736
39. Shinjoh, M.; Nakaki, T.; Otsuka, Y.; Sasakawa, N.; Kato, R. Vascular Smooth Muscle Contraction Induced by Na⁺ Channel Activators, Veratridine and Batrachotoxin. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *205*, 199–202. 737
40. Yokomizo, A.; Takatori, S.; Hashikawa-Hobara, N.; Goda, M.; Kawasaki, H. Characterization of Perivascular Nerve Distribution in Rat Mesenteric Small Arteries. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2015**, *38*, 1757–1764, doi:10.1248/bpb.b15-00461. 738
41. Kawasaki, H.; Takatori, S.; Zamami, Y.; Koyama, T.; Goda, M.; Hirai, K.; Tangsucharit, P.; Jin, X.; Hobara, N.; Kitamura, Y. Paracrine Control of Mesenteric Perivascular Axo-Axonal Interaction. *Acta Physiologica* **2011**, *203*, 3–11, doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02197.x. 739
42. Tangsucharit, P.; Takatori, S.; Sun, P.; Zamami, Y.; Goda, M.; Pakdeechote, P.; Takayama, F.; Kawasaki, H. Do Cholinergic Nerves Innervating Rat Mesenteric Arteries Regulate Vascular Tone? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2012**, *303*, R1147–R1156, doi:10.1152/ajpregu.00317.2012. 740
43. Fujiwara, H.; Hashikawa-Hobara, N.; Wake, Y.; Takatori, S.; Goda, M.; Higuchi, H.; Zamami, Y.; Tangsucharit, P.; Kawasaki, H. Neurogenic Vascular Responses in Male Mouse Mesenteric Vascular Beds. *J Pharmacol Sci* **2012**, *119*, 260–270, doi:10.1254/jphs.12014FP. 741
44. Dudzinski, D.; Michel, T. Life History of ENOS: Partners and Pathways. *Cardiovascular Research* **2007**, *75*, 247–260, doi:10.1016/j.cardiores.2007.03.023. 742
45. Saternos, H.C.; Almarghalani, D.A.; Gibson, H.M.; Meqdad, M.A.; Antypas, R.B.; Lingireddy, A.; AbouAlaiwi, W.A. Distribution and Function of the Muscarinic Receptor Subtypes in the Cardiovascular System. *Physiological Genomics* **2018**, *50*, 1–9, doi:10.1152/physiolgenomics.00062.2017. 743
46. Bondarenko, A. Sodium-Calcium Exchanger Contributes to Membrane Hyperpolarization of Intact Endothelial Cells from Rat Aorta during Acetylcholine Stimulation: Sodium-Calcium Exchanger in Endothelial Cells. *British Journal of Pharmacology* **2004**, *143*, 9–18, doi:10.1038/sj.bjp.0705866. 744
47. Andrikopoulos, P.; Baba, A.; Matsuda, T.; Djamgoz, M.B.A.; Yaqoob, M.M.; Eccles, S.A. Ca²⁺ Influx through Reverse Mode Na⁺/Ca²⁺ Exchange Is Critical for Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Extracellular Signal- 745

- Regulated Kinase (ERK) 1/2 Activation and Angiogenic Functions of Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 37919–37931, doi:10.1074/jbc.M111.251777. 772
48. Andrikopoulos, P.; Kieswich, J.; Harwood, S.M.; Baba, A.; Matsuda, T.; Barbeau, O.; Jones, K.; Eccles, S.A.; Yaqoob, M.M. Endothelial Angiogenesis and Barrier Function in Response to Thrombin Require Ca²⁺ Influx through the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 18412–18428, doi:10.1074/jbc.M114.628156. 774
49. Dömötör, E.; Abbott, N.J.; Adam-Vizi, V. Na⁺–Ca²⁺ Exchange and Its Implications for Calcium Homeostasis in Primary Cultured Rat Brain Microvascular Endothelial Cells. *The Journal of Physiology* **1999**, *515*, 147–155, doi:10.1111/j.1469-7793.1999.147ad.x. 776
50. Steinberg, S.F. Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiol Rev* **2008**, *88*, 1341–1378, doi:10.1152/physrev.00034.2007. 780
51. Andrikopoulos, P.; Eccles, S.A.; Yaqoob, M.M. Coupling between the TRPC3 Ion Channel and the NCX1 Transporter Contributed to VEGF-Induced ERK1/2 Activation and Angiogenesis in Human Primary Endothelial Cells. *Cellular Signalling* **2017**, *37*, 12–30, doi:10.1016/j.cellsig.2017.05.013. 782
52. Lange, A.; Gebremedhin, D.; Narayanan, J.; Harder, D. 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid-Induced Vasoconstriction and Inhibition of Potassium Current in Cerebral Vascular Smooth Muscle Is Dependent on Activation of Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 27345–27352, doi:10.1074/jbc.272.43.27345. 784
53. Ahmmed, G.U.; Mehta, D.; Vogel, S.; Holinstat, M.; Paria, B.C.; Tirupathi, C.; Malik, A.B. Protein Kinase Cα Phosphorylates the TRPC1 Channel and Regulates Store-Operated Ca²⁺ Entry in Endothelial Cells*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 20941–20949, doi:10.1074/jbc.M313975200. 786
54. Pavlovic, D.; Fuller, W.; Shattock, M.J. Novel Regulation of Cardiac Na Pump via Phospholemman. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2013**, *61*, 83–93, doi:10.1016/j.yjmcc.2013.05.002. 788
55. Limas, C.J. Phosphorylation of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum by a Calcium-Activated, Phospholipid-Dependent Protein Kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **1980**, *96*, 1378–1383, doi:10.1016/0006-291x(80)90103-5. 790
56. Brini, M.; Cali, T.; Ottolini, D.; Carafoli, E. Calcium Pumps: Why so Many? *Compr Physiol* **2012**, *2*, 1045–1060, doi:10.1002/cphy.c110034. 792
57. Partovian, C.; Zhuang, Z.; Moodie, K.; Lin, M.; Ouchi, N.; Sessa, W.C.; Walsh, K.; Simons, M. PKCα Activates ENOS and Increases Arterial Blood Flow in Vivo. *Circ Res* **2005**, *97*, 482–487, doi:10.1161/01.RES.0000179775.04114.45. 794
58. Blanco-Rivero, J.; Sagredo, A.; Balfagón, G.; Ferrer, M. Protein Kinase C Activation Increases Endothelial Nitric Oxide Release in Mesenteric Arteries from Orchidectomized Rats. *J Endocrinol* **2007**, *192*, 189–197, doi:10.1677/joe.1.07079. 796
59. Michell, B.J.; Chen Zp, null; Tiganis, T.; Stapleton, D.; Katsis, F.; Power, D.A.; Sim, A.T.; Kemp, B.E. Coordinated Control of Endothelial Nitric-Oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the CAMP-Dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 17625–17628, doi:10.1074/jbc.C100122200. 800
60. Jiang, X.; Yang, F.; Tan, H.; Liao, D.; Bryan, R.M.; Randhawa, J.K.; Rumbaut, R.E.; Durante, W.; Schafer, A.I.; Yang, X.; et al. Hyperhomocystinemia Impairs Endothelial Function and ENOS Activity via PKC Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**, *25*, 2515–2521, doi:10.1161/01.ATV.0000189559.87328.e4. 802
61. Blaustein, M.P.; Hamlyn, J.M. Ouabain, Endogenous Ouabain and Ouabain-like Factors: The Na⁺ Pump/Ouabain Receptor, Its Linkage to NCX, and Its Myriad Functions. *Cell Calcium* **2020**, *86*, 102159, doi:10.1016/j.ceca.2020.102159. 804
62. Wang, X.; Reznick, S.; Li, P.; Liang, W.; van Breemen, C. Ca²⁺ Removal Mechanisms in Freshly Isolated Rabbit Aortic Endothelial Cells. *Cell Calcium* **2002**, *31*, 265–277, doi:10.1016/S0143-4160(02)00075-1. 806
63. Mulvany, M.J.; Halpern, W. Contractile Properties of Small Arterial Resistance Vessels in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. *Circ Res* **1977**, *41*, 19–26, doi:10.1161/01.RES.41.1.19. 808

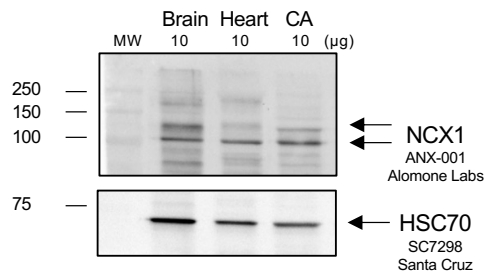
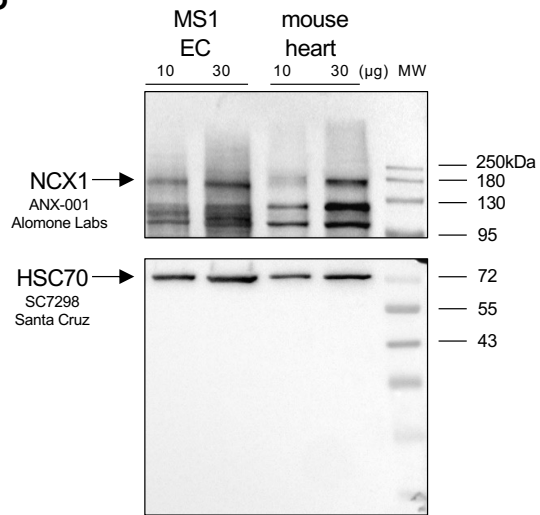
-
64. Vessieres, E.; Guihot, A.-L.; Grimaud, L.; Rivron, J.; Arnal, J.-F.; Loufrani, L.; Henrion, D. Estrogens and the Angiotensin II Type 2 Receptor Control Flow-Mediated Outward Remodeling in the Female Mouse Mesenteric Artery. *J Vasc Res* **2021**, *58*, 16–26, doi:10.1159/000511799. 813
814
815
65. Morrison, T.B.; Weis, J.J.; Wittwer, C.T. Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR Green I Monitoring during Amplification. *Biotechniques* **1998**, *24*, 954–958, 960, 962. 816
817
66. Lee, C.; Kim, J.; Shin, S.G.; Hwang, S. Absolute and Relative QPCR Quantification of Plasmid Copy Number in Escherichia Coli. *J Biotechnol* **2006**, *123*, 273–280, doi:10.1016/j.jbiotec.2005.11.014. 818
819
820



Supplementary Figure S1. Veratridine induced transient vasorelaxant reponse in middle colic artery. This example of myograph traces was obtained with isolated middle colic artery (MCA). In the presence of prazosin (PZ, 1 μ M), the artery was contracted by U46619 (10 μ M). After the plateau, veratridine (VTD, 30 μ M) was applied in the bath. The arrows indicate the application of U46619 and VTD. This vasorelaxant response mediated by VTD was observed in four MCA from four C57 Bl6/J male mice.



Supplementary Figure S2. MS1 endothelial cells express muscarinic M3 receptor, eNOS, Pecam1 and Nav channels. Relative RT-qPCR was used to characterize the gene expression profile of muscarinic receptors coupled to Gq proteins (*Chrm1*, *Chrm3* and *Chrm5*) (A), EC markers such as *Nos3* (eNOS) and *Pecam1* (B) and Nav channels (C). The RT-qPCR experiments were carried out with 10 ng of total RNA extracted from MS1 EC. The expression levels of muscarinic receptors were normalized by those of *Hprt* gene. The expression levels of the other genes were normalized by those of *Gusb*, *Hprt* and *Gapdh*. n=4. (D) Nav channels were detected in MS1 cells at protein level by western blotting (anti-PanNav antibodies, ASC-003, Alomone Labs). β-actin was used as a loading control and GH3 cells as a positive control sample. The experiments were carried out with 40 μg of protein. EC: endothelial cells; eNOS: endothelial NO synthase; MS1: *Mile Sven 1*; Nav channels: voltage-gated Na⁺ channels.

A**B**

Supplementary Figure S3. Immunoblotting of protein extracts from cecocolic arteries and MS1 endothelial cells with anti-NCX1 antibodies. (A) NCX1 were detected in CA at protein level by western blotting with an anti-NCX1 antibodies (ANX-001, Alomon Labs). Mouse brain and heart were used as a positive control sample. The experiments were carried out with 10 µg of protein. Three CA from three mice were used for protein extraction. (B) The same antibodies allowed the immunodetection of NCX1 in MS1 EC. Protein extracts (10 and 30 µg) of MS1 cells and mouse heart were used for comparison. The bands corresponding to NCX1 were indicated by and arrow. HSC70 was used as a loading control. CA: cecocolic arteries; NCX: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger; MS1 EC: *Mile Sven 1* endothelial cells

2.2. Résultats supplémentaires

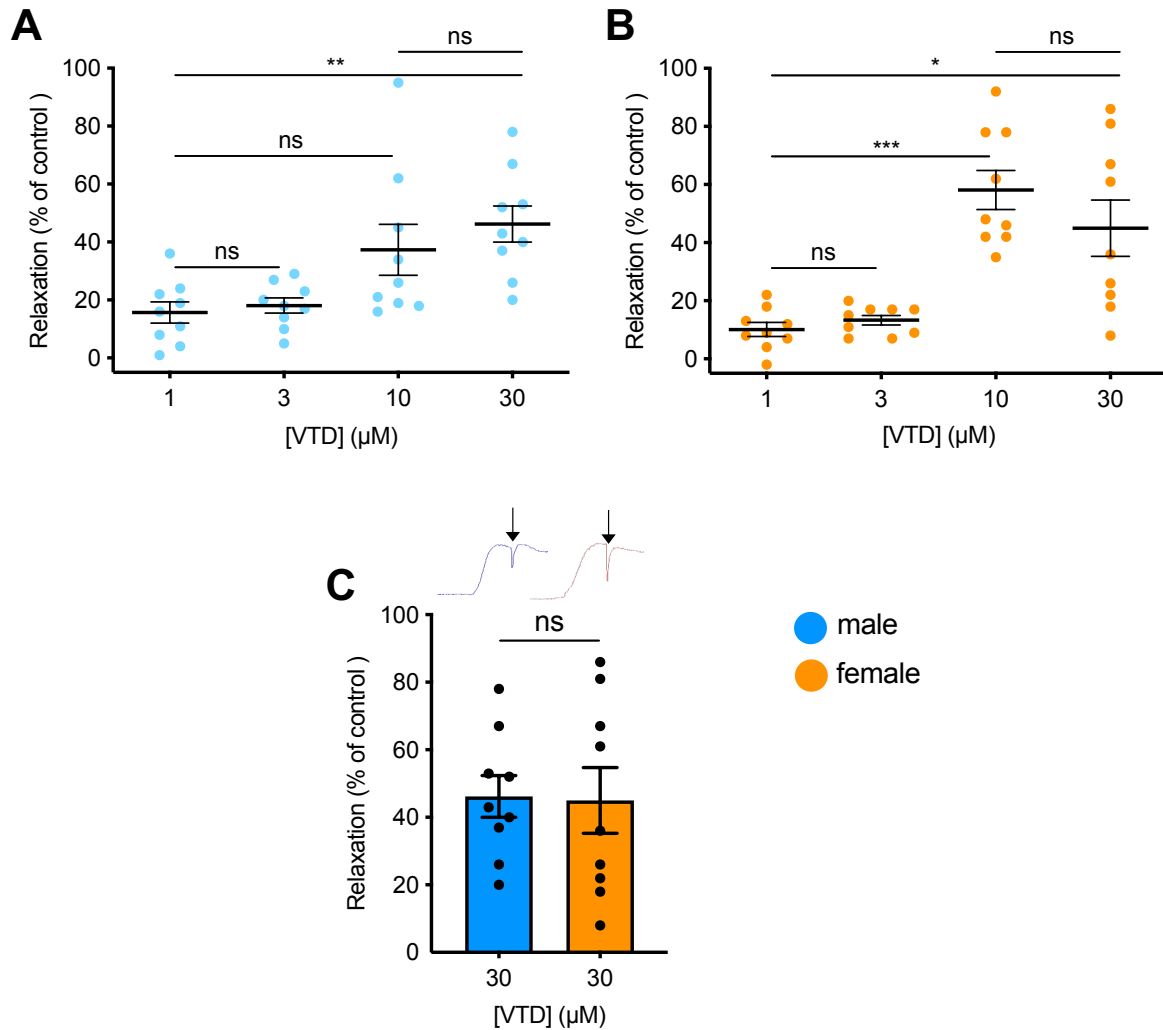


Figure 24 : Effets vasorelaxants de la VTD sur les artères cécoliques

Les nuages de points illustrent les effets vasorelaxants induits par la vératridine (VTD, activateur des canaux Na_v) à différentes concentrations (1, 3, 10 et 30 μM) chez les souris (A) mâles et (B) femelles. (C) Les histogrammes représentent la comparaison des réponses à la VTD (30 μM) entre les mâles et les femelles. Au-dessus des histogrammes, les exemples de tracé de myographie sont illustrés avec les flèches indiquant l'application de la VTD. Les réponses induites par la VTD sont normalisées par rapport au niveau de contraction par l'U46619. Les expériences ont été réalisées en présence de PZ à 1 μM (antagoniste des α_1 -adrénocepteurs) par la technique de myographie. Les artères cécoliques proviennent de souris âgées de 5 mois ($n=9$). Test de multiple comparaison de Kruskal-Wallis (A et B), Test de Mann Whitney (C), ns non-significatif, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Les données sont les moyennes \pm SEM.

Dans cette étude, nous avons démontré qu'une concentration de 30 μM de VTD induisait une vasorelaxation des CA en présence de PZ par la technique de myographie. Ces effets vasorelaxants ont été évalués à différentes concentrations de VTD : 1, 3, 10 et 30 μM (Figure 23). La VTD entraîne une relaxation inférieure à 20% à 1 et 3 μM chez les mâles ($15,7 \pm 3,7\%$ et $18,1 \pm 2,6\%$, respectivement). À 10 μM , les effets vasorelaxants semblent

augmenter ($37,3 \pm 8,8\%$), cependant ils ne sont pas significativement différents de ceux observés à $1 \mu\text{M}$ ($p=0,18$). La VTD induit des effets vasorelaxants 2,9 fois plus importants à $30 \mu\text{M}$ qu'à $1 \mu\text{M}$ ($p<0,01$) (Figure 23.A). Comme observé chez les mâles, la VTD entraîne de faibles effets vasorelaxants à 1 et $3 \mu\text{M}$ chez les femelles ($10,1 \pm 2,4\%$ et $13,3 \pm 4,9\%$, respectivement). À $10 \mu\text{M}$, la VTD engendre $58,1 \pm 6,7\%$ de relaxation, ce qui est significativement plus important qu'à $1 \mu\text{M}$ ($p<0,001$). À $30 \mu\text{M}$, les effets de la VTD restent significativement différents de ceux à $1 \mu\text{M}$ ($p<0,5$) (Figure 23.B). Chez les mâles et les femelles, chaque concentration de VTD a entraîné une variation de la contractilité des CA significativement différente de son contrôle correspondant au niveau de la contraction avant l'application de la VTD (P value comprise entre 0,01 et 0,0001) (figure non illustrée). Dans l'ensemble, nous pouvons constater que les effets vasorelaxants de la VTD au niveau des CA sont nettement observés à $30 \mu\text{M}$ chez les mâles et les femelles. Ces résultats des effets de la VTD à différentes concentrations n'ont pas pu être analysés par l'équation de Langmuir au vue de la valeur de R^2 trop faible (0,36 pour les mâles, 0,38 pour les femelles). Cependant les valeurs de CE_{50} proposées sont très proches de $30 \mu\text{M}$ où les effets de la VTD étaient clairs. Par ailleurs, la réponse vasorelaxante de la VTD est comparable entre mâles et femelles ($p=0,92$) (Figure 23.C). Ainsi, toutes nos expériences étudiant les effets de la VTD ont été réalisées avec la concentration de $30 \mu\text{M}$. Par la suite, l'ensemble des résultats de l'article n°2 nous a permis de conclure qu'au niveau des CA, la VTD activerait les canaux Na_v des TN périvasculaires parasympathiques, entraînant la libération d'un NT vasorelaxant, l'Ach. Ce dernier agirait sur les CE induisant la production de NO par l'intermédiaire des NCX.

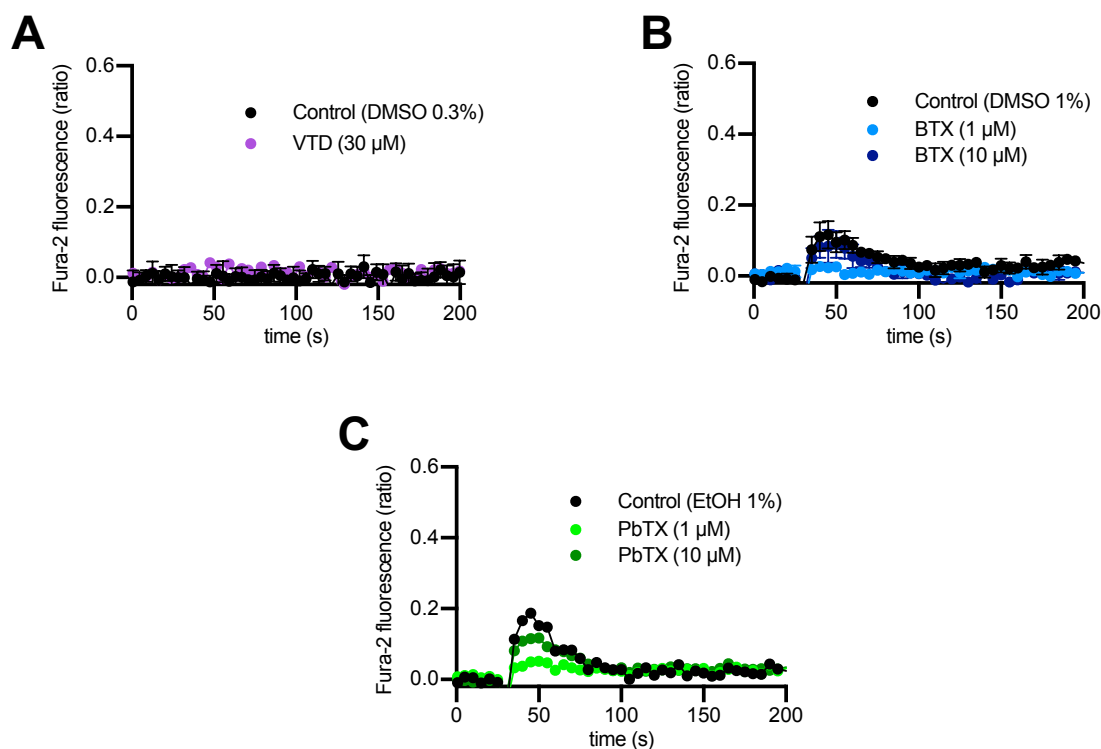


Figure 25 : L'activation des canaux Na_v n'induit pas de réponse Ca^{2+} dans les cellules MS1

La variation de la concentration Ca^{2+} intracellulaire a été mesurée grâce à une sonde Ca^{2+} fluorescente, Fura-2. Les graphiques illustrent l'émission de fluorescence du Fura-2 au cours du temps. La lignée de CE Mile Sven 1 a été stimulée par les activateurs des canaux Na_v : (A) la vératridine (VTD), (B) la batrachotoïne (BTX) et (C) la

brévétotoxine (PbTX), à 30 s de lecture. Les courbes noires représentent les effets du tampon véhicule (control). L'expérience a été réalisée en triplicata et les données représentées sont les moyennes \pm SEM. DMSO : diméthylsulfoxyde.

Afin de mieux comprendre le mécanisme cellulaire des effets vasorelaxants de la VTD, nous avons travaillé sur la lignée cellulaire endothéliale MS1. Nous avons utilisé la sonde Ca^{2+} fluorescente, Fura-2. Dans l'article n°2, il a été mentionné que la VTD n'induit aucune modification de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En effet, dans la Figure 24.A nous n'observons pas de signal Ca^{2+} à l'injection de la VTD à 30 s de lecture (Figure 24.A). Afin de confirmer cette absence d'effet, deux autres activateurs des canaux Na_v ont été testés : la BTX et la PbTX (Figure 24.B et C). Nous constatons une légère augmentation du signal Ca^{2+} à l'injection des molécules à 30 s. Cependant, puisque les courbes sont confondues ou inférieures à celle du solvant (DMSO pour BTX, éthanol pour PbTX), cette augmentation semble liée aux effets du solvant (Figure 24). Aucune modification de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ n'est donc observée lors de l'application de la VTD, la BTX et de la PbTX sur les cellules. En conclusion, l'absence d'effet des activateurs des canaux Na_v sur la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ renforce notre idée suggérant que la VTD stimule les canaux Na_v des TN périsvasculaires pour induire une vasorelaxation des CA.

Conclusion et Perspectives

Au sein de ce travail, nous avons cherché à caractériser le rôle des canaux Na_v dans la régulation de la vasomotricité des artères de résistance. En utilisant les MA de souris comme modèle biologique, nous avons pu mettre en évidence les points suivants :

1. Les canaux Na_v sont exprimés dans l'intima et la média des artères.

L'expression des canaux Na_v a été confirmée à la fois dans l'intima et la média de l'aorte et des MA par la technique d'immunomarquage. Parmi les 9 isoformes, nous avons caractérisé le transcrite *Scn2a* codant $\text{Na}_v1.2$ comme une forme majeure dans les artères de souris (l'aorte, les FOMA, les CA et les artères fémorales). Afin de définir les sous-types des canaux Na_v dans les différentes tuniques artérielles, nous avons réalisé l'isolement des CE et des CMLV à partir des MA. Étonnamment, *Scn3a* ($\text{Na}_v1.3$) est devenu majoritaire dans les CE et les CMLV isolées. Ce profil a également été retrouvé dans la lignée de CE (MS1). Cette différence pourrait venir du processus d'isolement et de la mise en culture des cellules pouvant impacter l'expression des canaux Na_v . De ce fait, la caractérisation des isoformes des CE et des CMLV devrait être réalisée sur les cellules fraîchement isolées, ou encore directement sur les artères. La technique de « Single-cell RNA sequencing » pourrait nous permettre de travailler sur le cytosol d'une cellule unique.

2. Les canaux Na_v interviennent dans la régulation du tonus vasculaire des MA.

Après avoir caractérisé l'expression des canaux Na_v dans les MA (FOMA et CA), nous avons pu mettre en évidence que deux types de population des canaux Na_v sont impliqués dans la régulation de la vasomotricité des MA. Dans un premier temps, la réponse contractile de la VTD sur les FOMA a été supprimée à l'application de PZ et les effets vasorelaxants de la VTD sur les CA ont été abolis par l'AP. Ces résultats nous indiquent que les effets de la VTD sont dus à l'activation des canaux Na_v des TN (canaux Na_v neuronaux) libérant des NT vasoactifs (la noradrénaline ou l'Ach), et non aux canaux Na_v des CE et/ou des CMLV (canaux Na_v vasculaires). Par ailleurs, les FOMA et les CA ne présentent pas la même régulation nerveuse. Les FOMA auraient une influence plutôt orthosympathique provoquant une vasoconstriction par la libération de noradrénaline. En revanche, les CA présentent une régulation parasympathique sous l'influence de l'Ach responsable de la vasorelaxation. Dans les CE, l'absence des effets des agonistes des canaux Na_v sur la variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ renforce en partie l'idée de l'influence des canaux Na_v neuronaux dans la régulation de la vasomotricité.

Ensuite, les canaux Na_v vasculaires participent également au contrôle du tonus vasculaire. La TTX a entraîné une relaxation des CA précontractées à l'U46619, après avoir activé les canaux Na_v par la VTD. De plus, les FOMA et les CA ont développé une meilleure dilatation au flux en présence de la TTX. Ces résultats montrent que l'inhibition des canaux Na_v favorise la relaxation. Nous pouvons donc suggérer que les canaux Na_v des CMLV participeraient au maintien du tonus vasculaire, qui serait perdu par l'inhibition des canaux Na_v . Cependant, ce travail reste préliminaire. Afin de compléter la caractérisation des canaux Na_v vasculaires dans la régulation vasomotrice, il serait nécessaire d'évaluer les effets de l'inhibition des canaux Na_v sur le développement du TM. Nous pourrions également envisager d'étudier les effets de l'activation des canaux Na_v sur la DFD et le TM. Dans ce contexte, il est impératif de se séparer des effets des canaux Na_v neuronaux. L'utilisation des inhibiteurs des NT libérés ou un prétraitement de dénervation ou de désensibilisation pourraient être considérés.

3. L'activation des canaux Na_v induit la libération d'Ach stimulant la voie du NO par l'intermédiaire des NCX1 régulant le $[Ca^{2+}]_i$.

Nous avons déterminé que la VTD peut activer les canaux Na_v neuronaux TTX-S stimulant la libération d'Ach et entraîner la vasorelaxation des CA. L'inhibition totale des effets vasorelaxants par L-NNA nous indique l'implication essentielle de la voie du NO. De plus, nous avons montré que les inhibiteurs des NCX ont réduit les effets vasorelaxants de la VTD et qu'ils ont atténué l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des CE induite par l'Ach. Nous avons donc pu mettre en évidence que NCX1 endothélial intervient dans ces effets vasorelaxants en modulant la $[Ca^{2+}]_i$ des CE. Ainsi, NCX1 endothélial serait sollicité dans l'activation de la voie du NO. Afin de démontrer un lien direct entre le NCX1 et la voie du NO, il serait nécessaire d'évaluer les effets de l'inhibition de NCX1 sur la production du NO par une mesure directe de la quantité du NO. Les résultats montrant l'implication de NCX1 dans la signalisation Ca^{2+} nous ont permis d'établir un lien entre l'homéostasie Na^+ et Ca^{2+} et de comprendre l'importance de Na^+ dans la régulation de la $[Ca^{2+}]_i$ qui contrôle le tonus vasculaire. Par ailleurs, d'autres transporteurs ioniques perméables aux ions Na^+ tels que les canaux TRP et Piezo1 pourraient être impliqués dans les effets vasorelaxants induits par la VTD. Nous avons remarqué que les effets des inhibiteurs des NCX ont été partiels. Par l'utilisation des inhibiteurs spécifiques, nous pourrions évaluer la participation des autres canaux ioniques dans ces effets vasorelaxants.

4. Les canaux Na_v sont remodelés dans les conditions physiopathologiques (l'HTA et le vieillissement)

Le niveau d'expression génétique des canaux Na_v varie dans les conditions d'HTA ou de vieillissement. La variation a surtout été observée dans l'aorte. Chez les souris hypertendues à l'AngII, le niveau d'expression de *Scn2a* a diminué significativement par rapport aux contrôles. Cette baisse a également été observée dans l'aorte provenant de souris âgées. En revanche, l'expression de *Scn2a* des MA est inchangée. Les résultats obtenus concernent seulement l'expression au niveau génétique. Elle nécessite donc d'être évaluée au niveau protéique. Par ailleurs, le rôle des canaux Na_v vasculaires dans le maintien du tonus vasculaire étant démontré, il serait intéressant d'étudier leur implication fonctionnelle dans la régulation vasomotrice dans un contexte pathologique vasculaire (l'HTA et le vieillissement).

En outre, nos résultats et les données de la littérature ont défini $Na_v1.2$ comme le sous-type majeur des artères chez les rongeurs. Cette isoforme se retrouve principalement dans le système nerveux central et sa dysfonction peut entraîner une épilepsie. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication des canaux Na_v dans la régulation vasomotrice dans des modèles rongeurs d'épilepsie. Chez l'Homme, $Na_v1.7$ semble être l'isoforme prévalente des CMLV. Nous pourrions également évaluer les effets des canaux Na_v dans la vasomotricité chez les patients présentant une mutation de $Na_v1.7$.

Enfin, à travers ces études, nous avons pu caractériser l'expression des canaux Na_v dans l'intima et la média des MA avec l'isoforme majeure $Na_v1.2$ et mettre en évidence l'implication des canaux Na_v vasculaires dans la régulation de la vasomotricité des artères de résistance en maintenant un certain tonus vasculaire. Les canaux Na_v se trouvant également dans les TN des artères, l'activation de ces canaux Na_v neuronaux entraîne la libération de l'Ach activant la voie du NO tout en sollicitant le NCX1 endothélial. Nos résultats ont également permis de supposer le rôle putatif des canaux Na_v vasculaires dans les pathologies vasculaires.

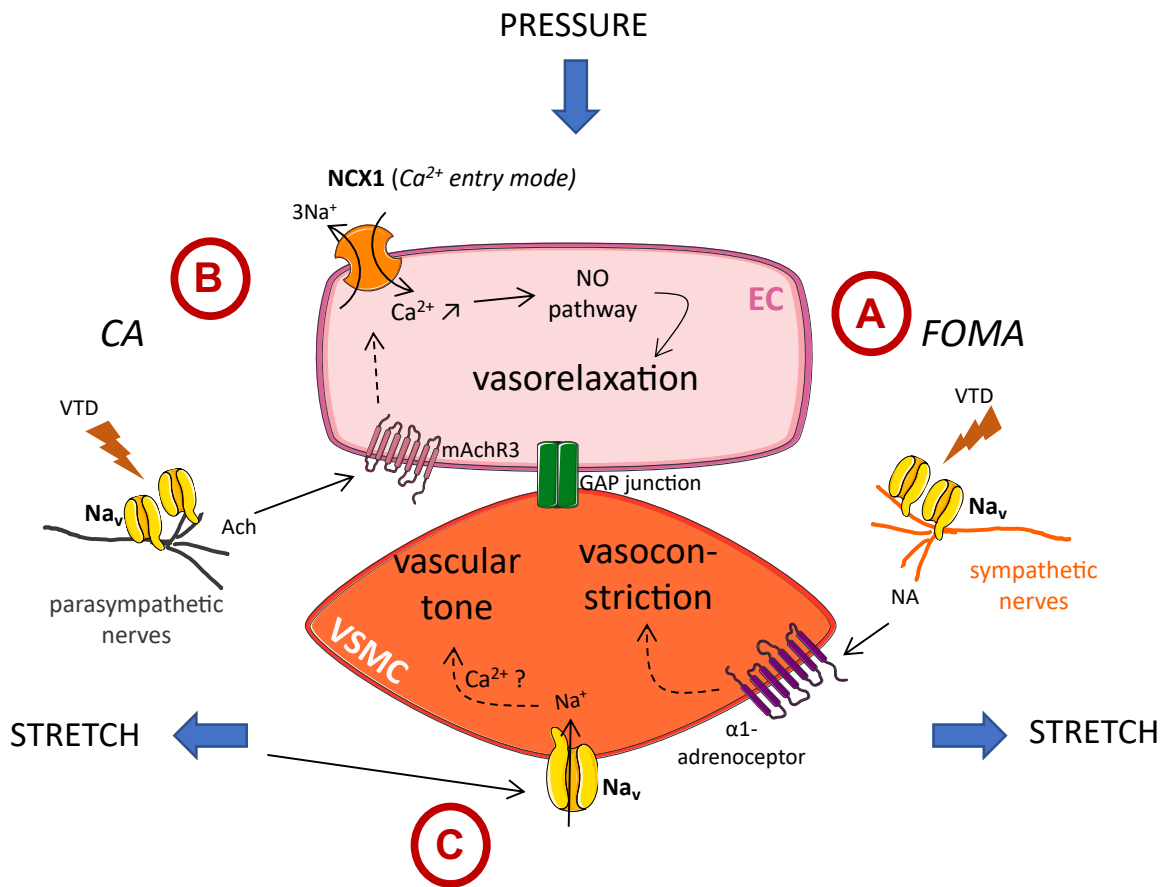


Figure 26 : Rôle des canaux Na_v dans la régulation de la vasomotricité des MA

A) Dans les FOMA, la VTD activerait les canaux Na_v des TN sympathiques libérant la noradrénaline (NA) qui a un effet vasoconstricteur. B) Quant aux CA, la VTD activerait cette fois-ci les canaux Na_v des TN parasympathiques sécrétant l'Ach. L'Ach libérée entraîne l'augmentation de la [Ca²⁺]_i des CE par NCX1 (« Ca²⁺ entry mode »). Le Ca²⁺ intracellulaire stimule la voie du NO et induit une vasorelaxation. C) L'étiement pariétal exercé par la pression activerait les canaux Na_v des CMLV, ce qui participerait au développement du tonus vasculaire.

Bibliographie

- Aalkjaer, C., Nilsson, H., De Mey, J., 2020. Sympathetic and sensory-motor nerves in peripheral small arteries. *Physiological Reviews* physrev.00007.2020. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2020>
- Adebiyi, A., Zhao, G., Narayanan, D., Thomas, C.M., Bannister, J.P., Jaggar, J.H., 2010. Isoform-selective physical coupling of TRPC3 channels to IP3 receptors in smooth muscle cells regulates arterial contractility. *Circ Res* 106, 1603–1612. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.216804>
- Alves-Lopes, R., Neves, K.B., Anagnostopoulou, A., Rios, F.J., Lacchini, S., Montezano, A.C., Touyz, R.M., 2020. Crosstalk Between Vascular Redox and Calcium Signaling in Hypertension Involves TRPM2 (Transient Receptor Potential Melastatin 2) Cation Channel. *Hypertension* 75, 139–149. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13861>
- Amiya, E., Watanabe, M., Komuro, I., 2014. The Relationship between Vascular Function and the Autonomic Nervous System. *Ann Vasc Dis* 7, 109–119. <https://doi.org/10.3400/avd.ra.14-00048>
- Andrikopoulos, P., Baba, A., Matsuda, T., Djamgoz, M.B.A., Yaqoob, M.M., Eccles, S.A., 2011a. Ca²⁺ Influx through Reverse Mode Na⁺/Ca²⁺ Exchange Is Critical for Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 1/2 Activation and Angiogenic Functions of Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 286, 37919–37931. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.251777>
- Andrikopoulos, P., Fraser, S.P., Patterson, L., Ahmad, Z., Burcu, H., Ottaviani, D., Diss, J.K.J., Box, C., Eccles, S.A., Djamgoz, M.B.A., 2011b. Angiogenic Functions of Voltage-gated Na⁺ Channels in Human Endothelial Cells MODULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) SIGNALING. *J. Biol. Chem.* 286, 16846–16860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187559>
- Andrikopoulos, P., Kieswich, J., Harwood, S.M., Baba, A., Matsuda, T., Barbeau, O., Jones, K., Eccles, S.A., Yaqoob, M.M., 2015. Endothelial Angiogenesis and Barrier Function in Response to Thrombin Require Ca²⁺ Influx through the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger. *J. Biol. Chem.* 290, 18412–18428. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.628156>
- Aziz, Q., Li, Y., Anderson, N., Ojake, L., Tsisanova, E., Tinker, A., 2017. Molecular and functional characterization of the endothelial ATP-sensitive potassium channel. *Journal of Biological Chemistry* 292, 17587–17597. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810325>
- Aziz, Q., Li, Y., Tinker, A., 2018. Endothelial biology and ATP-sensitive potassium channels. *Channels (Austin)* 12, 45–46. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1412151>
- Bae, Y.M., Kim, A., Kim, J., Park, S.W., Kim, T.-K., Lee, Y.-R., Kim, B., Cho, S.I., 2006. Serotonin depolarizes the membrane potential in rat mesenteric artery myocytes by decreasing voltage-gated K⁺ currents. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347, 468–476. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.116>
- Bagal, S.K., Chapman, M.L., Marron, B.E., Prime, R., Storer, R.I., Swain, N.A., 2014. Recent progress in sodium channel modulators for pain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 3690–3699. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.06.038>
- Barajas-Martinez, H., Goodrow, R.J., Hu, D., Patel, P., Desai, M., Panama, B.K., Treat, J.A., Aistrup, G.L., Cordeiro, J.M., 2017. Biophysical and molecular comparison of sodium current in cells isolated from canine atria and pulmonary vein. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 469, 703–712. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1956-4>
- Baratchi, S., Khoshmanesh, K., Woodman, O.L., Potocnik, S., Peter, K., McIntyre, P., 2017. Molecular Sensors of Blood Flow in Endothelial Cells. *Trends Mol Med* 23, 850–868. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.07.007>
- Barnett, M.W., Larkman, P.M., 2007. The action potential. *Practical Neurology* 7, 192–197.
- Baumbach, G.L., Heistad, D.D., 1989. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 13, 968–972. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.13.6.968>
- Bavi, N., Nikolaev, Y., Bavi, O., Ridone, P., Martinac, A., Nakayama, Y., Cox, C., Martinac, B., 2017. Principles of Mechanosensing at the Membrane Interface. pp. 85–119. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6244-5_4
- Bayliss, W.M., 1902. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of Physiology* 28, 220–231. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1902.sp000911>

- Berra-Romani, R., Blaustein, M.P., Matteson, D.R., 2005. TTX-sensitive voltage-gated Na⁺ channels are expressed in mesenteric artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 289, H137–H145. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01156.2004>
- Black, J.A., Dib-Hajj, S., Cohen, S., Hinson, A.W., Waxman, S.G., 1998. Glial cells have heart: rH1 Na⁺ channel mRNA and protein in spinal cord astrocytes. *Glia* 23, 200–208.
- Black, J.A., Liu, S., Waxman, S.G., 2009. Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia* 57, 1072–1081. <https://doi.org/10.1002/glia.20830>
- Black, J.A., Newcombe, J., Waxman, S.G., 2010. Astrocytes within multiple sclerosis lesions upregulate sodium channel Nav1.5. *Brain* 133, 835–846. <https://doi.org/10.1093/brain/awq003>
- Black, J.A., Westenbroek, R., Minturn, J.E., Ransom, B.R., Catterall, W.A., Waxman, S.G., 1995. Isoform-specific expression of sodium channels in astrocytes in vitro: immunocytochemical observations. *Glia* 14, 133–144. <https://doi.org/10.1002/glia.440140208>
- Boccardi, G., Choby, C., Frapier, J.M., Quignard, J.F., Nargeot, J., Dayanithi, G., Richard, S., 1999. Regulation of Ca²⁺ Homeostasis by Atypical Na⁺ Currents in Cultured Human Coronary Myocytes. *Circulation Research* 85, 606–613. <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.7.606>
- Bocquet, A., Sablayrolles, S., Vacher, B., Le Grand, B., 2010. F 15845, a new blocker of the persistent sodium current prevents consequences of hypoxia in rat femoral artery. *Br. J. Pharmacol.* 161, 405–415. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00912.x>
- Borysova, L., Dora, K.A., Garland, C.J., Burdyga, T., 2018. Smooth muscle gap-junctions allow propagation of intercellular Ca²⁺ waves and vasoconstriction due to Ca²⁺ based action potentials in rat mesenteric resistance arteries. *Cell Calcium* 75, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.08.001>
- Bossu, J. I., Elhamdani, A., Feltz, A., 1992. Voltage-dependent calcium entry in confluent bovine capillary endothelial cells. *FEBS Letters* 299, 239–242. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80123-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80123-X)
- Bossu, J.-L., Feltz, A., Rodeau, J.-L., Tanzi, F., 1989. Voltage-dependent transient calcium currents in freshly dissociated capillary endothelial cells. *FEBS Letters* 255, 377–380. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81126-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81126-3)
- Brähler, S., Kaistha, A., Schmidt, V.J., Wölfle, S.E., Busch, C., Kaistha, B.P., Kacik, M., Hasenau, A.-L., Grgic, I., Si, H., Bond, C.T., Adelman, J.P., Wulff, H., de Wit, C., Hoyer, J., Köhler, R., 2009. Genetic Deficit of SK3 and IK1 Channels Disrupts the Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Vasodilator Pathway and Causes Hypertension. *Circulation* 119, 2323–2332. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.846634>
- Brain, S.D., Williams, T.J., Tippins, J.R., Morris, H.R., MacIntyre, I., 1985. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 313, 54–56. <https://doi.org/10.1038/313054a0>
- Braunstein, T.H., Inoue, R., Cribbs, L., Oike, M., Ito, Y., Holstein-Rathlou, N.-H., Jensen, L.J., 2009. The Role of L- and T-Type Calcium Channels in Local and Remote Calcium Responses in Rat Mesenteric Terminal Arterioles. *JVR* 46, 138–151. <https://doi.org/10.1159/000151767>
- Brayden, J.E., Nelson, M.T., 1992. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 256, 532–535. <https://doi.org/10.1126/science.1373909>
- Bulley, S., Jaggar, J.H., 2014. Cl⁻ channels in smooth muscle cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 466, 861–872. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1357-2>
- Burnstock, G., Ralevic, V., 1994. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *British Journal of Plastic Surgery* 47, 527–543. [https://doi.org/10.1016/0007-1226\(94\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0007-1226(94)90136-8)
- Cannon, S.C., 2018. Sodium Channelopathies of Skeletal Muscle. *Handb Exp Pharmacol* 246, 309–330. https://doi.org/10.1007/164_2017_52
- Cannon, S.C., Brown, R.H., Corey, D.P., 1993. Theoretical reconstruction of myotonia and paralysis caused by incomplete inactivation of sodium channels. *Biophys J* 65, 270–288. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81045-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81045-2)

- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *NATURE MEDICINE* 9, 8.
- Carrithers, M.D., Dib-Hajj, S., Carrithers, L.M., Tokmoulina, G., Pypaert, M., Jonas, E.A., Waxman, S.G., 2007. Expression of the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 in the Macrophage Late Endosome Regulates Endosomal Acidification. *The Journal of Immunology* 178, 7822–7832. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7822>
- Catterall, W.A., 2014. Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54, 317–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140232>
- Catterall, W.A., 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., Waxman, S.G., 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol Rev* 57, 397–409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>
- Catterall, W.A., Lenaeus, M.J., Gamal El-Din, T.M., 2020. Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 60, 133–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021757>
- Catterall, W.A., Swanson, T.M., 2015. Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol Pharmacol* 88, 141–150. <https://doi.org/10.1124/mol.114.097659>
- Chahine, M., O’Leary, M., 2011. Regulatory Role of Voltage-Gated Na⁺ Channel β Subunits in Sensory Neurons. *Frontiers in Pharmacology* 2.
- Chen, G., Suzuki, H., Weston, A.H., 1988. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *British Journal of Pharmacology* 95, 1165–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb11752.x>
- Chen, H., 2018. Role of thromboxane A2 signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 134, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2017.11.004>
- Chen, L., Song, H., Wang, Y., Lee, J.C., Kotlikoff, M.I., Pritchard, T.J., Paul, R.J., Zhang, J., Blaustein, M.P., 2015. Arterial α 2-Na⁺ pump expression influences blood pressure: lessons from novel, genetically engineered smooth muscle-specific α 2 mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 309, H958–H968. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00430.2015>
- Cheng, X., Choi, J.-S., Waxman, S.G., Dib-Hajj, S.D., 2021. Mini-review - Sodium channels and beyond in peripheral nerve disease: Modulation by cytokines and their effector protein kinases. *Neuroscience Letters* 741, 135446. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135446>
- Chipperfield, A.R., Harper, A.A., 2000. Chloride in smooth muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 74, 175–221. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(00\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00024-9)
- Chistiakov, D.A., Ashwell, K.W., Orekhov, A.N., Bobryshev, Y.V., 2015. Innervation of the arterial wall and its modification in atherosclerosis. *Autonomic Neuroscience* 193, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.06.005>
- Chiu, J.-J., Chien, S., 2011. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 91, 327–387. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2009>
- Choby, C., Mangoni, M.E., Boccara, G., Nargeot, J., Richard, S., 2000. Evidence for tetrodotoxin-sensitive sodium currents in primary cultured myocytes from human, pig and rabbit arteries. *Eur J Physiol* 440, 149–152. <https://doi.org/10.1007/s004240000268>
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M., Stern, D.M., 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527–3561.
- Clausen, M.V., Hilbers, F., Poulsen, H., 2017. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Frontiers in Physiology* 8.
- Clément-Chomienne, O., Walsh, M.P., Cole, W.C., 1996. Angiotensin II activation of protein kinase C decreases delayed rectifier K⁺ current in rabbit vascular myocytes. *J Physiol* 495 (Pt 3), 689–700.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021626>

Cook, N.S., 1989. Effect of some potassium channel blockers on contractile responses of the rabbit aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 13, 299–306. <https://doi.org/10.1097/00005344-198902000-00019>

Courtney, K.R., 1975. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA. *J Pharmacol Exp Ther* 195, 225–236.

Cox, R.H., 2005. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys* 42, 167–195. <https://doi.org/10.1385/CBB:42:2:167>

Cox, R.H., Zhou, Z., Tulenko, T.N., 1998. Voltage-Gated Sodium Channels in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *JVR* 35, 310–317. <https://doi.org/10.1159/000025600>

Craner, M.J., Damarjian, T.G., Liu, S., Hains, B.C., Lo, A.C., Black, J.A., Newcombe, J., Cuzner, M.L., Waxman, S.G., 2005. Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia* 49, 220–229. <https://doi.org/10.1002/glia.20112>

Cummins, T.R., Zhou, J., Sigworth, F.J., Ukomadu, C., Stephan, M., Ptáček, L.J., Agnew, W.S., 1993. Functional consequences of a Na⁺ channel mutation causing hyperkalemic periodic paralysis. *Neuron* 10, 667–678. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90168-q](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90168-q)

Daly, J.W., Witkop, B., Bommer, P., Biemann, K., 1965. Batrachotoxin. The active principle of the Colombian arrow poison frog, *Phylllobates bicolor*. *J Am Chem Soc* 87, 124–126. <https://doi.org/10.1021/ja01079a026>

Dam, V.S., Boedtkjer, D.M.B., Nyvad, J., Aalkjaer, C., Matchkov, V., 2014. TMEM16A knockdown abrogates two different Ca(2+)-activated Cl (-) currents and contractility of smooth muscle in rat mesenteric small arteries. *Pflugers Arch* 466, 1391–1409. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1382-1>

Davenport, A.P., Hyndman, K.A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D.E., Pollock, J.S., Pollock, D.M., Webb, D.J., Maguire, J.J., 2016. Endothelin. *Pharmacol Rev* 68, 357–418. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>

Davis, M.J., Donovitz, J.A., Hood, J.D., 1992. Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 262, C1083–C1088. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.262.4.C1083>

Davis, M.J., Hill, M.A., 1999. Signaling Mechanisms Underlying the Vascular Myogenic Response. *Physiological Reviews* 79, 387–423. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.2.387>

de Lera Ruiz, M., Kraus, R.L., 2015. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J. Med. Chem.* 58, 7093–7118. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>

Dharmashankar, K., Widlansky, M.E., 2010. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. *Curr Hypertens Rep* 12, 448–455. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0150-2>

Dib-Hajj, S.D., Black, J.A., Waxman, S.G., 2015. Nav1.9: a sodium channel linked to human pain. *Nat Rev Neurosci* 16, 511–519. <https://doi.org/10.1038/nrn3977>

Dick, G.M., Bratz, I.N., Borbouse, L., Payne, G.A., Dincer, Ü.D., Knudson, J.D., Rogers, P.A., Tune, J.D., 2008. Voltage-dependent K⁺ channels regulate the duration of reactive hyperemia in the canine coronary circulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01279.2007>

Diss, J.K.J., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A., Djamgoz, M.B.A., 2005. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8, 266–273. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500796>

Dittrich, M., Daut, J., 1999. Voltage-dependent K(+) current in capillary endothelial cells isolated from guinea pig heart. *Am J Physiol* 277, H119–127. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.1.H119>

Do, H.K., Kogure, K., Simidu, U., 1990. Identification of deep-sea-sediment bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl Environ Microbiol* 56, 1162–1163. <https://doi.org/10.1128/aem.56.4.1162-1163.1990>

Dong, H., Waldron, G.J., Cole, W.C., Triggle, C.R., 1998. Roles of calcium-activated and voltage-gated delayed rectifier

potassium channels in endothelium-dependent vasorelaxation of the rabbit middle cerebral artery. *British Journal of Pharmacology* 123, 821–832. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701680>

Douguet, D., Patel, A., Xu, A., Vanhoutte, P.M., Honoré, E., 2019. Piezo Ion Channels in Cardiovascular Mechanobiology. *Trends in Pharmacological Sciences* 40, 956–970. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.10.002>

Dulin, N.O., 2020. Calcium-Activated Chloride Channel ANO1/TMEM16A: Regulation of Expression and Signaling. *Frontiers in Physiology* 11.

Earley, S., Brayden, J.E., 2015. Transient Receptor Potential Channels in the Vasculature. *Physiological Reviews* 95, 645–690. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2014>

Earley Scott, Waldron Brian J., Brayden Joseph E., 2004. Critical Role for Transient Receptor Potential Channel TRPM4 in Myogenic Constriction of Cerebral Arteries. *Circulation Research* 95, 922–929. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000147311.54833.03>

Emery, E.C., Luiz, A.P., Wood, J.N., 2016. Nav1.7 and other voltage-gated sodium channels as drug targets for pain relief. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 20, 975–983. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1162295>

Estacion, M., Dib-Hajj, S.D., Benke, P.J., Te Morsche, R.H.M., Eastman, E.M., Macala, L.J., Drenth, J.P.H., Waxman, S.G., 2008. Nav1.7 gain-of-function mutations as a continuum: A1632E displays physiological changes associated with erythromelalgia and paroxysmal extreme pain disorder mutations and produces symptoms of both disorders. *J Neurosci* 28, 11079–11088. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3443-08.2008>

Faber, C.G., Lauria, G., Merkies, I.S.J., Cheng, X., Han, C., Ahn, H.-S., Persson, A.-K., Hoeijmakers, J.G.J., Gerrits, M.M., Pierro, T., Lombardi, R., Kapetis, D., Dib-Hajj, S.D., Waxman, S.G., 2012. Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 19444–19449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216080109>

Fancher, I.S., Levitan, I., 2020. Endothelial inwardly-rectifying K⁺ channels as a key component of shear stress-induced mechanotransduction, in: *Current Topics in Membranes*. Elsevier, pp. 59–88. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2020.02.002>

Féléto, M., 2009. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol* 156, 545–562. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00052.x>

Fertleman, C.R., Baker, M.D., Parker, K.A., Moffatt, S., Elmslie, F.V., Abrahamsen, B., Ostman, J., Klugbauer, N., Wood, J.N., Gardiner, R.M., Rees, M., 2006. SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron* 52, 767–774. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.006>

Figuroa, X.F., Chen, C.-C., Campbell, K.P., Damon, D.N., Day, K.H., Ramos, S., Duling, B.R., 2007. Are voltage-dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone? *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 293, H1371–H1383. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01368.2006>

Fleming, I., Bauersachs, J., Busse, R., 1996. Paracrine functions of the coronary vascular endothelium. *Mol Cell Biochem* 157, 137–145. <https://doi.org/10.1007/BF00227892>

Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* 33, 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>

Fort, A., Cordaillat, M., Thollon, C., Salazar, G., Mechaly, I., Villeneuve, N., Vilaine, J.-P., Richard, S., Virsolvy, A., 2009. New Insights in the Contribution of Voltage-Gated Nav Channels to Rat Aorta Contraction. *PLOS ONE* 4, e7360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007360>

Foster, M.N., Coetzee, W.A., 2016. KATP Channels in the Cardiovascular System. *Physiological Reviews* 96, 177–252. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2015>

Francke, M., Pannicke, T., Biedermann, B., Faude, F., Reichelt, W., 1996. Sodium Current Amplitude Increases Dramatically in Human Retinal Glial Cells during Diseases of the Eye. *European Journal of Neuroscience* 8, 2662–2670. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01561.x>

Fraser, S.P., Diss, J.K.J., Chioni, A.-M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M.,

Grzywna, Z., Brackenbury, W.J., Theodorou, D., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M.T., Slade, M.J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D.S., Coombes, R.C., Djamgoz, M.B.A., 2005. Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis. *Clinical Cancer Research* 11, 5381–5389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327>

Freichel, M., Suh, S.H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weißgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V., Nilius, B., 2001. Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 3, 121–127. <https://doi.org/10.1038/35055019>

Friedman, M.A., Fleming, L.E., Fernandez, M., Bienfang, P., Schrank, K., Dickey, R., Bottein, M.-Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granade, R., Reich, A., 2008. Ciguatera Fish Poisoning: Treatment, Prevention and Management. *Mar Drugs* 6, 456–479. <https://doi.org/10.3390/md20080022>

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>

Garber, S.S., Miller, C., 1987. Single Na⁺ channels activated by veratridine and batrachotoxin. *J Gen Physiol* 89, 459–480. <https://doi.org/10.1085/jgp.89.3.459>

Garland, C.J., Hiley, C.R., Dora, K.A., 2011. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *British Journal of Pharmacology* 164, 839–852. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01148.x>

GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388, 1659–1724. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8)

Gelband, C.H., Ishikawa, T., Post, J.M., Keef, K.D., Hume, J.R., 1993. Intracellular divalent cations block smooth muscle K⁺ channels. *Circ Res* 73, 24–34. <https://doi.org/10.1161/01.res.73.1.24>

Gerhardt, H., 2008. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* 4, 241–246. <https://doi.org/10.4161/org.4.4.7414>

Gibbons, G.H., Dzau, V.J., 1994. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 330, 1431–1438. <https://doi.org/10.1056/NEJM199405193302008>

Gilbert, G., Courtois, A., Dubois, M., Cussac, L.-A., Ducret, T., Lory, P., Marthan, R., Savineau, J.-P., Quignard, J.-F., 2017. T-type voltage gated calcium channels are involved in endothelium-dependent relaxation of mice pulmonary artery. *Biochemical Pharmacology* 138, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.021>

Goldberg, Y.P., Price, N., Namdari, R., Cohen, C.J., Lamers, M.H., Winters, C., Price, J., Young, C.E., Verschoof, H., Sherrington, R., Pimstone, S.N., Hayden, M.R., 2012. Treatment of Nav1.7-mediated pain in inherited erythromelalgia using a novel sodium channel blocker. *PAIN* 153, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.008>

Gonzales, A.L., Yang, Y., Sullivan, M.N., Sanders, L., Dabertrand, F., Hill-Eubanks, D.C., Nelson, M.T., Earley, S., 2014. A PLC γ 1-Dependent, Force-Sensitive Signaling Network in the Myogenic Constriction of Cerebral Arteries. *Sci Signal* 7, ra49. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004732>

Gordienko, D.V., Tsukahara, H., 1994. Tetrodotoxin-blockable depolarization-activated Na⁺ currents in a cultured endothelial cell line derived from rat interlobar arter and human umbilical vein. *Pflugers Arch.* 428, 91–93.

Gosling, M., Harley, S.L., Turner, R.J., Carey, N., Powell, J.T., 1998. Human saphenous vein endothelial cells express a tetrodotoxin-resistant, voltage-gated sodium current. *J. Biol. Chem.* 273, 21084–21090.

Goto, K., Edwards, F.R., Hill, C.E., 2007. Depolarization evoked by acetylcholine in mesenteric arteries of hypertensive rats attenuates endothelium-dependent hyperpolarizing factor. *Journal of Hypertension* 25, 345–359. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328010d616>

Goto, K., Ohtsubo, T., Kitazono, T., 2018. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Hypertension: The Role of Endothelial Ion Channels. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19010315>

Hahn, C., Schwartz, M.A., 2009. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*

10, 53–62. <https://doi.org/10.1038/nrm2596>

Hansen, P.B., Jensen, B.L., Andreasen, D., Skøtt, O., 2001. Differential expression of T- and L-type voltage-dependent calcium channels in renal resistance vessels. *Circ Res* 89, 630–638. <https://doi.org/10.1161/hh1901.097126>

Harraz, O.F., Abd El-Rahman, R.R., Bigdely-Shamloo, K., Wilson, S.M., Brett, S.E., Romero, M., Gonzales, A.L., Earley, S., Vigmond, E.J., Nygren, A., Menon, B.K., Mufti, R.E., Watson, T., Starreveld, Y., Furstenhaupt, T., Muellerleile, P.R., Kurjiaka, D.T., Kyle, B.D., Braun, A.P., Welsh, D.G., 2014. Ca(V)3.2 channels and the induction of negative feedback in cerebral arteries. *Circ Res* 115, 650–661. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.304056>

Hayabuchi, Y., Davies, N.W., Standen, N.B., 2001a. Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C. *The Journal of Physiology* 530, 193–205. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.01931.x>

Hayabuchi, Y., Standen, N.B., Davies, N.W., 2001b. Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K⁺ channels of rat arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281, H2480–H2489. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.6.H2480>

Hayoz, S., Bradley, V., Boerman, E.M., Nourian, Z., Segal, S.S., Jackson, W.F., 2014. Aging increases capacitance and spontaneous transient outward current amplitude of smooth muscle cells from murine superior epigastric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H1512–1524. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00492.2013>

Hayward, L.J., Brown, R.H., Cannon, S.C., 1997. Slow inactivation differs among mutant Na channels associated with myotonia and periodic paralysis. *Biophys J* 72, 1204–1219. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78768-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78768-X)

Heaps, C.L., Tharp, D.L., Bowles, D.K., 2005. Hypercholesterolemia abolishes voltage-dependent K⁺ channel contribution to adenosine-mediated relaxation in porcine coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H568–576. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00157.2004>

Hein, T.W., Xu, W., Ren, Y., Kuo, L., 2013. Cellular signalling pathways mediating dilation of porcine pial arterioles to adenosine A_{2A} receptor activation. *Cardiovasc Res* 99, 156–163. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt072>

Henrion, D., Terzi, F., Matrougui, K., Duriez, M., Boulanger, C.M., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Briand, P., Friedlander, G., Poitevin, P., Lévy, B.I., 1997. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest* 100, 2909–2914. <https://doi.org/10.1172/JCI119840>

Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y., 2010. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews* 90, 291–366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>

Hijmering, M.L., Stroes, E.S.G., Olijhoek, J., Hutten, B.A., Blankestijn, P.J., Rabelink, T.J., 2002. Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation. *Journal of the American College of Cardiology* 39, 683–688. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01786-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01786-7)

Hille, B., 1977. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *Journal of General Physiology* 69, 497–515. <https://doi.org/10.1085/jgp.69.4.497>

Hirst, G.D., Silverberg, G.D., van Helden, D.F., 1986. The action potential and underlying ionic currents in proximal rat middle cerebral arterioles. *J. Physiol. (Lond.)* 371, 289–304. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp015975>

Ho, W.-S.V., Davis, A.J., Chadha, P.S., Greenwood, I.A., 2013. Effective contractile response to voltage-gated Na⁺ channels revealed by a channel activator. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 304, C739–C747. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00164.2012>

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117, 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>

Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., Schultz, G., 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259–263. <https://doi.org/10.1038/16711>

Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T., 2002. Subunit composition of mammalian transient receptor

potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7461–7466. <https://doi.org/10.1073/pnas.102596199>

Houde, M., Desbiens, L., D'Orléans-Juste, P., 2016. Chapter Five - Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity, in: Khalil, R.A. (Ed.), *Advances in Pharmacology, Endothelium*. Academic Press, pp. 143–175. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.05.002>

House, C.D., Vaske, C.J., Schwartz, A.M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., Sarvazyan, N., Irby, R., Strausberg, R.L., Hales, T.G., Stuart, J.M., Lee, N.H., 2010. Voltage-Gated Na⁺ Channel SCN5A Is a Key Regulator of a Gene Transcriptional Network That Controls Colon Cancer Invasion. *Cancer Research* 70, 6957–6967. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1169>

Huang, A., Sun, D., Smith, C.J., Connetta, J.A., Shesely, E.G., Koller, A., Kaley, G., 2000. In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 278, H762–H768. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.3.H762>

Huang, J., Han, C., Estacion, M., Vasylyev, D., Hoeijmakers, J.G.J., Gerrits, M.M., Tyrrell, L., Lauria, G., Faber, C.G., Dib-Hajj, S.D., Merkies, I.S.J., Waxman, S.G., PROPANE Study Group, 2014. Gain-of-function mutations in sodium channel Na(v)1.9 in painful neuropathy. *Brain* 137, 1627–1642. <https://doi.org/10.1093/brain/awu079>

Hübner, C.A., Schroeder, B.C., Ehmke, H., 2015. Regulation of vascular tone and arterial blood pressure: role of chloride transport in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 467, 605–614. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1684-y>

Hurt, K.J., Musicki, B., Palese, M.A., Crone, J.K., Becker, R.E., Moriarity, J.L., Snyder, S.H., Burnett, A.L., 2002. Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4061–4066. <https://doi.org/10.1073/pnas.052712499>

Ishikawa, T., Hume, J.R., Keef, K.D., 1993. Modulation of K⁺ and Ca²⁺ channels by histamine H1-receptor stimulation in rabbit coronary artery cells. *J Physiol* 468, 379–400.

Jackson, W.F., 2022. Endothelial Ion Channels and Cell-Cell Communication in the Microcirculation. *Frontiers in Physiology* 13.

Jackson, W.F., 2020. Chapter Two - Ion channels and the regulation of myogenic tone in peripheral arterioles, in: Jackson, W.F. (Ed.), *Current Topics in Membranes, Ion Channels and Calcium Signaling in the Microcirculation*. Academic Press, pp. 19–58. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2020.01.002>

Jackson, W.F., 2005. Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation. *Microcirculation* 12, 113–127. <https://doi.org/10.1080/10739680590896072>

Jackson, W.F., 2000. Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension* 35, 173–178.

Jackson-Weaver, O., Paredes, D.A., Gonzalez Bosc, L.V., Walker, B.R., Kanagy, N.L., 2011. Intermittent hypoxia in rats increases myogenic tone through loss of hydrogen sulfide activation of large-conductance Ca(2⁺)-activated potassium channels. *Circ Res* 108, 1439–1447. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.228999>

Jain Surbhi, Gabunia Khatuna, Kelemen Sheri E., Panetti Tracee S., Autieri Michael V., 2011. The Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin 19 Is Expressed By and Angiogenic for Human Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 167–175. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.214916>

Jiao, J., Garg, V., Yang, B., Elton, T.S., Hu, K., 2008. Protein Kinase C-ε Induces Caveolin-Dependent Internalization of Vascular Adenosine 5'-Triphosphate-Sensitive K⁺ Channels. *Hypertension* 52, 499–506. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.110817>

Jo, T., Nagata, T., Iida, H., Imuta, H., Iwasawa, K., Ma, J., Hara, K., Omata, M., Nagai, R., Takizawa, H., Nagase, T., Nakajima, T., 2004. Voltage-gated sodium channel expressed in cultured human smooth muscle cells: involvement of SCN9A. *FEBS Lett* 567, 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.092>

Johansson, B., 1989. Myogenic tone and reactivity: definitions based on muscle physiology. *J Hypertens Suppl* 7, S5–8; discussion S9.

Kapplinger, J.D., Tester, D.J., Alders, M., Benito, B., Berthet, M., Brugada, J., Brugada, P., Fressart, V., Guerchicoff, A., Harris-Kerr, C., Kamakura, S., Kyndt, F., Koopmann, T.T., Miyamoto, Y., Pfeiffer, R., Pollevick, G.D., Probst, V., Zumhagen, S., Vatta, M., Towbin, J.A., Shimizu, W., Schulze-Bahr, E., Antzelevitch, C., Salisbury, B.A., Guicheney, P., Wilde, A.A.M., Brugada, R., Schott, J.-J., Ackerman, M.J., 2010. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 7, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.09.069>

Kauffenstein, G., Laher, I., Matrougui, K., Guéroux, N.C., Henrion, D., 2012. Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. *Cardiovascular Research* 95, 223–232. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs152>

Kawasaki, H., Takatori, S., Zamami, Y., Koyama, T., Goda, M., Hirai, K., Tangsucharit, P., Jin, X., Hobara, N., Kitamura, Y., 2011. Paracrine control of mesenteric perivascular axo-axonal interaction. *Acta Physiologica* 203, 3–11. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02197.x>

Keatinge, W.R., 1968. Sodium flux and electrical activity of arterial smooth muscle. *J Physiol* 194, 183–200. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008401>

Kefaloyianni, E., Coetzee, W.A., 2011. Transcriptional remodeling of ion channel subunits by flow adaptation in human coronary artery endothelial cells. *J. Vasc. Res.* 48, 357–367. <https://doi.org/10.1159/000323475>

Khananshvil, D., 2014. Sodium-calcium exchangers (NCX): molecular hallmarks underlying the tissue-specific and systemic functions. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 466, 43–60. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1405-y>

Kim, M.Y., Seol, G.H., Liang, G.H., Kim, J.A., Suh, S.H., 2005. Na⁺-K⁺ pump activation inhibits endothelium-dependent relaxation by activating the forward mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in mouse aorta. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289, H2020–H2029. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00908.2004>

Kis-Toth, K., Hajdu, P., Bacskai, I., Szilagyi, O., Papp, F., Szanto, A., Posta, E., Gogolak, P., Panyi, G., Rajnavolgyi, E., 2011. Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 Maintains the Membrane Potential and Regulates the Activation and Chemokine-Induced Migration of a Monocyte-Derived Dendritic Cell Subset. *The Journal of Immunology* 187, 1273–1280. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003345>

Kitamura, K., Yamazaki, J., 2001. Chloride Channels and Their Functional Roles in Smooth Muscle Tone in the Vasculature. *Japanese Journal of Pharmacology* 85, 351–357. <https://doi.org/10.1254/jjp.85.351>

Knot, H.J., Nelson, M.T., 1998. Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol* 508 (Pt 1), 199–209. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.199br.x>

Ko, E.A., Park, W.S., Firth, A.L., Hong, D.H., Choi, S.W., Heo, H.-J., Kim, M.H., Noh, J.H., Ko, J.-H., Kim, N., Earm, Y.E., Song, D.K., Han, J., 2010. Increased sensitivity of serotonin on the voltage-dependent K⁺ channels in mesenteric arterial smooth muscle cells of OLETF rats. *Progress in Biophysics and Molecular Biology, Ion channels: Growing evidence for the role in disease* 103, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.02.003>

Körner, J., Albani, S., Sudha Bhagavath Eswaran, V., Roehl, A.B., Rossetti, G., Lampert, A., 2022. Sodium Channels and Local Anesthetics—Old Friends With New Perspectives. *Frontiers in Pharmacology* 13.

Korsgaard, N., Mulvany, M.J., 1988. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. *Hypertension* 12, 162–167. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.12.2.162>

Kotecha, N., Hill, M.A., 2005. Myogenic contraction in rat skeletal muscle arterioles: smooth muscle membrane potential and Ca²⁺ signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289, H1326–H1334. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00323.2005>

Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R.-P., Jung, F., 2019. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>

Kuhlencordt Peter J., Gyurko Robert, Han Fred, Scherrer-Crosbie Marielle, Aretz Thomas H., Hajjar Roger, Picard Michael H., Huang Paul L., 2001. Accelerated Atherosclerosis, Aortic Aneurysm Formation, and Ischemic Heart Disease in Apolipoprotein E/Endothelial Nitric Oxide Synthase Double-Knockout Mice. *Circulation* 104, 448–454.

<https://doi.org/10.1161/hc2901.091399>

Kuo, I.Y., Ellis, A., Seymour, V.A.L., Sandow, S.L., Hill, C.E., 2010. Dihydropyridine-insensitive calcium currents contribute to function of small cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1226–1239. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.11>

Kuo, L., Chancellor, J.D., 1995. Adenosine potentiates flow-induced dilation of coronary arterioles by activating KATP channels in endothelium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.2.H541>

Kwiatkiewicz, A.M., Minshall, R.D., Cool, D.R., Skidgel, R.A., Malik, A.B., Tirupathi, C., 2006. Caveolin-1 Regulates Store-Operated Ca²⁺ Influx by Binding of Its Scaffolding Domain to Transient Receptor Potential Channel-1 in Endothelial Cells. *Mol Pharmacol* 70, 1174–1183. <https://doi.org/10.1124/mol.105.021741>

Ledoux, J., Werner, M.E., Brayden, J.E., Nelson, M.T., 2006. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology* 21, 69–78. <https://doi.org/10.1152/physiol.00040.2005>

Lee, C., Kim, J., Shin, S.G., Hwang, S., 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 123, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.014>

Leipert, B., Becker, B.F., Gerlach, E., 1992. Different endothelial mechanisms involved in coronary responses to known vasodilators. *Am J Physiol* 262, H1676–1683. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.262.6.H1676>

Li, H., Chai, Q., Gutterman, D.D., Liu, Y., 2003. Elevated glucose impairs cAMP-mediated dilation by reducing Kv channel activity in rat small coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1213–1219. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00226.2003>

Li, J., Hou, B., Tumova, S., Muraki, K., Bruns, A., Ludlow, M.J., Sedo, A., Hyman, A.J., McKeown, L., Young, R.S., Yuldasheva, N.Y., Majeed, Y., Wilson, L.A., Rode, B., Bailey, M.A., Kim, H.R., Fu, Z., Carter, D.A.L., Bilton, J., Imrie, H., Ajuh, P., Dear, T.N., Cubbon, R.M., Kearney, M.T., Prasad, K.R., Evans, P.C., Ainscough, J.F.X., Beech, D.J., 2014. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature* 515, 279–282. <https://doi.org/10.1038/nature13701>

Liao, S., Liu, T., Yang, R., Tan, W., Gu, J., Deng, M., 2022. Structure and Function of Sodium Channel Nav1.3 in Neurological Disorders. *Cell Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01211-w>

Lillo, M.A., Gaete, P.S., Puebla, M., Ardiles, N.M., Poblete, I., Becerra, A., Simon, F., Figueroa, X.F., 2018. Critical contribution of Na⁺-Ca²⁺ exchanger to the Ca²⁺-mediated vasodilation activated in endothelial cells of resistance arteries. *The FASEB Journal* 32, 2137–2147. <https://doi.org/10.1096/fj.201700365RR>

Liu, C., Huang, Y., Ngai, C., Leung, Y., Yao, X., 2006. TRPC3 is involved in flow- and bradykinin-induced vasodilation in rat small mesenteric arteries. *Acta Pharmacol Sin* 27, 981–990. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00354.x>

Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat Prod Rep* 23, 200–222. <https://doi.org/10.1039/b501296c>

Loga, F., Domes, K., Freichel, M., Flockerzi, V., Dietrich, A., Birnbaumer, L., Hofmann, F., Wegener, J.W., 2013. The role of cGMP/cGKI signalling and Trpc channels in regulation of vascular tone. *Cardiovasc Res* 100, 280–287. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt176>

Lopez-Charcas, O., Espinosa, A.M., Alfaro, A., Herrera-Carrillo, Z., Ramirez-Cordero, B.E., Cortes-Reynosa, P., Perez Salazar, E., Berumen, J., Gomora, J.C., 2018. The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of Nav1.6 channels is mediated by MMP-2 activity. *Sci Rep* 8, 12995. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31364-y>

Lopez-Charcas, O., Pukkanasut, P., Velu, S.E., Brackenbury, W.J., Hales, T.G., Besson, P., Gomora, J.C., Roger, S., 2021. Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancers. *iScience* 24, 102270. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102270>

Loussouarn, G., Sternberg, D., Nicole, S., Marionneau, C., Le Bouffant, F., Toumaniantz, G., Barc, J., Malak, O.A., Fressart, V., Péréon, Y., Baró, I., Charpentier, F., 2016. Physiological and Pathophysiological Insights of Nav1.4 and Nav1.5 Comparison. *Frontiers in Pharmacology* 6.

Lucchesi, P.A., Belmadani, S., Matrougui, K., 2005. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens* 23, 571–579. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000160214.40855.79>

Luykenaar, K.D., Welsh, D.G., 2007. Activators of the PKA and PKG pathways attenuate RhoA-mediated suppression of the KDR current in cerebral arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 292, H2654–H2663. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01255.2006>

Ma, M.-M., Gao, M., Guo, K.-M., Wang, M., Li, X.-Y., Zeng, X.-L., Sun, L., Lv, X.-F., Du, Y.-H., Wang, G.-L., Zhou, J.-G., Guan, Y.-Y., 2017. TMEM16A Contributes to Endothelial Dysfunction by Facilitating Nox2 NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Generation in Hypertension. *Hypertension* 69, 892–901. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08874>

Mackie, A.R., Brueggemann, L.I., Henderson, K.K., Shiels, A.J., Cribbs, L.L., Scrogin, K.E., Byron, K.L., 2008. Vascular KCNQ potassium channels as novel targets for the control of mesenteric artery constriction by vasopressin, based on studies in single cells, pressurized arteries, and in vivo measurements of mesenteric vascular resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 475–483. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.135764>

Marieb, E.N., KN, H., 2013. *Human Anatomy and Physiology*, Benjamin Cummings.

Mattei, C., Legros, C., 2014. The voltage-gated sodium channel: A major target of marine neurotoxins. *Toxicon, Special Issue: Freshwater and Marine Toxins* 91, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.09.016>

Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Gudermann, T., 2011. AT1 receptors as mechanosensors. *Current Opinion in Pharmacology, Cardiovascular and renal* 11, 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.11.003>

Meguro, K., Iida, H., Takano, H., Morita, T., Sata, M., Nagai, R., Nakajima, T., 2009. Function and role of voltage-gated sodium channel Nav1.7 expressed in aortic smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 296, H211–H219. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00960.2008>

Meisler, M.H., Hill, S.F., Yu, W., 2021. Sodium channelopathies in neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurosci* 22, 152–166. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-00418-4>

Michell, B.J., Griffiths, J.E., Mitchelhill, K.I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Montellano, P.R., Kemp, B.E., Pearson, R.B., 1999. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol* 9, 845–848. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80371-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80371-6)

Millar, I.D., Wang, S., Brown, P.D., Barrand, M.A., Hladky, S.B., 2008. Kv1 and Kir2 potassium channels are expressed in rat brain endothelial cells. *Pflugers Arch* 456, 379–391. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0377-1>

Mironneau, J., Martin, C., Arnaudeau, S., Jmari, K., Rakotoarisoa, L., Sayet, I., Mironneau, C., 1990. High-affinity binding sites for [³H]saxitoxin are associated with voltage-dependent sodium channels in portal vein smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 184, 315–319.

Miyazawa, K., Noguchi, T., 2001. Distribution and origin of tetrodotoxin. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 20, 11–33. <https://doi.org/10.1081/TXR-100103081>

Mizuno, S., Demura, Y., Ameshima, S., Okamura, S., Miyamori, I., Ishizaki, T., 2002. Alkalosis stimulates endothelial nitric oxide synthase in cultured human pulmonary arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283, L113–L119. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00436.2001>

Moncada, S., Higgs, E.A., Vane, J.R., 1977. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet* 1, 18–20. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(77\)91655-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)91655-5)

Moncada, S., Needleman, P., Bunting, S., Vane, J.R., 1976. Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating systems and their selective inhibition. *Prostaglandins* 12, 323–335. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(76\)90014-9](https://doi.org/10.1016/0090-6980(76)90014-9)

Moore, C.L., McClenahan, S.J., Hanvey, H.M., Jang, D.-S., Nelson, P.L., Joseph, B.K., Rhee, S.W., 2015. Beta1-Adrenergic Receptor-Mediated Dilation of Rat Cerebral Artery Requires Shaker-Type KV1 Channels on PSD95 Scaffold. *J Cereb Blood Flow Metab* 35, 1537–1546. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.91>

- Moore, C.L., Nelson, P.L., Parelkar, N.K., Rusch, N.J., Rhee, S.W., 2014. Protein Kinase A-Phosphorylated KV1 Channels in PSD95 Signaling Complex Contribute to the Resting Membrane Potential and Diameter of Cerebral Arteries. *Circulation Research* 114, 1258–1267. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303167>
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F., Klugbauer, N., 2003. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J* 22, 6027–6034. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg583>
- Mulvany, M.J., Aalkjaer, C., 1990. Structure and function of small arteries. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.4.921>
- Mulvany, M.J., Baumbach, G.L., Aalkjaer, C., Heagerty, A.M., Korsgaard, N., Schiffrin, E.L., Heistad, D.D., 1996. Vascular remodeling. *Hypertension* 28, 505–506.
- Muraki Katsuhiko, Iwata Yuko, Katanosaka Yuki, Ito Tomohiro, Ohya Susumu, Shigekawa Munekazu, Imaizumi Yuji, 2003. TRPV2 Is a Component of Osmotically Sensitive Cation Channels in Murine Aortic Myocytes. *Circulation Research* 93, 829–838. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000097263.10220.0C>
- Murphy, M.E., Brayden, J.E., 1995. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *The Journal of Physiology* 486, 47–58. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020789>
- Nakahata, N., 2008. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* 118, 18–35. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.01.001>
- Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J., Lederer, W.J., 1995. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270, 633–637. <https://doi.org/10.1126/science.270.5236.633>
- Nilius, B., Droogmans, G., 2002. Calcium-activated chloride channels in vascular endothelial cells, in: *Current Topics in Membranes*. Elsevier, pp. 327–344. [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(02\)53040-4](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(02)53040-4)
- Nilius, B., Droogmans, G., 2001. Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium.
- Nilius, B., Prenen, J., Szücs, G., Wei, L., Tanzi, F., Voets, T., Droogmans, G., 1997. Calcium-activated chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *The Journal of Physiology* 498, 381–396. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp021865>
- Okabe, K., Kitamura, K., Kuriyama, H., 1988. The existence of a highly tetrodotoxin sensitive Na channel in freshly dispersed smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *Pflugers Arch.* 411, 423–428. <https://doi.org/10.1007/bf00587722>
- O'Malley, H.A., Isom, L.L., 2015. Sodium Channel β Subunits: Emerging Targets in Channelopathies. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 481–504. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071846>
- Oparil, S., Acelajado, M.C., Bakris, G.L., Berlowitz, D.R., Cifková, R., Dominiczak, A.F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N.R., Rodgers, A., Whelton, P.K., 2018. Hypertension. *Nature Reviews Disease Primers* 4, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.14>
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664–666. <https://doi.org/10.1038/333664a0>
- Park, S.W., Noh, H.J., Sung, D.J., Kim, J.G., Kim, J.M., Ryu, S.-Y., Kang, K., Kim, B., Bae, Y.M., Cho, H., 2015. Hydrogen peroxide induces vasorelaxation by enhancing 4-aminopyridine-sensitive Kv currents through S-glutathionylation. *Pflugers Arch* 467, 285–297. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1513-3>
- Park, W.S., Han, J., Kim, N., Youm, J.B., Joo, H., Kim, H.K., Ko, J.-H., Earm, Y.E., 2005. Endothelin-1 inhibits inward rectifier K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase C. *J Cardiovasc Pharmacol* 46, 681–689. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000182846.08357.ed>
- Park, W.S., Kim, N., Youm, J.B., Warda, M., Ko, J.-H., Kim, S.J., Earm, Y.E., Han, J., 2006. Angiotensin II inhibits inward rectifier K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase Calpha. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 728–735. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.026>

Payne, C.E., Brown, A.R., Theile, J.W., Loucif, A.J.C., Alexandrou, A.J., Fuller, M.D., Mahoney, J.H., Antonio, B.M., Gerlach, A.C., Printzenhoff, D.M., Prime, R.L., Stockbridge, G., Kirkup, A.J., Bannon, A.W., England, S., Chapman, M.L., Bagal, S., Roeloffs, R., Anand, U., Anand, P., Bungay, P.J., Kemp, M., Butt, R.P., Stevens, E.B., 2015. A novel selective and orally bioavailable Nav1.8 channel blocker, PF-01247324, attenuates nociception and sensory neuron excitability. *British Journal of Pharmacology* 172, 2654–2670. <https://doi.org/10.1111/bph.13092>

Pedemonte, N., Galletta, L.J.V., 2014. Structure and Function of TMEM16 Proteins (Anoctamins). *Physiological Reviews* 94, 419–459. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2011>

Pérez, G.J., Bonev, A.D., Patlak, J.B., Nelson, M.T., 1999. Functional Coupling of Ryanodine Receptors to K_{Ca} Channels in Smooth Muscle Cells from Rat Cerebral Arteries. *J Gen Physiol* 113, 229–238.

Platoshyn, O., Remillard, C.V., Fantozzi, I., Sison, T., Yuan, J.X.-J., 2005. Identification of functional voltage-gated Na⁽⁺⁾ channels in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 451, 380–387. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1478-3>

Poburko, D., Fameli, N., Kuo, K.-H., van Breemen, C., 2008. Ca²⁺ signaling in smooth muscle: TRPC6, NCX, and LNats in nanodomains. *Channels* 2, 10–12. <https://doi.org/10.4161/chan.2.1.6053>

Quayle, J.M., Nelson, M.T., Standen, N.B., 1997. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiological Reviews* 77, 1165–1232. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.4.1165>

Quignard, J.-F., Félétou, M., Edwards, G., Duhault, J., Weston, A.H., Vanhoutte, P.M., 2000. Role of endothelial cell hyperpolarization in EDHF-mediated responses in the guinea-pig carotid artery. *British Journal of Pharmacology* 129, 1103–1112. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703175>

Quignard, J.F., Ryckwaert, F., Albat, B., Nargeot, J., Richard, S., 1997. A novel tetrodotoxin-sensitive Na⁺ current in cultured human coronary myocytes. *Circ. Res.* 80, 377–382.

Quinn, K.V., Giblin, J.P., Tinker, A., 2004. Multisite Phosphorylation Mechanism for Protein Kinase A Activation of the Smooth Muscle ATP-Sensitive K⁺ Channel. *Circulation Research* 94, 1359–1366. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000128513.34817.c4>

Ranade, S.S., Qiu, Z., Woo, S.-H., Hur, S.S., Murthy, S.E., Cahalan, S.M., Xu, J., Mathur, J., Bandell, M., Coste, B., Li, Y.-S.J., Chien, S., Patapoutian, A., 2014. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *PNAS* 111, 10347–10352. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409233111>

Reading, S.A., Earley, S., Waldron, B.J., Welsh, D.G., Brayden, J.E., 2005. TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 288, H2055–H2061. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00861.2004>

Reese, K.A., Caldwell, J.H., 1999. Immunocytochemical localization of NaCh6 in cultured spinal cord astrocytes. *Glia* 26, 92–96. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199903\)26:1<92::aid-glia10>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199903)26:1<92::aid-glia10>3.0.co;2-4)

Rice, Frank L., Albrecht, P.J., Wymer, J.P., Black, J.A., Merkies, I.S., Faber, C.G., Waxman, S.G., 2015. Sodium channel Nav1.7 in vascular myocytes, endothelium, and innervating axons in human skin. *Mol Pain* 11, 26. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0024-3>

Rice, Frank L., Albrecht, P.J., Wymer, J.P., Black, J.A., Merkies, I.S., Faber, C.G., Waxman, S.G., 2015. Sodium Channel Nav1.7 in Vascular Myocytes, Endothelium, and Innervating Axons in Human Skin. *Molecular Pain* 11, s12990-015-0024. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0024-3>

Rode, B., Shi, J., Endesh, N., Drinkhill, M.J., Webster, P.J., Lotteau, S.J., Bailey, M.A., Yuldasheva, N.Y., Ludlow, M.J., Cubbon, R.M., Li, J., Futers, T.S., Morley, L., Gaunt, H.J., Marszalek, K., Viswambharan, H., Cuthbertson, K., Baxter, P.D., Foster, R., Sukumar, P., Weightman, A., Calaghan, S.C., Wheatcroft, S.B., Kearney, M.T., Beech, D.J., 2017. Piezo1 channels sense whole body physical activity to reset cardiovascular homeostasis and enhance performance. *Nature Communications* 8, 350. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00429-3>

Roger, S., Besson, P., Le Guennec, J.-Y., 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion

capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1616, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.07.001>

Roloff, E. v. L., Tomiak-Baquero, A.M., Kasparov, S., Paton, J.F.R., 2016. Parasympathetic innervation of vertebrobasilar arteries: is this a potential clinical target? *J Physiol* 594, 6463–6485. <https://doi.org/10.1113/JP272450>

Rosenfeld, M.G., Mermoud, J.-J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., Evans, R.M., 1983. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304, 129–135. <https://doi.org/10.1038/304129a0>

Rubanyi, G.M., Polokoff, M.A., 1994. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46, 325–415.

Rugiero, F., Mistry, M., Sage, D., Black, J.A., Waxman, S.G., Crest, M., Clerc, N., Delmas, P., Gola, M., 2003. Selective Expression of a Persistent Tetrodotoxin-Resistant Na⁺ Current and NaV1.9 Subunit in Myenteric Sensory Neurons. *J. Neurosci.* 23, 2715–2725. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02715.2003>

Saleh, S., Yeung, S.Y.M., Prestwich, S., Pucovsky, V., Greenwood, I., 2005. Electrophysiological and molecular identification of voltage-gated sodium channels in murine vascular myocytes. *The Journal of Physiology* 568, 155–169. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.090951>

Sander Mikael, Chavoshan Bahman, Victor Ronald G., 1999. A Large Blood Pressure-Raising Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibition in Humans. *Hypertension* 33, 937–942. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.33.4.937>

Sanders, S.J., Campbell, A.J., Cottrell, J.R., Moller, R.S., Wagner, F.F., Aldridge, A.L., Bernier, R.A., Catterall, W.A., Chung, W.K., Empfield, J.R., George, A.L., Hipp, J.F., Khwaja, O., Kiskinis, E., Lal, D., Malhotra, D., Millichap, J.J., Otis, T.S., Petrou, S., Pitt, G., Schust, L.F., Taylor, C.M., Tjernagel, J., Spiro, J.E., Bender, K.J., 2018. Progress in Understanding and Treating SCN2A-Mediated Disorders. *Trends in Neurosciences* 41, 442–456. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.03.011>

Sandow Shaun L., Tare Marianne, Coleman Harold A., Hill Caryl E., Parkington Helena C., 2002. Involvement of Myoendothelial Gap Junctions in the Actions of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Circulation Research* 90, 1108–1113. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000019756.88731.83>

Santos-Gomes, J., Le Ribeuz, H., Brás-Silva, C., Antigny, F., Adão, R., 2022. Role of Ion Channel Remodeling in Endothelial Dysfunction Induced by Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomolecules* 12, 484. <https://doi.org/10.3390/biom12040484>

Schep, L.J., Schmierer, D.M., Fountain, J.S., 2006. Veratrum Poisoning: *Toxicological Reviews* 25, 73–78. <https://doi.org/10.2165/00139709-200625020-00001>

Schiffrin, E.L., 2004. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens* 17, 1192–1200. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.05.023>

Schneider, J.-C., El Kebir, D., Chéreau, C., Mercier, J.-C., Dall'Ava-Santucci, J., Dinh-Xuan, A.T., 2002. Involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 283, H837–H844. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00789.2001>

Schubert, R., Serebryakov, V.N., Mewes, H., Hopp, H.H., 1997. Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 272, H1147–1156. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.3.H1147>

Seale, J.T., McDougal, O.M., 2022. Veratrum parviflorum: An Underexplored Source for Bioactive Steroidal Alkaloids. *Molecules* 27, 5349. <https://doi.org/10.3390/molecules27165349>

Seasholtz, T.M., Majumdar, M., Brown, J.H., 1999. Rho as a Mediator of G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Mol Pharmacol* 55, 949–956. <https://doi.org/10.1124/mol.55.6.949>

Seki, T., Goto, K., Kiyohara, K., Kansui, Y., Murakami, N., Haga, Y., Ohtsubo, T., Matsumura, K., Kitazono, T., 2017. Downregulation of Endothelial Transient Receptor Potential Vanilloid Type 4 Channel and Small-Conductance of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Underpins Impaired Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Hypertension. *Hypertension* 69, 143–

153. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07110>

Sellers, M.M., Stallone, J.N., 2008. Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294, H1978–H1986. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01318.2007>

Severino, P., D'Amato, A., Pucci, M., Infusino, F., Birtolo, L.I., Mariani, M.V., Lavalle, C., Maestrini, V., Mancone, M., Fedele, F., 2020. Ischemic Heart Disease and Heart Failure: Role of Coronary Ion Channels. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 3167. <https://doi.org/10.3390/ijms21093167>

Shattock, M.J., Ottolia, M., Bers, D.M., Blaustein, M.P., Boguslavskyi, A., Bossuyt, J., Bridge, J.H.B., Chen-Izu, Y., Clancy, C.E., Edwards, A., Goldhaber, J., Kaplan, J., Lingrel, J.B., Pavlovic, D., Philipson, K., Sipido, K.R., Xie, Z.-J., 2015. Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *The Journal of Physiology* 593, 1361–1382. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282319>

Shelly, D.A., He, S., Moseley, A., Weber, C., Stegemeyer, M., Lynch, R.M., Lingrel, J., Paul, R.J., 2004. Na⁺ pump α -isoform specifically couples to contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-targeted neonatal mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286, C813–C820. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2003>

Shinjoh, M., Nakaki, T., Otsuka, Y., Sasakawa, N., Kato, R., 1991. Vascular smooth muscle contraction induced by Na⁺ channel activators, veratridine and batrachotoxin. *Eur. J. Pharmacol.* 205, 199–202.

Sim, M.K., Manjeet, S., 1990. Properties of muscarinic receptors mediating second messenger responses in the rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 189, 399–404. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(90\)90037-x](https://doi.org/10.1016/0922-4106(90)90037-x)

Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T., 2004. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* 56, 387–437. <https://doi.org/10.1124/pr.56.3.3>

Skofic Maurer, D., Zabini, D., Nagaraj, C., Sharma, N., Lengyel, M., Nagy, B.M., Frank, S., Klepetko, W., Gschwandtner, E., Enyedi, P., Kwapiszewska, G., Olschewski, H., Olschewski, A., 2020. Endothelial Dysfunction Following Enhanced TMEM16A Activity in Human Pulmonary Arteries. *Cells* 9, 1984. <https://doi.org/10.3390/cells9091984>

Smith, R.S., Kenny, C.J., Ganesh, V., Jang, A., Borges-Monroy, R., Partlow, J.N., Hill, R.S., Shin, T., Chen, A.Y., Doan, R.N., Anttonen, A.-K., Ignatius, J., Medne, L., Bönnemann, C.G., Hecht, J.L., Salonen, O., Barkovich, A.J., Poduri, A., Wilke, M., de Wit, M.C.Y., Mancini, G.M.S., Sztriha, L., Im, K., Amrom, D., Andermann, E., Paetau, R., Lehesjoki, A.-E., Walsh, C.A., Lehtinen, M.K., 2018. Sodium Channel SCN3A (NaV1.3) Regulation of Human Cerebral Cortical Folding and Oral Motor Development. *Neuron* 99, 905–913.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.052>

Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Pacaud, P., Loirand, G., 2000. Cyclic GMP-dependent Protein Kinase Signaling Pathway Inhibits RhoA-induced Ca²⁺ Sensitization of Contraction in Vascular Smooth Muscle*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 21722–21729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000753200>

Sobey, C.G., Faraci, F.M., 1999. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacol* 126, 1437–1443. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702439>

Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 2000. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *The Journal of Physiology* 522, 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00177.x>

Sonkusare, S.K., Bonev, A.D., Ledoux, J., Liedtke, W., Kotlikoff, M.I., Heppner, T.J., Hill-Eubanks, D.C., Nelson, M.T., 2012. Elementary Ca²⁺ Signals Through Endothelial TRPV4 Channels Regulate Vascular Function. *Science* 336, 597–601. <https://doi.org/10.1126/science.1216283>

Sonkusare, S.K., Dalsgaard, T., Bonev, A.D., Hill-Eubanks, D.C., Kotlikoff, M.I., Scott, J.D., Santana, L.F., Nelson, M.T., 2014. AKAP150-dependent cooperative TRPV4 channel gating is central to endothelium-dependent vasodilation and is disrupted in hypertension. *Sci Signal* 7, ra66. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005052>

Standen, N., 2003. KATP Channels in Vascular Smooth Muscle: Structure, Regulation and Functional Roles. *Journal of*

Clinical and Basic Cardiology 6, 7–14.

Stevens, M., Peigneur, S., Tytgat, J., 2011. Neurotoxins and Their Binding Areas on Voltage-Gated Sodium Channels. *Frontiers in Pharmacology* 2.

Straub, A.C., Zeigler, A.C., Isakson, B.E., 2014. The Myoendothelial Junction: Connections That Deliver the Message. *Physiology* 29, 242–249. <https://doi.org/10.1152/physiol.00042.2013>

Strege, P.R., Mercado-Perez, A., Mazzone, A., Saito, Y.A., Bernard, C.E., Farrugia, G., Beyder, A., 2019. *SCN5A* mutation G615E results in Na^+ 1.5 voltage-gated sodium channels with normal voltage-dependent function yet loss of mechanosensitivity. *Channels* 13, 287–298. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1632670>

Sturek, M., Hermsmeyer, K., 1986. Calcium and sodium channels in spontaneously contracting vascular muscle cells. *Science* 233, 475–478. <https://doi.org/10.1126/science.2425434>

Sturtzel, C., 2017. Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol* 1003, 71–91. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_4

Sundivakkam, P.C., Freichel, M., Singh, V., Yuan, J.P., Vogel, S.M., Flockerzi, V., Malik, A.B., Tirupathi, C., 2012. The Ca^{2+} Sensor Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) Is Necessary and Sufficient for the Store-Operated Ca^{2+} Entry Function of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) 1 and 4 Channels in Endothelial Cells. *Mol Pharmacol* 81, 510–526. <https://doi.org/10.1124/mol.111.074658>

Sung, D.J., Noh, H.J., Kim, J.G., Park, S.W., Kim, B., Cho, H., Bae, Y.M., 2013. Serotonin contracts the rat mesenteric artery by inhibiting 4-aminopyridine-sensitive Kv channels via the 5-HT_{2A} receptor and Src tyrosine kinase. *Exp Mol Med* 45, e67. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.116>

Svenningsen, P., Andersen, K., Thuesen, A.D., Shin, H.-S., Vanhoutte, P.M., Skøtt, O., Jensen, B.L., Hill, C., Hansen, P.B.L., 2014. T-type Ca^{2+} channels facilitate NO-formation, vasodilatation and NO-mediated modulation of blood pressure. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 466, 2205–2214. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1492-4>

Syed, A.U., Le, T., Navedo, M.F., Nieves-Cintrón, M., 2019a. Ion Channels and Their Regulation in Vascular Smooth Muscle. *Basic and Clinical Understanding of Microcirculation*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88962>

Syed, A.U., Le, T., Navedo, M.F., Nieves-Cintrón, M., 2019b. Ion Channels and Their Regulation in Vascular Smooth Muscle. *Basic and Clinical Understanding of Microcirculation*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88962>

Taylor, A., Cooper, D., Granger, D.N., 2005. Platelet–Vessel Wall Interactions in the Microcirculation. *Microcirculation* 12, 275–285. <https://doi.org/10.1080/10739680590925691>

Talwar, D., Hammer, M.F., 2021. *SCN8A* Epilepsy, Developmental Encephalopathy, and Related Disorders. *Pediatric Neurology* 122, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2021.06.011>

Tangsucharit, P., Takatori, S., Sun, P., Zamami, Y., Goda, M., Pakdeechote, P., Takayama, F., Kawasaki, H., 2012. Do cholinergic nerves innervating rat mesenteric arteries regulate vascular tone? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303, R1147–R1156. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00317.2012>

Taylor, M.S., Bonev, A.D., Gross, T.P., Eckman, D.M., Brayden, J.E., Bond, C.T., Adelman, J.P., Nelson, M.T., 2003. Altered expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ. Res.* 93, 124–131. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000081980.63146.69>

Teubl, M., Groschner, K., Kohlwein, S.D., Mayer, B., Schmidt, K., 1999. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange Facilitates Ca^{2+} -dependent Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 29529–29535. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29529>

Toda, N., Okamura, T., 2015. Recent advances in research on nitrgergic nerve-mediated vasodilatation. *Pflugers Arch* 467, 1165–1178. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1621-0>

Tomioka, H., Hattori, Y., Fukao, M., Sato, A., Liu, M.-Y., Sakuma, I., Kitabatake, A., Kanno, M., 1999. Relaxation in Different-Sized Rat BloodVessels Mediated by Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Importance of Processes Mediating Precontractions. *JVR* 36, 311–320. <https://doi.org/10.1159/000025659>

Touyz, R.M., He, G., El Mabrouk, M., Schiffrin, E.L., 2001. p38 MAP Kinase Regulates Vascular Smooth Muscle Cell

Collagen Synthesis by Angiotensin II in SHR But Not in WKY. *Hypertension* 37, 574–580. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.37.2.574>

Traub, O., Ishida, T., Ishida, M., Tupper, J.C., Berk, B.C., 1999. Shear Stress-mediated Extracellular Signal-regulated Kinase Activation Is Regulated by Sodium in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 20144–20150. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20144>

Tykocki, N.R., Boerman, E.M., Jackson, W.F., 2017. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 485–581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>

Uchida, Y., Nakamura, F., Tomaru, T., Sumino, S., Kato, A., Sugimoto, T., 1986. Phasic contractions of canine and human coronary arteries induced by potassium channel blockers. *Jpn Heart J* 27, 727–740. <https://doi.org/10.1536/ihj.27.727>

Ulbricht, W., 1998. Effects of veratridine on sodium currents and fluxes, in: *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Volume 133. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–54. <https://doi.org/10.1007/Bfb0000612>

Ulyanova, A.V., Shirokov, R.E., 2018. Voltage-dependent inward currents in smooth muscle cells of skeletal muscle arterioles. *PLOS ONE* 13, e0194980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194980>

VanBavel, E., Sorop, O., Andreasen, D., Pfaffendorf, M., Jensen, B.L., 2002. Role of T-type calcium channels in myogenic tone of skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2239–2243. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00531.2002>

Verkerk, A.O., Remme, C.A., Schumacher, C.A., Scicluna, B.P., Wolswinkel, R., de Jonge, B., Bezzina, C.R., Veldkamp, M.W., 2012. Functional NaV1.8 Channels in Intracardiac Neurons. *Circulation Research* 111, 333–343. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.274035>

Verkhatsky, A., Trebak, M., Perocchi, F., Khananshvil, D., Sekler, I., 2018. Crosslink between calcium and sodium signalling. *Experimental Physiology* 103, 157–169. <https://doi.org/10.1113/EP086534>

Vinet, R., Vargas, F.F., 1999. L- and T-type voltage-gated Ca²⁺ currents in adrenal medulla endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 276, H1313–H1322. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.4.H1313>

Virsolvy, A., Farah, C., Pertuit, N., Kong, L., Lacampagne, A., Reboul, C., Aimond, F., Richard, S., 2015. Antagonism of Na_v channels and α₁-adrenergic receptors contributes to vascular smooth muscle effects of ranolazine. *Scientific Reports* 5, 17969. <https://doi.org/10.1038/srep17969>

Virsolvy, A., Fort, A., Erceau, L., Charrabi, A., Hayot, M., Aimond, F., Richard, S., 2021. Hypoxic Conditions Promote Rhythmic Contractile Oscillations Mediated by Voltage-Gated Sodium Channels Activation in Human Arteries. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 2570. <https://doi.org/10.3390/ijms22052570>

Walsh, K.B., Wolf, M.B., Fan, J., 1998. Voltage-gated sodium channels in cardiac microvascular endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 274, H506–H512. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.2.H506>

Wang, H., Lin, L., Jiang, J., Wang, Y., Lu, Z.Y., Bradbury, J.A., Lih, F.B., Wang, D.W., Zeldin, D.C., 2003. Up-Regulation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase by Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Involves Mitogen-Activated Protein Kinase and Protein Kinase C Signaling Pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 307, 753–764. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.052787>

Wang, S., Chennupati, R., Kaur, H., Iring, A., Wettschureck, N., Offermanns, S., 2016. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. *J Clin Invest* 126, 4527–4536. <https://doi.org/10.1172/JCI87343>

Wang, S., Iring, A., Strilic, B., Juárez, J.A., Kaur, H., Troidl, K., Tonack, S., Burbiel, J.C., Müller, C.E., Fleming, I., Lundberg, J.O., Wettschureck, N., Offermanns, S., 2015. P2Y₂ and G_q/G₁₁ control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. *J Clin Invest* 125, 3077–3086. <https://doi.org/10.1172/JCI81067>

Wang, S.-Y., Wang, G.K., 2003. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins.

Cellular Signalling 15, 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00085-2)

Warner, T.D., de Nucci, G., Vane, J.R., 1989. Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. *European Journal of Pharmacology* 159, 325–326. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90167-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90167-2)

Waxman, S.G., 2013. Painful Na-channelopathies: an expanding universe. *Trends in Molecular Medicine* 19, 406–409. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.003>

Welsh, D.G., Morielli, A.D., Nelson, M.T., Brayden, J.E., 2002. Transient Receptor Potential Channels Regulate Myogenic Tone of Resistance Arteries. *Circulation Research* 90, 248–250. <https://doi.org/10.1161/hh0302.105662>

Westcott, E.B., Goodwin, E.L., Segal, S.S., Jackson, W.F., 2012. Function and expression of ryanodine receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in smooth muscle cells of murine feed arteries and arterioles. *J Physiol* 590, 1849–1869. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.222083>

Weston, A., Porter, E., Harno, E., Edwards, G., 2010. Impairment of endothelial SKCa channels and of downstream hyperpolarizing pathways in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology* 160, 836–843. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00657.x>

Wilde, A.A.M., Brugada, R., Priori, S., 2011. Phenotypical Manifestations of Mutations in the Genes Encoding Subunits of the Cardiac Sodium Channel. *Circulation Research* 108, 884–897. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.238469>

Wisedchaisri, G., Gamal El-Din, T.M., 2022. Druggability of Voltage-Gated Sodium Channels—Exploring Old and New Drug Receptor Sites. *Frontiers in Pharmacology* 13.

Wood, J.N., Iseppon, F., 2018. Sodium channels. *Brain Neurosci Adv* 2, 2398212818810684. <https://doi.org/10.1177/2398212818810684>

Wu, C.C., Chen, S.J., Garland, C.J., 2004. NO and KATP channels underlie endotoxin-induced smooth muscle hyperpolarization in rat mesenteric resistance arteries. *Br J Pharmacol* 142, 479–484. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705794>

Wu, L.-J., Sweet, T.-B., Clapham, D.E., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacol Rev* 62, 381–404. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>

Wu, M.-M., Lou, J., Song, B.-L., Gong, Y.-F., Li, Y.-C., Yu, C.-J., Wang, Q.-S., Ma, T.-X., Ma, K., Hartzell, H.C., Duan, D.D., Zhao, D., Zhang, Z.-R., 2014. Hypoxia augments the calcium-activated chloride current carried by anoctamin-1 in cardiac vascular endothelial cells of neonatal mice. *British Journal of Pharmacology* 171, 3680–3692. <https://doi.org/10.1111/bph.12730>

Wu, X., Davis, M.J., 2001. Characterization of stretch-activated cation current in coronary smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 280, H1751–H1761. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1751>

Wu, X., Haystead, T.A.J., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P., 1998. Acceleration of Myosin Light Chain Dephosphorylation and Relaxation of Smooth Muscle by Telokin: SYNERGISM WITH CYCLIC NUCLEOTIDE-ACTIVATED KINASE*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11362–11369. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11362>

Xiao, Z., Zhang, Z., Diamond, S.L., 1997. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *Journal of Cellular Physiology* 171, 205–211. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199705\)171:2<205::AID-JCP11>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199705)171:2<205::AID-JCP11>3.0.CO;2-C)

Xu, S.-Z., Boulay, G., Flemming, R., Beech, D.J., 2006. E3-targeted anti-TRPC5 antibody inhibits store-operated calcium entry in freshly isolated pial arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 291, H2653–H2659. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00495.2006>

Yamamoto, Y., Suzuki, H., 2007. Effects of Increased Intracellular Cl⁻ Concentration on Membrane Responses to Acetylcholine in the Isolated Endothelium of Guinea Pig Mesenteric Arteries. *J. Physiol. Sci* 57, 31–41. <https://doi.org/10.2170/physiolsci.RP012606>

Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R.P., Richardson, J.A., Williams, S.C., Clouthier, D.E., de Wit, D., Emoto, N., Hammer, R.E., 1998. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of

endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* 125, 825–836.

Yang, M., Kozminski, D.J., Wold, L.A., Modak, R., Calhoun, J.D., Isom, L.L., Brackenbury, W.J., 2012. Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 134, 603–615. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2102-9>

Yang, Y., Wang, Y., Li, S., Xu, Z., Li, H., Ma, L., Fan, J., Bu, D., Liu, B., Fan, Z., Wu, G., Jin, J., Ding, B., Zhu, X., Shen, Y., 2004. Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia. *J Med Genet* 41, 171–174. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.012153>

Yao, X., Garland, C.J., 2005. Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res* 97, 853–863. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000187473.85419.3e>

Yildirim, S., Altun, S., Gumushan, H., Patel, A., Djamgoz, M.B.A., 2012. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer Letters* 323, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.036>

Yin, R., Liu, D., Chhoa, M., Li, C.-M., Luo, Y., Zhang, M., Lehto, S.G., Immke, D.C., Moyer, B.D., 2016. Voltage-gated sodium channel function and expression in injured and uninjured rat dorsal root ganglia neurons. *International Journal of Neuroscience* 126, 182–192. <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1004172>

Yokomizo, A., Takatori, S., Hashikawa-Hobara, N., Goda, M., Kawasaki, H., 2015. Characterization of Perivascular Nerve Distribution in Rat Mesenteric Small Arteries. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 38, 1757–1764. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00461>

Yu, F.H., Catterall, W.A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* 7.

Yuill, K.H., Yarova, P., Kemp-Harper, B.K., Garland, C.J., Dora, K.A., 2011. A Novel Role for HNO in Local and Spreading Vasodilatation in Rat Mesenteric Resistance Arteries. *Antioxid Redox Signal* 14, 1625–1635. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3279>

Zaharieva, I., Thor, M., Oates, E., Karnebeek, C., Kamsteeg, E., Hartley, L., Blom, E., Witting, N., Rasmussen, M., Gabbett, M., Ravenscroft, G., Hanna, M., Ruben, P., Lewis, S., Mannikko, R., Muntoni, F., 2015. Recessive loss-of-function SCN4A mutations associated with a novel phenotype of congenital myopathy. *Neuromuscular Disorders* 25, S275–S276. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.06.324>

Zhang, D.X., Mendoza, S.A., Bubolz, A.H., Mizuno, A., Ge, Z.-D., Li, R., Warltier, D.C., Suzuki, M., Gutterman, D.D., 2009. Transient Receptor Potential Vanilloid Type 4–Deficient Mice Exhibit Impaired Endothelium-Dependent Relaxation Induced by Acetylcholine In Vitro and In Vivo. *Hypertension* 53, 532–538. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.127100>

Zhang, J., 2013. New insights into the contribution of arterial NCX to the regulation of myogenic tone and blood pressure. *Adv Exp Med Biol* 961, 329–343. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4756-6_28

Zhang, J., Lee, M.Y., Cavalli, M., Chen, L., Berra-Romani, R., Balke, C.W., Bianchi, G., Ferrari, P., Hamlyn, J.M., Iwamoto, T., Lingrel, J.B., Matteson, D.R., Wier, W.G., Blaustein, M.P., 2005. Sodium pump $\alpha 2$ subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *The Journal of Physiology* 569, 243–256. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.091801>

Zhang, J., Ren, C., Chen, L., Navedo, M.F., Antos, L.K., Kinsey, S.P., Iwamoto, T., Philipson, K.D., Kotlikoff, M.I., Santana, L.F., Wier, W.G., Matteson, D.R., Blaustein, M.P., 2010. Knockout of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in smooth muscle attenuates vasoconstriction and L-type Ca²⁺ channel current and lowers blood pressure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 298, H1472–H1483. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00964.2009>

Zhang, L., Staehr, C., Zeng, F., Bouzinova, E.V., Matchkov, V.V., 2019. The Na,K-ATPase in vascular smooth muscle cells, in: *Current Topics in Membranes*. Elsevier, pp. 151–175. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2019.01.007>

Zsiros, E., Kis-Toth, K., Hajdu, P., Gaspar, R., Bielanska, J., Felipe, A., Rajnavolgyi, E., Panyi, G., 2009. Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells. *J Immunol* 183, 4483–4492. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803003>

Zulian, A., Baryshnikov, S.G., Linde, C.I., Hamlyn, J.M., Ferrari, P., Golovina, V.A., 2010. Upregulation of Na⁺/Ca²⁺

exchanger and TRPC6 contributes to abnormal Ca²⁺ homeostasis in arterial smooth muscle cells from Milan hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 299, H624–H633.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00356.2010>

Annexe



Article

Partial Agonist Activity of Neonicotinoids on Rat Nicotinic Receptors: Consequences over Epinephrine Secretion and In Vivo Blood Pressure

Joohee Park ¹, Antoine Taly ², Jennifer Bourreau ¹, Frédéric De Nardi ¹, Claire Legendre ¹, Daniel Henrion ¹, Nathalie C. Guérineau ^{1,3}, Christian Legros ¹, César Mattei ^{1,*} and Hélène Tricoire-Leignel ^{1,*}

- ¹ University of Angers, INSERM U1083, CNRS UMR 6015, MITOVASC, SFR ICAT, 49000 Angers, France; joohee.park@univ-angers.fr (J.P.); jennifer.bourreau@inserm.fr (J.B.); frederic.denardi@gmx.fr (F.D.N.); claire.legendre@univ-angers.fr (C.L.); daniel.henrion@univ-angers.fr (D.H.); Nathalie.Guerineau@igf.cnrs.fr (N.C.G.); christian.legros@univ-angers.fr (C.L.)
- ² Theoretical Biochemistry Laboratory, Institute of Physico-Chemical Biology, CNRS UPR 9080, University of Paris Diderot Sorbonne Paris Cité, 75005 Paris, France; antoine.taly@ibpc.fr
- ³ IGF, University of Montpellier, CNRS, INSERM, 34000 Montpellier, France
- * Correspondence: cesar.mattei@univ-angers.fr (C.M.); helene.tricoire-leignel@univ-angers.fr (H.T.-L.)
- † C.M. and H.T.-L. jointly supervised.



Citation: Park, J.; Taly, A.; Bourreau, J.; De Nardi, F.; Legendre, C.; Henrion, D.; Guérineau, N.C.; Legros, C.; Mattei, C.; Tricoire-Leignel, H. Partial Agonist Activity of Neonicotinoids on Rat Nicotinic Receptors: Consequences over Epinephrine Secretion and In Vivo Blood Pressure. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5106. <https://doi.org/10.3390/ijms22105106>

Academic Editor: Steeve Hervé Thany

Received: 30 March 2021
Accepted: 6 May 2021
Published: 12 May 2021

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



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

Abstract: Neonicotinoid insecticides are nicotine-derived molecules which exert acute neurotoxic effects over the insect central nervous system by activating nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). However, these receptors are also present in the mammalian central and peripheral nervous system, where the effects of neonicotinoids are faintly known. In mammals, cholinergic synapses are crucial for the control of vascular tone, blood pressure and skeletal muscle contraction. We therefore hypothesized that neonicotinoids could affect cholinergic networks in mammals and sought to highlight functional consequences of acute intoxication in rats with sub-lethal concentrations of the highly used acetamiprid (ACE) and clothianidin (CLO). In this view, we characterized their electrophysiological effects on rat $\alpha 3\beta 4$ nAChRs, knowing that it is predominantly expressed in ganglia of the vegetative nervous system and the adrenal medulla, which initiates catecholamine secretion. Both molecules exhibited a weak agonist effect on $\alpha 3\beta 4$ receptors. Accordingly, their influence on epinephrine secretion from rat adrenal glands was also weak at 100 μ M, but it was stronger at 500 μ M. Challenging ACE or CLO together with nicotine (NIC) ended up with paradoxical effects on secretion. In addition, we measured the rat arterial blood pressure (ABP) in vivo by arterial catheterization. As expected, NIC induced a significant increase in ABP. ACE and CLO did not affect the ABP in the same conditions. However, simultaneous exposure of rats to both NIC and ACE/CLO promoted an increase of ABP and induced a biphasic response. Modeling the interaction of ACE or CLO on $\alpha 3\beta 4$ nAChR is consistent with a binding site located in the agonist pocket of the receptor. We present a transversal experimental approach of mammal intoxication with neonicotinoids at different scales, including in vitro, ex vivo, in vivo and in silico. It paves the way of the acute and chronic toxicity for this class of insecticides on mammalian organisms

Keywords: neonicotinoids; acetamiprid; clothianidin; $\alpha 3\beta 4$ nAChR; epinephrine secretion; blood pressure; nicotine; acute intoxication

1. Introduction

Since their introduction on the agrochemical market three decades ago, neonicotinoid insecticides are applied on a wide range of crops in 120 countries thanks to: (i) their efficacy against many pest insects; and (ii) their predicted lower mammalian toxicity [1–4]. Their application in seed-coating due to their systemic properties shifted production and sales towards large scale and led to them being an obvious choice for field crops such as maize, cotton and soybean throughout the world [2,5]. However, several limitations to their

use have emerged over the past fifteen years regarding environmental issues [6,7]. In addition to being highly toxic to non-target insects such as pollinators, they are persistent in soil and water, where their half-life reaches up to 1000 days [8–10]. They have been claimed to be insect-selective, but recent studies have shown that vertebrates are also affected by sublethal concentrations of these compounds (see reviews [11–13]). Thus, some neonicotinoids cause alterations in reproductive function and abnormal embryonic development in birds [14–17]. Aquatic animals such as amphibians and fish also appear to be exposed and affected by these molecules [18–20]. Neonicotinoids have also been shown to cause a wide range of neurobehavioral effects in mammals [21–23] and exert endocrine disruption in deer exposed to field-relevant doses [24]. Thus, there are reasons for concern about neonicotinoid toxicity in vertebrate animals and humans, due to a broad mode of action: they target nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), present in both vertebrates and invertebrates [25]. The data of high concern are the detection of these insecticides and their metabolites in regularly eaten food such as apples, oranges, potatoes, cucumbers and honey [26–28]. Hence, their persistence in the environment and their presence in food significantly increase the probability of human exposures, as confirmed by urine detection [29,30] with deleterious effects on the human health [6,28]. Among health issues, acute intoxications with neonicotinoids are correlated with alteration of cardiovascular parameters such as arterial blood pressure (ABP) and heart rate [31,32].

Neonicotinoid synthesis uses nicotine (NIC)–or nithiazine–as a molecular template (Figure 1). NIC is an alkaloid extracted from tobacco and mainly contributes to smoking-induced cardiovascular diseases [33]. Indeed, NIC releases epinephrine from the adrenal medullary tissue by activating nAChRs of the sympathetic nervous system, which acutely increases myocardial contraction and vasoconstriction. Then, heart rate and ABP increase as much as 10–15 bpm and 5–10 mmHg in human, respectively [34]. The main hypertensive effects of NIC have been shown to be mediated through the activation of $\alpha3\beta4$ nAChRs. The $\alpha3\beta4$ antagonist hexamethonium (HEX) selectively inhibits the NIC-induced ABP increase [35]. We therefore considered that the main effect of NIC on ABP occurs through the $\alpha3\beta4$ nicotinic receptor which might be the main target of neonicotinoids. To address this hypothesis, we focused on two neonicotinoid compounds (Figure 1): clothianidin (CLO), no longer approved in the EU for seed treatment but very persistent in soil (half degradation time DT_{50} range 143–1001 days), and acetamiprid (ACE), which is still approved for orchards and non-persistent in soil (DT_{50} range 0.8–5.4 days) [36–39]. We evaluated the acute effects of both insecticides on rat nAChR currents, epinephrine secretion from adrenal medulla and rat systemic blood pressure. In addition, we built a docking model of ACE and CLO on $\alpha3\beta4$ nAChRs. Our study highlights the acute effects of neonicotinoids on mammal physiology and underlines the deleterious consequences they might exert chronically.

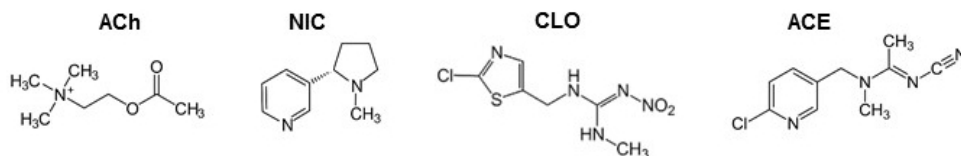


Figure 1. Molecular structures of acetylcholine (ACh), nicotine (NIC) and the neonicotinoids clothianidin (CLO) and acetamiprid (ACE). NIC, the molecular template of most neonicotinoids, is protonated at physiological pH, whereas CLO and ACE possess an electronegative nitro- and cyano- functional group, respectively [25].

2. Results

2.1. Effect of Neonicotinoids on ACh-Evoked Cholinergic Currents

Xenopus oocytes were injected with $\alpha3$ and $\beta4$ subunit RNAs (1:1) to express the functional corresponding receptors. They were challenged with increasing concentrations of each ligand (Figure 2A). CLO and ACE could not be used at concentrations upper than

20 μM . Shown are the dose–response curves. As the natural neurotransmitter, ACh activated $\alpha 3\beta 4$ receptors in a concentration-dependent manner, with an $\text{EC}_{50} = 8.43 \pm 0.22 \mu\text{M}$ (Figure 2B). Hexamethonium (HEX), a non-competitive $\alpha 3\beta 4$ nAChR antagonist [40], inhibited ACh-induced currents (Figure 2B, inset). As a classical agonist of nAChRs, NIC activated $\alpha 3\beta 4$ receptors with an $\text{EC}_{50} = 4.62 \pm 0.22 \mu\text{M}$. As expected, ACh and NIC exerted a comparable agonist effect on rat $\alpha 3\beta 4$ receptors expressed in *Xenopus* oocytes. We then challenged $\alpha 3\beta 4$ subunits-expressing oocytes to increasing concentrations of ACE or CLO. In our hands, both compounds acted as partial agonists, since the currents recorded were significantly smaller than ACh- or NIC-evoked currents (CLO: $\text{EC}_{50} = 8.39 \pm 0.77 \text{ mM}$; ACE: $\text{EC}_{50} = 0.130 \pm 0.017 \text{ M}$). Together, our data show that neonicotinoids are weak agonists of rat $\alpha 3\beta 4$ nAChRs expressed in *Xenopus* oocytes (Figure 2C). In addition, the electrophysiological effects of neonicotinoids on mammalian nAChRs are shown in Table S3. They act as weak agonists of human $\alpha 4\beta 2$ receptors, and strong agonists of rat $\alpha 7$ receptors [41,42]. Different nAChR subtypes are then possibly targeted by neonicotinoids. We restricted our study to the $\alpha 3\beta 4$ receptor because of its crucial role in the peripheral nervous system.

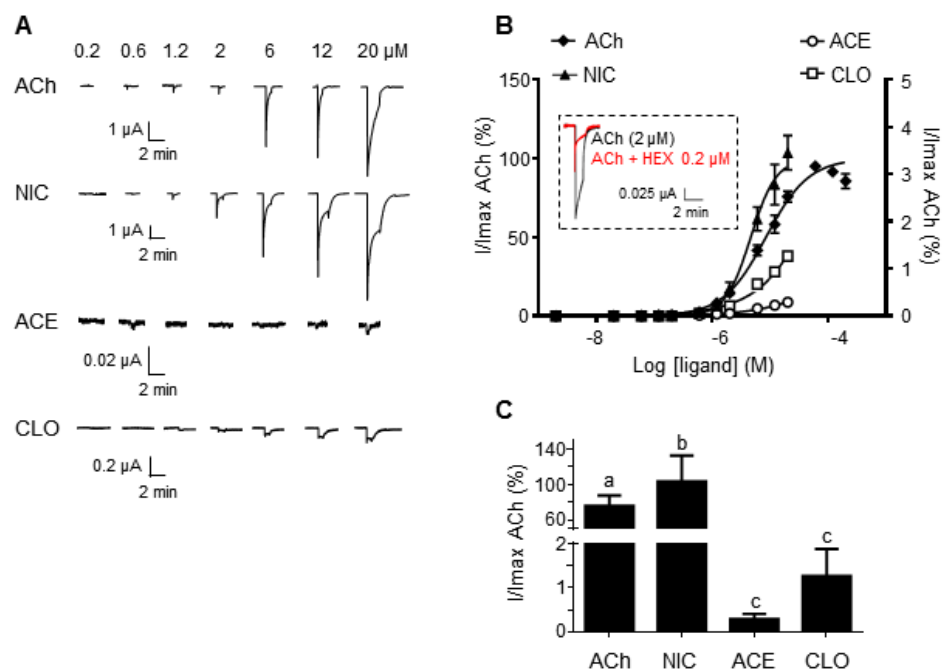


Figure 2. Pharmacological profile of ACh, NIC, ACE and CLO on rat $\alpha 3\beta 4$ nAChRs expressed in *Xenopus* oocytes. (A) ACh ($n = 12$) and NIC ($n = 7$) elicit robust currents, while ACE ($n = 8$) and CLO ($n = 7$) induce much more modest currents. Due to the solubility limit in DMSO, ACE and CLO could not be used at concentrations upper than $2 \times 10^{-5} \text{ M}$. (B) Concentration–response curves of ligand-evoked currents which are expressed as a % of ACh-elicited current amplitude. Two Y axis were used to visualize ACh and NIC (left), and CLO and ACE (right). Inset: Hexamethonium (HEX, 0.2 μM) an $\alpha 3$ -containing nAChRs antagonist, inhibits ACh-elicited current as expected. (C) Peak currents ($\pm \text{SEM}$) elicited by 20 μM ACh, NIC, ACE or CLO on rat $\alpha 3\beta 4$ nAChRs. Different lowercase letters above the graphs indicate significant differences between treatments according to Tukey’s multiple comparison post hoc test ($p < 0.05$).

2.2. Effects of Neonicotinoids on Epinephrine Secretion in Rat

This result prompted us to investigate the effect of CLO and ACE on epinephrine secretion from rat adrenal glands. It is established that the secretion of epinephrine is chiefly driven by the release of ACh at the splanchnic nerve-chromaffin cell synapses, and the role of $\alpha 3\beta 4$ nAChRs has been evidenced for a long time in this process [43]. We

hypothesized that the partial agonist effect of CLO and ACE on these receptors might either: (i) evoke a secretory response in the adrenal gland; or (ii) disrupt the NIC-induced secretion. We took advantage of an *ex vivo* technique that we designed previously [44] to measure epinephrine secretion (Figure 3A). As expected, NIC dose-dependently stimulates epinephrine secretion, and this effect is inhibited by HEX, confirming the involvement of $\alpha 3$ -containing nAChRs such as $\alpha 3\beta 4$, in this secretory activity (Figure 3B). Similar results were obtained for NIC-, CLO- or ACE-induced norepinephrine secretion (data not shown). The minimum NIC concentration eliciting an epinephrine secretion was 3 μM ($p < 0.05$) and the maximal effect was observed in this assay with 100 μM NIC ($p < 0.05$). At the same concentration of 100 μM , neither ACE nor CLO stimulated an epinephrine secretion. However, at 500 μM , CLO or ACE elicited a significant secretory effect (ACE or CLO vs. CTRL $p < 0.01$), which was inhibited by HEX (ACE 500 $\mu\text{M} \pm$ HEX $p < 0.005$; CLO 500 $\mu\text{M} \pm$ HEX $p < 0.05$) (Figure 3C,E). ACE-induced secretion was not significantly different at 100 and 500 μM , whereas CLO-induced secretion at 500 μM was significantly higher than 100 μM , reflecting their agonist properties shown in Figure 2. Interestingly, this potentiation in secretion was abolished when NIC (10 μM) was added (Figure 3C,E). These data indicate that: (i) activation of $\alpha 3\beta 4$ -containing nAChRs by neonicotinoids drives a secretory response at high concentrations from adrenal medulla glands *ex vivo*; and (ii) a paradoxical effect develops in the presence of NIC, which may be due to the competition of NIC and neonicotinoids on nAChRs. A disruptive effect of neonicotinoids on the physiological secretion in the adrenal medulla at low doses could then be anticipated.

2.3. Effects of Neonicotinoids on ABP in Rat

To evaluate the acute effects of neonicotinoids *in vivo*, ABP was continuously measured through a transducer inserted in the femoral artery of anesthetized rats (Figure 4A). Different control experiments were performed to test the adequate response of rats in this paradigm (Figure S1). Intravenous injection (*i.v.*) of AngII (hypertensive) significantly increased mean ABP whereas *i.v.* injection of ACh (hypotensive) caused a significant decrease of mean ABP, as expected (Figures 5A,B and S1). Administration of the vehicle solution, or saline, did not result in any modification. These four control injections were systematically carried out before every assay (Figures 5A,B and S1). To assess the intoxication protocol, we designed a negative control experiment (CTRL group) where rats received an injection of physiological saline with increasing DMSO concentration (2% maximum): no significant change in ABP was observed (Figure 5A,B), suggesting that our protocol did not influence the vascular parameters and allowed us to challenge rats with NIC \pm ACE or CLO through an acute exposition.

When rats received either CLO or ACE injections, the ABP variation of each rat remained close to 0 mmHg which did not significantly differ from the CTRL experiment (Figure 5A,B). Acute exposition to neonicotinoids alone influenced ABP differently to NIC, which exerted its hypertensive effect as expected (mean \pm SEM: 51 \pm 7 mmHg; range 39–69 mmHg), which is not significantly different from the AngII-induced ABP increase (Figure 5C,D). Because NIC and neonicotinoids interact on the same molecular target, *i.e.*, nAChR, we next challenged both molecules on rat ABP to analyze a possible cocktail effect on this vascular parameter: a fixed dose of neonicotinoid (ACE 0.093 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ or CLO 0.33 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was injected simultaneously with increasing doses of NIC (Figure 5C,D). A non-expected biphasic response of rat ABP is observed: an initial ABP decrease (ACE: mean \pm SEM -17 ± 5 mmHg; range -11 to -12 mmHg; CLO: mean \pm SEM -12 ± 6 mmHg; range -1 to -13 mmHg) is followed by an ABP increase (ACE: mean \pm SEM 52 ± 7 mmHg; range 31 to 71 mmHg; CLO: mean \pm SEM 50 ± 9 mmHg; range 24 to 85 mmHg). Thus, NIC together with ACE or CLO seemed to deeply modify the kinetics of ABP variation, exerting a non-expected hypotensive effect before the expected ABP increase. These data indicate that neonicotinoids impair the ABP when challenged with a full agonist of nAChRs.

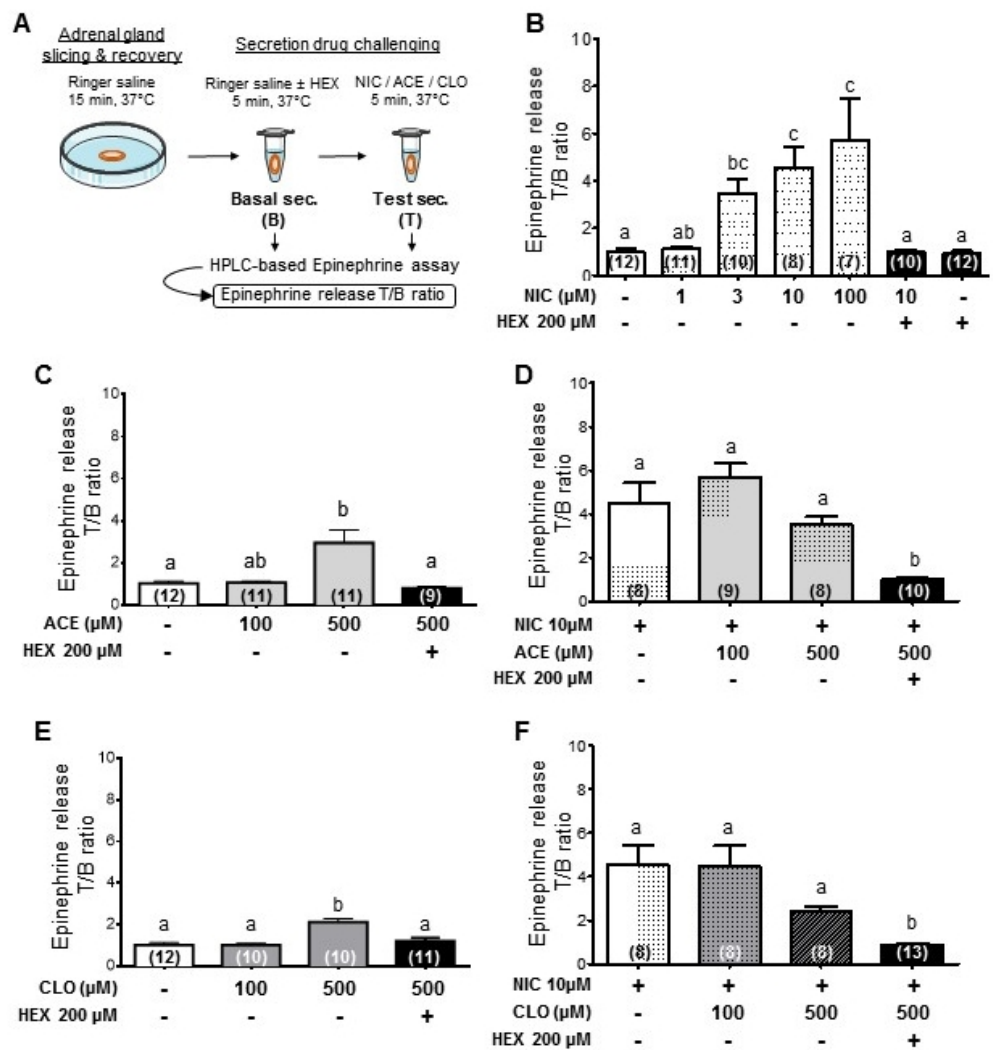


Figure 3. Influence of NIC, ACE and CLO added separately or in combination on epinephrine release from rat adrenal gland slices. (A) Experimental design modified from [44]. (B) Concentration-response of epinephrine release following NIC stimulation ± HEX, an $\alpha 3$ -containing nAChR antagonist. (C–F) Epinephrine release following either ACE or CLO treatment in combination or not with NIC ± HEX. Data are mean ± SEM and values in brackets correspond to the number of biological replicates. Different lowercase letters above the graphs indicate significant differences between two histograms within each graph according to Dunn’s multiple comparison post hoc test ($p < 0.05$). Note that neonicotinoids are able to stimulate the secretion of epinephrine when applied to the medulla tissue alone.

2.4. Modeling of Neonicotinoid- $\alpha 3\beta 4$ AChR Interaction

To gain further insight into the mechanism of action of neonicotinoids, we modeled the interaction of CLO and ACE on the rat $\alpha 3\beta 4$ nAChR. We first generated a model of the rat $\alpha 3\beta 4$ nAChR by homology modeling (Figure 6). We then docked NIC, CLO and ACE on the NIC binding site at the extracellular domain of the receptor between α and β subunit, i.e., at the orthosteric site (Figure S2) [25]. The three molecules were found to interact with the residues known to contribute to the binding site from so-called loops A, B, C, D and E (Figure 6), i.e., $\alpha Y93$; $\alpha Y190$; $\alpha C192$; $\alpha C193$; $\alpha Y197$ and $\alpha W149$ [45]. These results are therefore consistent with the hypothesis that these molecules bind to the orthosteric binding site of nAChRs [45,46].

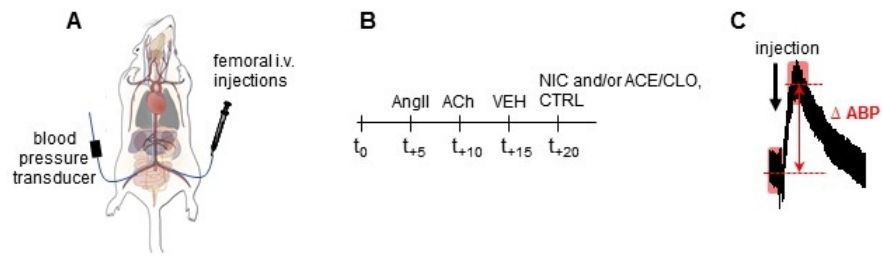


Figure 4. Schematic protocol of rat arterial blood pressure (ABP) measurements. (A) Illustration of an anesthetized rat with a catheter inserted in right femoral artery for ABP measurements through a blood pressure transducer, and with a catheter inserted in left femoral vein for i.v. injections. Rat drawing modified from Watts et al. [47]. (B) Schematic time-course of the protocol. Each rat was challenged every 5 min with AngII, ACh and vehicle solution (VEH) before fixed concentrations of NIC, ACE, CLO or DMSO 2% (CTRL). (C) Analysis method of raw trace to collect the difference between mean arterial blood pressure (Δ ABP). See Materials and Methods Section 4.7 for further explanation.

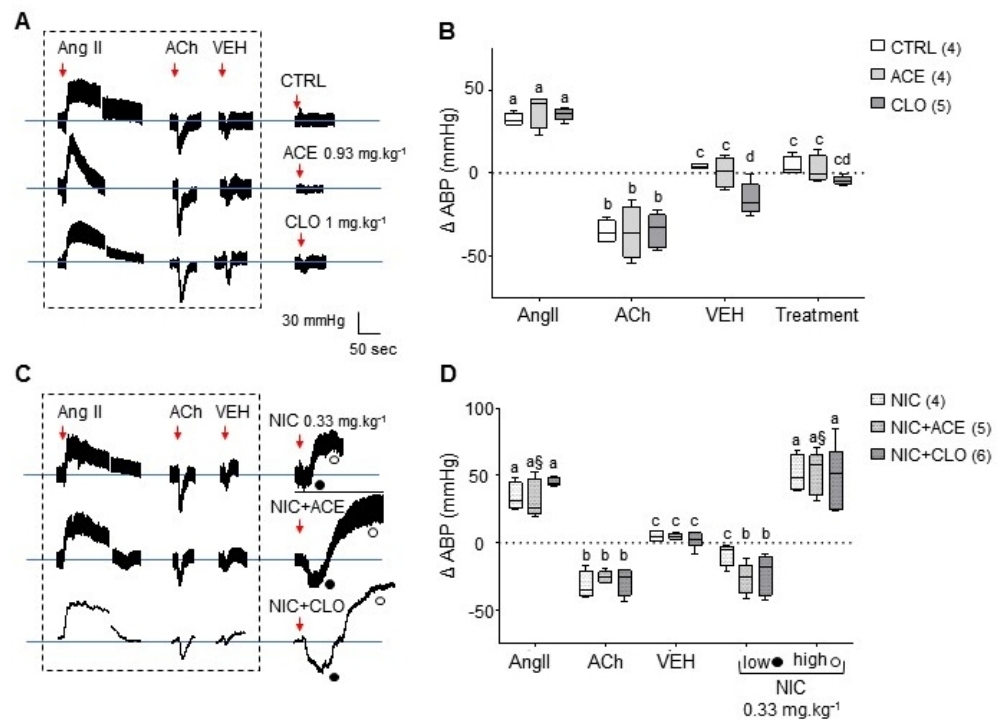


Figure 5. Influence of NIC, ACE and CLO on rat ABP. (A) Representative raw traces of ABP following ACE or CLO infusion (red arrow with doses used) compared to the CTRL group. As expected, protocol assessment molecules such as AngII ($1.05 \times 10^{-5} \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and ACh ($0.5 \times 10^{-5} \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) induce increased and decreased ABP, respectively. Neither DMSO 0.5–3% (VEH) nor ACE or CLO affected ABP, whatever the dose tested. (B) Box and whisker plots of Δ ABP data in the CTRL, CLO and ACE groups following i.v. injections, $0.93 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for ACE and $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for CLO. (C) Representative raw traces of ABP following infusions of NIC alone or NIC with either ACE or CLO. NIC was used at $0.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (red arrow) in combination with a single dose of ACE ($0.09 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or CLO ($0.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). AngII, ACh and VEH infusions triggered BP response as expected. In addition, $0.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ NIC induced a BP increase as expected, while its combination with either ACE or CLO was responsible for a biphasic response with low (o) and high (●) ABP. (D) Box and whisker plots of Δ ABP data in the NIC, NIC+ACE and NIC+CLO groups following the various infusions cited above. Whiskers are minimum to maximum values and bar represents the median value. Different lowercase letters and § above the graphs indicate significant differences between treatments according to Tukey’s multiple comparison post hoc test ($p < 0.05$).

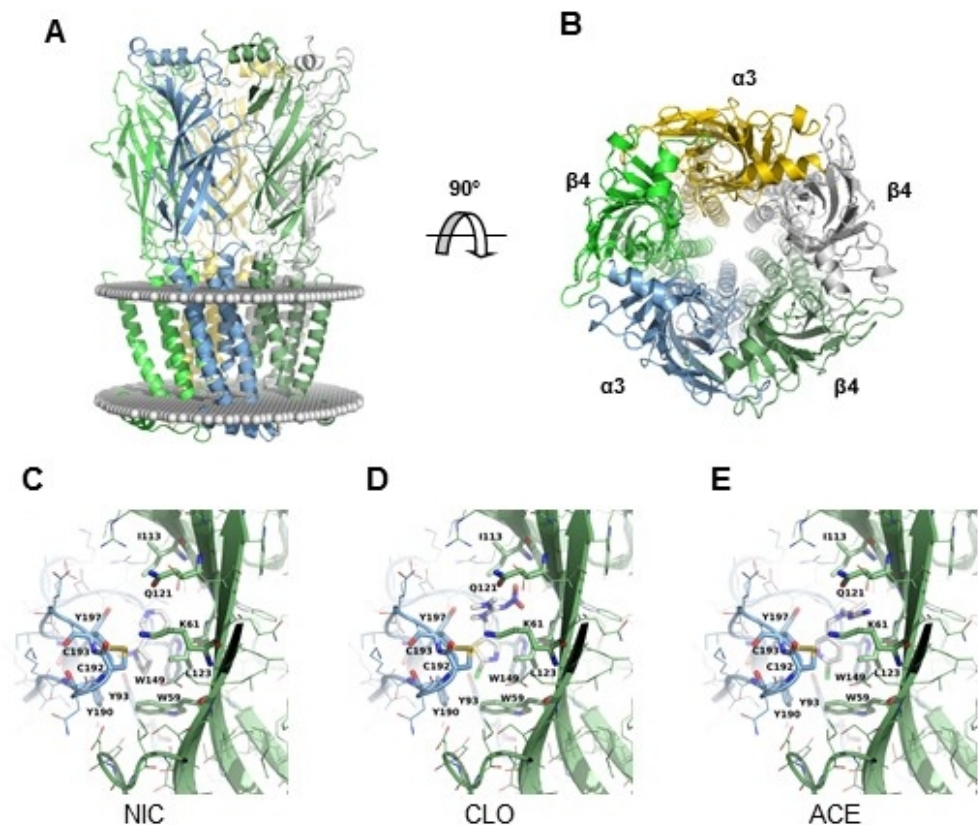


Figure 6. Homology modeling of rat $\alpha 3\beta 4$ nAChR and molecular docking of NIC, CLO and ACE. (A,B) Model of the receptor viewed from the membrane plane (A) and from the extracellular domain (B). The protein is shown in cartoon representation with a different color code for each polypeptide. The position of the membrane is represented by spheres. (C–E) Graphical representations of the orthosteric site of rat $\alpha 3\beta 4$ nAChR. The $\alpha 3\beta 4$ subunit interface in complex with: NIC (C); CLO (D); or ACE (E).

3. Discussion

Initially designed to act as NIC with less mammalian toxicity, neonicotinoids are synthetic molecules sharing the same molecular target with its molecular template, i.e., the nAChR. At insect cholinergic synapses, they mimic ACh without being degraded and this interference leads to the continuous activation of nAChRs, responsible for their lethal effects [11]. For several years now considering the wide use of these compounds throughout the world and their alarming persistence in environment, studies have focused on their effects in vertebrates, especially mammals, where they exert neurotoxic effects [48–52] and endocrine disruption [24,53–57]. The mode of action of neonicotinoids in vertebrates, particularly in mammals, is imperfectly described and needs to be better understood, to fully figure out the consequences on human health and to anticipate the occurrence of chronic pathologies. Neonicotinoids can cross several biological barriers—including the digestive tract and the blood–brain barrier. Their low molecular weight and lipophilic profile allow them to access the whole body and exert acute effects for several hours according to pharmacokinetic studies. When exposed to CLO (20 mg·kg^{−1}) through the intraperitoneal route, mice exhibited a peak concentration of 17, 55 and 14 ppm in brain, liver and plasma, respectively, after 15 min [58]. CLO reached an undetectable level in these 3 compartments after 240 min. After mouse oral exposure, ACE (71 and 710 mg·kg^{−1}·day^{−1} for 3 or 7 days) accumulates in various amounts in the brain [59]. In a recent study, deuterium-labeled neonicotinoids (including CLO and ACE) were orally ingested by healthy adults [60]. Both molecules could be detected in urine for 4 consecutive

days after exposure. The average amounts excreted were $1.14 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ for desmethyl-ACE and $0.51 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ for CLO.

In our study, we first assessed the ability of CLO and ACE to activate $\alpha 3\beta 4$ nAChRs, which are mainly expressed in the rat peripheral nervous system [61]. Both molecules acted as weak agonists of this receptor, eliciting currents in *Xenopus* oocytes much smaller than currents recorded in response to ACh or NIC. The low currents induced by CLO or ACE indicate a low affinity and a low efficiency compared to the natural agonists. This is comparable to previous data showing a weak agonist effect of CLO and imidacloprid (IMI) on the human $\alpha 2\beta 4$ nAChR [41]. The concentrations of neonicotinoids used (3–300 μM) were close to what we tested in our study (0.12–20 μM). Similar data using IMI and ACE are available on rat cerebellum neurons, containing nAChRs expressing $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 7$ subunits. In these cells, the addition of 1–100 μM ACE or IMI evoked intracellular Ca^{2+} influx which can be inhibited by selective nAChRs antagonists [48]. Unexpectedly, CLO and ACE were recently shown to have strong agonist effects—with EC_{50} in the range of ACh—on rat $\alpha 7$ nAChRs [42]. In addition, these neonicotinoids are likely to act as positive allosteric modulators of this $\alpha 7$ nAChR. Further electrophysiological characterization is required to define on which nAChRs neonicotinoids act potently. We cannot rule out the fact that these compounds also target other nAChR subtypes since cholinergic networks are largely distributed in the whole body [62]. As of today, it would be difficult to precise the role of each nAChR subtype in the cardiovascular consequences of neonicotinoid acute exposure. Nevertheless, the role of the $\alpha 3\beta 4$ receptor has been evidenced in the nicotine hypertensive effect [35] and might be a target of interest for neonicotinoids.

The ability of neonicotinoids to activate nAChRs and their potential role as endocrine disruptors prompted us to consider their effects on the peripheral nervous system. Since $\alpha 3\beta 4$ receptors are widely expressed at cholinergic synapses of the adrenal medulla and responsible for the initiation of catecholamine secretion [43,44], we tested the capacity of neonicotinoids to impact the secretory response *ex vivo*. Our data indicate that CLO and ACE promote epinephrine secretion at much higher concentrations than NIC does. These secretory effects for both neonicotinoids are likely to occur through $\alpha 3$ subunit-containing nAChRs because of their strong inhibition by HEX, but we cannot rule out the fact that several nAChR subtypes might be involved in this effect. We observed no significant effect with 100 μM CLO or ACE assuming their weak agonist effect on nicotinic receptors.

Our results are consistent with previous works, where neonicotinoids, particularly CLO, have been shown to stimulate catecholamine secretion. Indeed, at millimolar concentrations, CLO induces secretory effects on dopamine release *in vivo* through the activation of $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nAChRs subtypes in rat striatum [63–65]. IMI—which activates nAChRs in secretory PC12 cells [66]—produces a significant increase in serum epinephrine and norepinephrine levels in adult rats at $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose, leading to behavioral impairments [67]. Such increase is comparable to what we found here and suggest that neonicotinoids could be considered as endocrine disruptors, consistently with their pharmacokinetic properties. Such endocrine effects could be the consequence of their agonist action on nAChRs. Indeed, the activation of nicotinic receptors promote an increase of intracellular Ca^{2+} and a membrane depolarization, leading to the release of catecholamine. However, NIC seems much more efficient at stimulating catecholamine biosynthesis [68] and secretion (our present data). Interestingly, an unexpected competition developed between NIC and neonicotinoids (Figure 2), suggesting that neonicotinoids might impair the binding of NIC or ACh to the nAChR binding site [66]. Consistent with their weak agonist effect on nAChRs, neonicotinoids could compete with ACh in adrenal synapses to lower the level of ACh-induced epinephrine secretion.

The acute and chronic effects of NIC on the cardiovascular system are known, and have been the subject of numerous studies, particularly associated to tobacco smoking [69,70]. These effects are mediated by NIC action on the CNS and autonomic PNS, where it promotes the release of norepinephrine and on the adrenal medulla, in which it contributes to epinephrine secretion [71,72]. With a broad presence of nAChRs in the mammalian ner-

vous system, neonicotinoids may target cholinergic networks and cause deleterious effects. Acute poisoning after ingesting or inhaling a large quantity of neonicotinoids induces various symptoms in humans: respiratory decompensations, disorders of consciousness, muscle disorders and impairment of cardiovascular function with tachycardia and bradycardia and arterial hypotension [31,73,74]. A 74-year-old woman who ingested 100 mL of insecticides containing 2% ACE showed muscle weakness, hypothermia followed by cardiac arrhythmia and hypotension [75]. The hypertensive effect of NIC that we observed in anesthetized rats is consistent with previous works [76,77]. An acute NIC injection in rat induces elevated ABP which can be attenuated by mecamylamine, a nonselective nicotinic receptor antagonist and selectively blocked by hexamethonium, the selective $\alpha 3$ -containing nicotinic receptor antagonist [35]. The main effect of NIC on ABP then occurs through the $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptor. ACE and CLO did not modify ABP when injected alone, but it produced hypotension in co-application with NIC, followed by a large increase in ABP. The lack of effect of neonicotinoids alone can be correlated with the pharmacological properties of ACE/CLO, as weak agonists of nAChRs, but we cannot rule out that our protocol of anaesthesia could have affected the effect of neonicotinoids, because the combination of ketamine/xylazine is known to exert neurotoxic effects [78]. Cytisine, also a partial nAChR agonist used as a smoking cessation treatment, stimulates nAChRs in the PNS and the adrenal gland. As such, cytisine promotes catecholamine secretion, with cardiovascular consequences [79]. Its action is comparable to NIC, although more moderate. Alternatively, varenicline, also used for smoking cessation, is a partial nAChR agonist that competitively inhibits NIC binding to these receptors [80]. Chronic oral treatment of Wistar rats with varenicline induced a decrease of ABP [81]. These data clearly indicate that nAChR agonists directly or indirectly disrupt vascular function and produce ABP variations. As such, neonicotinoids are quite likely to produce arterial dysfunctions, through their action on nAChRs in the autonomous nervous system. The biphasic response we observed with neonicotinoids added to NIC consists of a decrease (hypotensive effect) followed by an increase (hypertensive effect) of ABP. Acute arterial hypotension is a consequence of: (i) a blood pressure decrease; and/or (ii) a decrease of secretion/release of catecholamine [47]. This BP decrease can be the consequence of a muscarinic effect, through the stimulation of nAChRs of the parasympathic system. Such a biphasic response (hypotension followed by hypertension) has been observed with several neurotoxins. Brevetoxin, for instance, is a Na^+ channel activator acting on the autonomous nervous system and the adrenal medulla, causing a decrease followed by an increase of ABP in mammals [82].

Our modeling of ACE/CLO interaction with the $\alpha 3\beta 4$ receptor is coherent with the notion that neonicotinoids bind to the orthosteric site of nAChR. Most amino acids implicated in the binding site of NIC are also involved in the binding site of neonicotinoids. It is possible that there are slight differences, but care must be taken in our interpretation; as we performed a homology modeling and then a docking, each of them may introduce uncertainties. In our model the residues known to be part of the binding site are shown [83]. These are also the same residues which have been found on structures of NIC bound to the $\alpha 4\beta 2$ receptor (PDB entry 6CNK, 6CNJ, 5KXI) and to the $\alpha 3\beta 4$ receptor (PDB entry 6PV7). In these structures, we find the cation/ π bond with the trp of loop B, as well as the proximity of the residues of loops C, A, D and E. This is also coherent with recent studies of the interaction of neonicotinoids with the ACh/NIC binding site on AChBP [84,85]. We conclude that the binding site is identical for NIC and for neonicotinoids, the cation/ π interaction being a strong marker of NIC (and ACh) binding to nAChRs. However, the fact that neonicotinoids and NIC bind to the same site with different agonist effects is not exceptional, since it has been observed with other agonists. For instance, lobeline—which is considered a low agonist and an antagonist of nAChRs—and ACh bind to the orthosteric site of AChBP from *Aplysia californica* [86]. In our case, it would be speculative to propose that the difference lies more in the nature of the ligand than in the residues with which it interacts. It could be hypothesized that neonicotinoids could bind slightly higher, but we do not have any evidence to support it.

4. Materials and Methods

4.1. Animal Models and Experimental Conditions

Five-month-old Wistar Kyoto male rats (Envigo, Gannat, France) weighing 350–450 g were acclimatized in a temperature and light controlled-room (23 °C; 12L:12D), in translucent cages (2–5 rats per cage, dimensions 43 cm × 27 cm × 16 cm), with food and water ad libitum. All experiments conducted randomly were carried out by a single female experimenter, to avoid stress. Four to six animals were used in each experimental group. Adult female *Xenopus laevis* were purchased from CRB (Rennes, France) and were bred in the laboratory animal facility in accordance with the recommendations of the EU Directive 2010/63/EU on the care and use of laboratory animals. All anesthetized animals recovered after 2–3 h. The protocols involving living animals have been approved by the regional ethics committee (<https://www.ceea-paysdelaloire.com>, visited on 11 May 2021 APAFIS file 7586 for rats and N° CEEA.2012.68 for *Xenopus*) and by the French Ministry of Agriculture.

4.2. Solutions and Drugs

Acetylcholine chloride (ACh), nicotine tartrate salt (NIC), HEX, CLO and ACE were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Angiotensin II (AngII), ketamine (Imalgene® 1000) and xylazine (Rompun® 2%) were purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland), Merial (France) and Bayer (France), respectively.

4.3. Molecular Cloning of Rat nAChR Subunits

Total RNA were extracted from Wistar male rat adrenal glands and converted into cDNA by reverse transcription according to the manufacturers' instructions (RNeasy micro kit : Qiagen, Courtaboeuf, France; Superscript®III First-strand Synthesis Super mix, Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France). The complete open reading frame of rat nAChR $\alpha 3$ and $\beta 4$ subunits were amplified using gene-specific primers designed from reference sequences (Genbank accession number NM_052805 ($\alpha 3$), NM_052806 ($\beta 4$), Table S2). Nested PCR amplifications were conducted as follows : 95 °C for 5 min; 30 cycles of 95 °C for 30 s and 68 °C for 1 min 30; and 68 °C for 4 min. PCR fragments were purified according to the manufacturer's instructions (Nucleospin® Gel and PCR clean-up, Macherey-Nagel, Germany). The full-length cDNAs were flanked with EcoRI and HindIII restriction sites to ensure the directional cloning into the vector pGEM-HE (kindly provided by Professor Pongs, Institute for Neural Signal Transduction, Hamburg, Germany). Recombinant plasmids were screened before sequencing (GATC Biotech, Constance, Germany). Sequence analysis was performed using blast algorithm on NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> visited on 11/05/21; [87]; Table S3). cRNA of each subunit were synthesized in vitro from linearized recombinant plasmid using mMACHINE® transcription kit according to the manufacturer's instructions (Ambion) and cRNA concentration was assessed using spectrophotometer (Nanodrop™ 2000/2000C ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

4.4. Expression of $\alpha 3\beta 4$ AChRs in *Xenopus* Oocytes

Oocytes were harvested and injected as previously described [88]. Briefly, ovarian lobes were taken from female *Xenopus* (*Xenopus laevis*) anesthetized in Tricaine (0.15% in ice-cold water) for 20 min. Oocytes were harvested and placed in standard oocyte saline (SOS containing 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4). Stage 5–6 oocytes were partially defolliculated by enzymatic treatment with 2 mg·mL⁻¹ collagenase (type IA, Sigma) in Ca²⁺-free SOS for 60 min and eventually manually defolliculated in SOS medium. To express functional nAChRs, a volume of 13.8 nL of $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptor mRNA (1:1—at a concentration of 988 ng· μ L⁻¹) was injected into the cytoplasm of individual defolliculated oocytes, using an automatic nanoinjector (Nanoject II Drummond Scientific). The stoichiometric arrangement of this receptor has been shown to exert minimal consequences on its pharmacological properties [89]. Subsequently,

oocytes were incubated in the incubation medium (autoclaved normal SOS supplemented with gentamycin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), penicillin ($100 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$), streptomycin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and sodium pyruvate (2.5 mM) for 24 h at 18°C .

4.5. Two-Electrode Voltage Clamp Recording

The technique was previously described [88,90]. The expression of nAChR in oocytes was tested at a holding potential of -60 mV using a TEV-200 amplifier (Dagan Corporation, Minneapolis, USA). Digidata 1440A interface (Axon CNS Molecular Devices, CA, USA) and pCLAMP™ 10 software (Molecular Devices) were used for current recording. Injected oocytes were continuously superfused with SOS medium at room temperature and were challenged with drugs in SOS. Stock solutions were prepared as follows: ACh was dissolved in distilled water at 100 mM, while NIC and ACE/CLO were dissolved in DMSO at 1 and 0.1 M (solubility limit), respectively. All dilutions were made in normal SOS. Electrodes were filled with 1 M KCl/2 M K-acetate and display typical resistances of 0.5–2 M Ω in SOS. Control experiments were performed using DMSO 1%. To evidence the expression of $\alpha 3\beta 4$ nAChRs in oocytes, we challenged injected and non-injected oocytes with ACh, NIC, ACE or CLO (Figure S3). Non-injected oocytes did not develop any current. Data were analyzed using pCLAMP 10 software. Mean current amplitudes were calculated from at least five different cells from two different oocyte batches and processed as current density (nA/nF). Concentration–effect relationships were analyzed using the following equation:

$$Y = Y_{min} + (Y_{max} - Y_{min}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * nH)})$$

where X is the concentration of agonists, Y_{min} and Y_{max} are the minimum and highest responses, EC_{50} is the half maximal effective concentration and nH is the Hill coefficient.

4.6. Epinephrine Secretion Assay

Epinephrine secretion was monitored from acute adrenal slices, as previously described [44]. Briefly, acute slices (150 μm thickness) from left and right adrenal glands in Wistar male rats were cut using a vibratome (DTK-1000, D.S.K, Dosaka EM CO. LTD, Kyoto, Japan). The slices recovered 15 min in Ringer's saline (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 12 mM glucose and buffered to pH 7.4) in a perfusion chamber (37°C , 95% O_2 /5% CO_2) before being challenged with NIC/neonicotinoid (ACE or CLO)/hexamethonium (HEX), an $\alpha 3$ -containing nAChR antagonist. The basal epinephrine secretion (B) was measured in the supernatant of a 5 min-bath of each adrenal slice containing either Ringer's saline or NIC (10 μM). Each slice was transferred in a test tube and then challenged for 5 min with a solution containing NIC (1, 3, 10 and 100 μM), ACE (100 and 500 μM) or CLO (100 and 500 μM), alone or in combination (NIC+CLO or NIC+ACE), with or without HEX (200 μM), before removing the supernatant for epinephrine measurement referred as test epinephrine secretion (T). HPLC-based epinephrine assay was conducted as previously described [44]. The results are expressed as T/B ratio of epinephrine release. The concentrations of neonicotinoids used in this ex vivo assay—100 and 500 μM —can be approximately equivalent to 30 and 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in vivo, respectively.

4.7. Intoxication Protocol and ABP Measurement

Wistar male rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine at a dose of $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and xylazine as analgesic at $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. We are aware that this anesthetic combination could interfere with our data [91,92] since ketamine/xylazine are known to disrupt cardiovascular parameters. To minimize the anesthetic side effects, we monitored ABP throughout the experiment and verified, before each injection, that the mean ABP is within the range of physiological values for Wistar-Kyoto rats ($94.18 \pm 2.14 \text{ mmHg}$, Figure S4). For the measurement of ABP via arterial catheterization, the anesthetized animal was positioned back on a heating mat (maintained at 38°C). The PE10 catheter (DI: 0.28 mm, OD: 0.61 mm) welded to PE50 (DI: 0.58 mm, DE: 0.965 mm) is placed at the

level of the right femoral artery and is connected to the pressure sensor. The measurements are collected using a Biopac data acquisition system (Biopac systems MP100 coupled to AcqKnowledge[®] software). Injections are made by the second PE50 catheter placed at the level of the left femoral vein (Figure 4A). Based on the knowledge of neonicotinoid molecules, we estimated that an intravenous dose of 1 mg·kg⁻¹ CLO or ACE is equivalent to a concentration of 5–20 μM, for which we found a weak agonist effect of these molecules in electrophysiology. The following injections were performed subsequently in each animal. Firstly, AngII (10 ng·kg⁻¹), ACh (0.5 μg·kg⁻¹), vehicle solution (DMSO 2% and NaCl 0.9%) and physiological saline (NaCl 0.9%) were administered as positive and negative control molecules for each animal. Depending of their group assignment (NIC, ACE, CLO and CTRL), a selected dose of NIC, ACE, CLO or DMSO (2%) was injected into the femoral vein of each rat with a 4–5-min interval between two injections (NIC: 3 × 10⁻¹ mg·kg⁻¹; ACE/CLO: 1 mg·kg⁻¹) (Figure 4B). To study the effect of both molecules, NIC was administered to two other rat groups (NIC+ACE and NIC+CLO), associated with a single dose of either ACE (0.1 mg·kg⁻¹) or CLO (0.33 mg·kg⁻¹). These fixed doses of neonicotinoids were adjusted from the Acute Reference Dose (ARfD) promoted by FAO/WHO (reviewed in [93]). The dose for CLO was limited to 0.33 mg·kg⁻¹ (and not 0.6 mg·kg⁻¹) because we could not exceed the threshold limit for DMSO *in vivo*. A negative control was also performed with vehicle solution injections on a time scale similar to that of intoxications (Figure 4B). Femoral ABP was recorded continuously (1000 Hz) for 1 h and the animals were killed by exsanguination. Mean ABP was measured on recordings, over a 2-s period before and after the injections using AcqKnowledge[®] software (Biopac, Goleta, CA, USA). The difference between these mean values (ΔABP) was used for statistical analysis (Figure 4C).

4.8. nAChR Homology Modeling and Ligand Docking

The chosen template was that of the human α3β4 nAChR obtained in complex with NIC (PDB code 3PV7). The sequence of the template was aligned to that of rat α3 and β4 with the software T-Coffee [94]. The alignment was edited manually to remove the long stretch of α3 and β4 residues for which there is no counterpart in the template, i.e., N-terminus, C-terminus and M3-M4 loop. The resulting alignment was used, together with the PDB structure 3PV7, to produce the target model with Modeler version 9.19 [95]. The automodel method was used with “very slow” optimization level and three repetitions. In total, 100 models were prepared and the best, according to the DOPE energy function, was selected. The structures of ligands were retrieved from Pubchem as sdf files, i.e., Clothianidin (86287519) and Acetamiprid (213021). The structure of the protein and ligand were converted to pdbqt files with the software Open Babel 2.4.1 [96]. Docking was performed with the software smina [97]. The docking box was defined automatically using the nicotine found in the experimental structure.

4.9. Data Analysis

Statistical analysis were performed using GraphPad Prism[®] 7 software (La Jolla, CA, USA). Electrophysiological data were analyzed using a nonlinear regression for each treatment concentration–effect relationship. The difference in current amplitude among treatment was assessed using one way ANOVA and Tukey’s multiple comparison post hoc test. Epinephrine secretion data (i.e., NIC/ACE/CLO dose–effect, α3β4 role in NIC or ACE-CLO-induced epinephrine secretion, ACE/CLO effect on NIC-induced epinephrine secretion) were assessed by Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by Dunn’s multiple comparison post hoc test. ABP data (i.e., CLO/ACE/NIC effect on ABP compared to hypertensive (AngII), hypotensive (ACh) or vehicle solution (VEH) as well as to the CTRL solution, ACE/CLO effect on NIC-induced hypertensive effect) were assessed by two-way ANOVA and Tukey’s multiple comparison post hoc test. Data are mean ± SEM. In Figures 2, 3 and 5, the different lowercase letters indicate significant differences between treatments. Any two means that do not share the same letter are significantly different

($p < 0.05$) after running the ANOVA analysis. The lowercase letters a–d are used to indicate which means differ and which ones do not based on the multiple comparison post hoc tests.

5. Conclusions

Since their first introduction in the early 1990s, neonicotinoid insecticides have been used extensively to control harmful insects and increase agricultural productivity. The preoccupation for the human health has emerged recently [98]. Our data show that the neonicotinoids CLO and ACE, through a weak stimulation of nAChRs, elicit epinephrine secretion with no apparent disturbance of rat ABP *in vivo*. However, ACE or CLO modified the kinetics of NIC-induced hypertensive effect. This raises concern about sub-chronic and chronic effects of these insecticides on the human health.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/10/5106/s1>, Table S1: Pharmacological parameters of neonicotinoids on mammalian nAChR subtypes [41,42]. Table S2: Primers used to generate the full-length cDNAs and the pGEM-HE expression constructs containing ORFs of $\alpha 3$ and $\beta 4$ nAChRs subunits in rat. Table S3: Nucleotide variations of nAChR subunit ORFs from adrenal medullary tissue (AM) compared with reference sequences of each subunit from central nervous system (Genbank accession numbers $\alpha 3$ NM_052805 and $\beta 4$ NM_052806). Figure S1: Experimental procedure for ABP measurements using control solutions. (A) Box and whisker plots of Δ ABP data for AngII, ACh, VEH (0.9% NaCl, 2% DMSO) and saline (0.9% NaCl) groups. Whiskers are minimum to maximum values and bars represent the median value. Groups with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.001$). (B) Representative raw traces of ABP for each treatment. Figure S2: Graphical representations of the molecular docking of NIC (A), CLO (B) and ACE (C) on the orthosteric site of rat $\alpha 3\beta 4$ nAChR. The three molecules are framed by a red line. Figure S3: Evidence of $\alpha 3\beta 4$ nAChR expression in oocytes. Injected (red) and non-injected (black) oocytes were challenged with either ACh (A) or NIC (B) at 100 μ M. Note that no current developed in non-injected oocytes. Figure S4: Mean ABP (\pm SEM) measured before injections in each animal group throughout the experimental procedures. T0, basal ABP (before ANGII injection); T1, before ACh injection; T2, before vehicle; T3, before Saline; T4, before Treatment.

Author Contributions: Experiments were performed by J.P., A.T., J.B., F.D.N., N.C.G., C.L. (Christian Legros), C.M. and H.T.-L. Analysis was performed by J.P., A.T., J.B., N.C.G., C.L. (Christian Legros), C.M. and H.T.-L. Research direction was done by C.L. (Christian Legros), N.C.G., C.M. and H.T.-L. Manuscript preparation and revision were done by J.P., A.T., J.B., F.D.N., N.C.G., C.L. (Christian Legros), C.L. (Claire Legendre), D.H., C.M. and H.T.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: All animal experiments were carried out in compliance with the EU Directive 2010/63/EU on the care and use of laboratory animals. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the ethics committee of Région Pays de la Loire (<https://www.ceea-paysdelaloire.com> visited on 11 May 2021) and by the French Ministry of Agriculture. Protocole codes are APAFIS N° 7586 for rats and N° CEEA.2012.68 for Xenopus, and date of approval is 12 January 2017. The NC3R's ARRIVE guidelines were followed in the conduct and reporting of all experiments using living animals.

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

Acknowledgments: We thank Nastassia Navassiolova, Lucille Crespin, Julie Favre, Gilles Kauffenstein and Steeve Thany for excellent technical assistance and stimulating scientific discussion.

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

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ABP	arterial blood pressure
ACE	acetamiprid
ACh	acetylcholine
AngII	angiotensin II
CLO	clothianidin
DMSO	dimethyl sulfoxide
EC ₅₀	half maximal effective concentration
HEX	hexamethonium
IMI	imidacloprid
nAChR	nicotinic acetylcholine receptor
NIC	nicotine
VEH	vehicle

References

- Tomizawa, M.; Casida, J.E. Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 247–268. [[CrossRef](#)]
- Jeschke, P.; Nauen, R.; Schindler, M.; Elbert, A. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2897–2908. [[CrossRef](#)]
- Bass, C.; Denholm, I.; Williamson, M.S.; Nauen, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2015**, *121*, 78–87. [[CrossRef](#)]
- Matsuda, K.; Ihara, M.; Sattelle, D.B. Neonicotinoid Insecticides: Molecular Targets, Resistance, and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2020**, *60*, 241–255. [[CrossRef](#)]
- Douglas, M.R.; Tooker, J.F. Large-Scale Deployment of Seed Treatments Has Driven Rapid Increase in Use of Neonicotinoid Insecticides and Preemptive Pest Management in U.S. Field Crops. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 5088–5097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Craddock, H.A.; Huang, D.; Turner, P.C.; Quirós-Alcalá, L.; Payne-Sturges, D.C. Trends in neonicotinoid pesticide residues in food and water in the United States, 1999–2015. *Environ. Health* **2019**, *18*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Frank, S.D.; Tooker, J.F. Opinion: Neonicotinoids pose undocumented threats to food webs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 202017221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goulson, D. REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* **2013**, *50*, 977–987. [[CrossRef](#)]
- Bonmatin, J.M.; Giorio, C.; Girolami, V.; Goulson, D.; Kreutzweiser, D.P.; Krupke, C.; Liess, M.; Long, E.; Marzaro, M.; Mitchell, E.A.D.; et al. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 35–67. [[CrossRef](#)]
- Mörtl, M.; Vehovszky, A.; Klátyik, S.; Takács, E.; Győri, J.; Székács, A. Neonicotinoids: Spreading, Translocation and Aquatic Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 2006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gibbons, D.; Morrissey, C.; Mineau, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 103–118. [[CrossRef](#)]
- Pisa, L.; Goulson, D.; Yang, E.C.; Gibbons, D.; Sánchez-Bayo, F.; Mitchell, E.; Aebi, A.; Sluijs, J.v.d.; MacQuarrie, C.J.K.; Giorio, C.; et al. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *28*, 11749–11797. [[CrossRef](#)]
- Wang, X.; Anadón, A.; Qinghua, W.; Qiao, F.; Ares, I.; Martínez-Larrañaga, M.R.; Yuan, Z.; Martínez, M.A. Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *58*, 1–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hoshi, N.; Hirano, T.; Omotehara, T.; Tokumoto, J.; Umemura, Y.; Mantani, Y.; Tanida, T.; Warita, K.; Tabuchi, Y.; Yokoyama, T.; et al. Insight into the Mechanism of Reproductive Dysfunction Caused by Neonicotinoid Pesticides. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 1439–1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lopez-Antia, A.; Ortiz-Santaliestra, M.E.; Mougeot, F.; Mateo, R. Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environ. Res.* **2015**, *136*, 97–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gao, L.r.; Li, S.; Zhang, J.; Liang, C.; Chen, E.n.; Zhang, S.y.; Chuai, M.; Bao, Y.p.; Wang, G.; Yang, X. Excess Imidacloprid Exposure Causes the Heart Tube Malformation of Chick Embryos. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 9078–9088. [[CrossRef](#)]
- Gobeli, A.; Crossley, D.; Johnson, J.; Reyna, K. The effects of neonicotinoid exposure on embryonic development and organ mass in northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *195*, 9–15. [[CrossRef](#)]
- Ge, W.; Yan, S.; Wang, J.; Zhu, L.; Chen, A.; Wang, J. Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1856–1862. [[CrossRef](#)]

19. Ansoar-Rodríguez, Y.; Christofolletti, C.A.; Correia, J.E.; Souza, R.B.d.; Moreira-de Sousa, C.; Marcato, A.C.d.C.; Bueno, O.C.; Malaspina, O.; Silva-Zacarin, E.C.M.; Fontanetti, C.S. Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: Histopathology and heat shock protein *in situ* localization. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2016**, *51*, 881–887. [[CrossRef](#)]
20. Iturburu, F.G.; Zömisich, M.; Panzeri, A.M.; Crupkin, A.C.; Contardo-Jara, V.; Pflugmacher, S.; Menone, M.L. Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2017**, *36*, 699–708. [[CrossRef](#)]
21. Hirano, T.; Yanai, S.; Omotehara, T.; Hashimoto, R.; Umemura, Y.; Kubota, N.; Minami, K.; Nagahara, D.; Matsuo, E.; Aihara, Y.; et al. The combined effect of clothianidin and environmental stress on the behavioral and reproductive function in male mice. *J. Vet. Med. Sci.* **2015**, *77*, 1207–1215. [[CrossRef](#)]
22. Hsiao, C.J.; Lin, C.L.; Lin, T.Y.; Wang, S.E.; Wu, C.H. Imidacloprid toxicity impairs spatial memory of echolocation bats through neural apoptosis in hippocampal CA1 and medial entorhinal cortex areas. *NeuroReport* **2016**, *27*, 462–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Burke, A.P.; Niibori, Y.; Terayama, H.; Ito, M.; Pidgeon, C.; Arsenault, J.; Camarero, P.R.; Cummins, C.L.; Mateo, R.; Sakabe, K.; Hampson, D.R. Mammalian Susceptibility to a Neonicotinoid Insecticide after Fetal and Early Postnatal Exposure. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16639. [[CrossRef](#)]
24. Berheim, E.H.; Jenks, J.A.; Lundgren, J.G.; Michel, E.S.; Grove, D.; Jensen, W.F. Effects of Neonicotinoid Insecticides on Physiology and Reproductive Characteristics of Captive Female and Fawn White-tailed Deer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tomizawa, M.; Kagabu, S.; Casida, J.E. Receptor Structure-Guided Neonicotinoid Design. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2918–2922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Chen, M.; Tao, L.; McLean, J.; Lu, C. Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6082–6090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chen, D.; Zhang, Y.; Lv, B.; Liu, Z.; Han, J.; Li, J.; Zhao, Y.; Wu, Y. Dietary exposure to neonicotinoid insecticides and health risks in the Chinese general population through two consecutive total diet studies. *Environ. Int.* **2020**, *135*, 105399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lu, C.; Chang, C.H.; Palmer, C.; Zhao, M.; Zhang, Q. Neonicotinoid Residues in Fruits and Vegetables: An Integrated Dietary Exposure Assessment Approach. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52*, 3175–3184. [[CrossRef](#)]
29. Tao, Y.; Phung, D.; Dong, F.; Xu, J.; Liu, X.; Wu, X.; Liu, Q.; He, M.; Pan, X.; Li, R.; Zheng, Y. Urinary monitoring of neonicotinoid imidacloprid exposure to pesticide applicators. *Sci. Total. Environ.* **2019**, *669*, 721–728. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, Q.; Lu, Z.; Chang, C.H.; Yu, C.; Wang, X.; Lu, C. Dietary risk of neonicotinoid insecticides through fruit and vegetable consumption in school-age children. *Environ. Int.* **2019**, *126*, 672–681. [[CrossRef](#)]
31. Lin, P.; Lin, H.; Liao, Y.; Guo, H.; Chen, K. Acute Poisoning with Neonicotinoid Insecticides: A Case Report and Literature Review. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *112*, 282–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Cimino, A.M.; Boyles, A.L.; Thayer, K.A.; Perry, M.J. Effects of Neonicotinoid Pesticide Exposure on Human Health: A Systematic Review. *Environ. Health Perspect.* **2016**, *125*, 155–162. [[CrossRef](#)]
33. Jackson, A.; Grobman, B.; Krishnan-Sarin, S. Recent findings in the pharmacology of inhaled nicotine: Preclinical and clinical *in vivo* studies. *Neuropharmacology* **2020**, *176*, 108218. [[CrossRef](#)]
34. Benowitz, N.L.; Burbank, A.D. Cardiovascular toxicity of nicotine: Implications for electronic cigarette use. *Trends Cardiovasc. Med.* **2016**, *26*, 515–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jutkiewicz, E.M.; Rice, K.C.; Carroll, F.I.; Woods, J.H. Patterns of nicotinic receptor antagonism II: Cardiovascular effects in rats. *Drug Alcohol Depend.* **2013**, *131*, 284–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Millar, N.S.; Denholm, I. Nicotinic acetylcholine receptors: Targets for commercially important insecticides. *Invertebr. Neurosci.* **2007**, *7*, 53–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Simon-Delso, N.; Amaral-Rogers, V.; Belzunces, L.P.; Bonmatin, J.M.; Chagnon, M.; Downs, C.; Furlan, L.; Gibbons, D.W.; Giorio, C.; Girolami, V.; et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 5–34. [[CrossRef](#)]
38. Lewis, K.A.; Tzilivakis, J.; Warner, D.J.; Green, A. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* **2016**, *22*, 1050–1064. [[CrossRef](#)]
39. Schmeltz, I. *Nicotine and Other Tobacco Alkaloids*; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1971.
40. Xiao, Y.; Meyer, E.L.; Thompson, J.M.; Surin, A.; Wroblewski, J.; Kellar, K.J. Rat $\alpha 3\beta 4$ Subtype of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Stably Expressed in a Transfected Cell Line: Pharmacology of Ligand Binding and Function. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 322–333. [[CrossRef](#)]
41. Li, P.; Ann, J.; Akk, G. Activation and modulation of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. *J. Neurosci. Res.* **2011**, *89*, 1295–1301. [[CrossRef](#)]
42. Cartereau, A.; Martin, C.; Thany, S.H. Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine-induced currents on mammalian $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 1987–1998. [[CrossRef](#)]
43. Free, R.; Bryant, D.L.; McKay, S.B.; Kaser, D.J.; McKay, D.B. [3 H]Epibatidine binding to bovine adrenal medulla: evidence for $\alpha 3\beta 4^*$ nicotinic receptors. *Neurosci. Lett.* **2002**, *318*, 98–102. [[CrossRef](#)]

44. De Nardi, F.; Lefort, C.; Bréard, D.; Richomme, P.; Legros, C.; Guérineau, N.C. Monitoring the Secretory Behavior of the Rat Adrenal Medulla by High-Performance Liquid Chromatography-Based Catecholamine Assay from Slice Supernatants. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Costa, V.; Nistri, A.; Cavalli, A.; Carloni, P. A structural model of agonist binding to the $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 921–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, J.; Lindstrom, J. Orthosteric and allosteric potentiation of heteromeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *175*, 1805–1821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Watts, S.W.; Morrison, S.F.; Davis, R.P.; Barman, S.M. Serotonin and Blood Pressure Regulation. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 359–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kimura-Kuroda, J.; Komuta, Y.; Kuroda, Y.; Hayashi, M.; Kawano, H. Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32432. [[CrossRef](#)]
49. Kimura-Kuroda, J.; Nishito, Y.; Yanagisawa, H.; Kuroda, Y.; Komuta, Y.; Kawano, H.; Hayashi, M. Neonicotinoid Insecticides Alter the Gene Expression Profile of Neuron-Enriched Cultures from Neonatal Rat Cerebellum. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 987. [[CrossRef](#)]
50. Christen, V.; Rusconi, M.; Crettaz, P.; Fent, K. Developmental neurotoxicity of different pesticides in PC-12 cells *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2017**, *325*, 25–36. [[CrossRef](#)]
51. Hirano, T.; Yanai, S.; Takada, T.; Yoneda, N.; Omotehara, T.; Kubota, N.; Minami, K.; Yamamoto, A.; Mantani, Y.; Yokoyama, T.; et al. NOAEL-dose of a neonicotinoid pesticide, clothianidin, acutely induce anxiety-related behavior with human-audible vocalizations in male mice in a novel environment. *Toxicol. Lett.* **2018**, *282*, 57–63. [[CrossRef](#)]
52. Nakayama, A.; Yoshida, M.; Kagawa, N.; Nagao, T. The neonicotinoids acetamiprid and imidacloprid impair neurogenesis and alter the microglial profile in the hippocampal dentate gyrus of mouse neonates. *J. Appl. Toxicol.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kim, J.; Park, Y.; Yoon, K.S.; Clark, J.M.; Park, Y. Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, induces insulin resistance. *J. Toxicol. Sci.* **2013**, *38*, 655–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Şekeroğlu, V.; Şekeroğlu, Z.A.; Demirhan, E. Effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on thyroid hormone levels in rat serum. *Toxicol. Ind. Health* **2014**, *30*, 40–46. [[CrossRef](#)]
55. Sun, Q.; Xiao, X.; Kim, Y.; Kim, D.; Yoon, K.S.; Clark, J.M.; Park, Y. Imidacloprid Promotes High Fat Diet-Induced Adiposity and Insulin Resistance in Male C57BL/6J Mice. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 9293–9306. [[CrossRef](#)]
56. Sun, Q.; Qi, W.; Xiao, X.; Yang, S.H.; Kim, D.; Yoon, K.S.; Clark, J.M.; Park, Y. Imidacloprid promotes high fat diet-induced adiposity in female C57BL/6J mice and enhance adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes via AMPK α -mediated pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Caron-Beaudoin, E.; Viau, R.; Sanderson, J.T. Effects of Neonicotinoid Pesticides on Promoter-Specific Aromatase (CYP19) Expression in Hs578t Breast Cancer Cells and the Role of the VEGF Pathway. *Environ. Health Perspect.* **2018**, *126*, 047014. [[CrossRef](#)]
58. Ford, K.A.; Casida, J.E. Unique and Common Metabolites of Thiamethoxam, Clothianidin, and Dinotefuran in Mice. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 1549–1556. [[CrossRef](#)]
59. Terayama, H.; Endo, H.; Tsukamoto, H.; Matsumoto, K.; Umezumi, M.; Kanazawa, T.; Ito, M.; Sato, T.; Naito, M.; Kawakami, S.; et al. Acetamiprid Accumulates in Different Amounts in Murine Brain Regions. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 937. [[CrossRef](#)]
60. Harada, K.H.; Tanaka, K.; Sakamoto, H.; Imanaka, M.; Niisoe, T.; Hitomi, T.; Kobayashi, H.; Okuda, H.; Inoue, S.; Kusakawa, K.; et al. Biological Monitoring of Human Exposure to Neonicotinoids Using Urine Samples, and Neonicotinoid Excretion Kinetics. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146335. [[CrossRef](#)]
61. Flores, C.M.; DeCamp, R.M.; Kilo, S.; Rogers, S.W.; Hargreaves, K.M. Neuronal Nicotinic Receptor Expression in Sensory Neurons of the Rat Trigeminal Ganglion: Demonstration of $\alpha 3\beta 4$, a Novel Subtype in the Mammalian Nervous System. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 7892–7901. [[CrossRef](#)]
62. Millar, N.S.; Gotti, C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 237–246. [[CrossRef](#)]
63. Oliveira, I.M.d.; Nunes, B.V.F.; Barbosa, D.R.; Pallares, A.M.; Faro, L.R.F. Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on *in vivo* dopamine release in rat striatum. *Toxicol. Lett.* **2010**, *192*, 294–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Faro, L.; Oliveira, I.; Durán, R.; Alfonso, M. *In vivo* neurochemical characterization of clothianidin induced striatal dopamine release. *Toxicology* **2012**, *302*, 197–202. [[CrossRef](#)]
65. Faro, L.R.; Kim, H.T.; Alfonso, M.; Durán, R. Clothianidin, a neonicotinoid insecticide, activates $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ and muscarinic receptors to induce *in vivo* dopamine release from rat striatum. *Toxicology* **2019**, 152285. [[CrossRef](#)]
66. Nagata, K.; Song, J.H.; Shono, T.; Narahashi, T. Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by the nitromethylene heterocycle imidacloprid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *285*, 731–738. [[PubMed](#)]
67. Khalil, S.R.; Awad, A.; Mohammed, H.H.; Nassan, M.A. Imidacloprid insecticide exposure induces stress and disrupts glucose homeostasis in male rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *55*, 165–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Kawahata, I.; Yamakuni, T. Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, facilitates tyrosine hydroxylase transcription and phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA expression to enhance catecholamine synthesis and its nicotine-evoked elevation in PC12D cells. *Toxicology* **2018**, *394*, 84–92. [[CrossRef](#)]

69. Benowitz, N.L. Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics. *Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *49*, 57–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Benowitz, N.L.; Gourlay, S.G. Cardiovascular Toxicity of Nicotine: Implications for Nicotine Replacement Therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1997**, *29*, 1422–1431. [[CrossRef](#)]
71. Taylor, P. Agents Acting at the Neuromuscular Junction and Autonomic Ganglia. In *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Pergamon ed.; Gilman, A., Rall, T., Nies, A., Taylor, P., Eds.; Pergamon Press: New York, NY, USA, 1990; pp. 166–186.
72. Marano, G.; Ramirez, A.; Mori, I.; Ferrari, A.U. Sympathectomy inhibits the vasoactive effects of nicotine in conscious rats. *Cardiovasc. Res.* **1999**, *42*, 201–205. [[CrossRef](#)]
73. Phua, D.H.; Lin, C.C.; Wu, M.L.; Deng, J.F.; Yang, C.C. Neonicotinoid insecticides: an emerging cause of acute pesticide poisoning. *Clin. Toxicol.* **2009**, *47*, 336–341. [[CrossRef](#)]
74. Kumar, A.; Verma, A.; Kumar, A. Accidental human poisoning with a neonicotinoid insecticide, imidacloprid: A rare case report from rural India with a brief review of literature. *Egypt. J. Forensic Sci.* **2013**, *3*, 123–126. [[CrossRef](#)]
75. Imamura, T.; Yanagawa, Y.; Nishikawa, K.; Matsumoto, N.; Sakamoto, T. Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48*, 851–853. [[CrossRef](#)]
76. Dominiak, P.; Fuchs, G.; Toth, S.v.; Grobecker, H. Effects of nicotine and its major metabolites on blood pressure in anaesthetized rats. *Klin. Wochenschr.* **1985**, *63*, 90–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Tanus-Santos, J.E.; Sampaio, R.C.; Hyslop, S.; Franchini, K.G.; Moreno, H. Endothelin ETA receptor antagonism attenuates the pressor effects of nicotine in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *396*, 33–37. [[CrossRef](#)]
78. Yamakura, T.; Chavez-Noriega, L.E.; Harris, R.A. Subunit-dependent Inhibition of Human Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors and Other Ligand-gated Ion Channels by Dissociative Anesthetics Ketamine and Dizocilpine. *Anesthesiology* **2000**, *92*, 1144–1153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Dimitrov, M.; Lambov, N.; Penchev, B.; Ivanov, A. Application of Nicotine and Cytisine on the nicotine treatment. *Pharma-News* **2003**, *32*, 18–31.
80. Hays, J.T.; Ebbert, J.O. Varenicline for Tobacco Dependence. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2018–2024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Selcuk, E.B.; Süngü, M.; Tetik, B.K.; Parlakpınar, H.; Ermiş, N.; Taslidere, E.; Vardı, N.; Yalcınoy, M.; Sağır, M.; Polat, A.; et al. Evaluation of the cardiovascular effects of varenicline in rats. *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 5705–5717. [[CrossRef](#)]
82. Johnson, G.L.; Spikes, J.J.; Ellis, S. Cardiovascular effects of brevetoxins in dogs. *Toxicon* **1985**, *23*, 505–515. [[CrossRef](#)]
83. Taly, A.; Corringer, P.J.; Guedin, D.; Lestage, P.; Changeux, J.P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 733–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Alamiddine, Z.; Selvam, B.; Cerón-Carrasco, J.P.; Mathé-Allainmat, M.; Lebreton, J.; Thany, S.H.; Laurent, A.D.; Graton, J.; Questel, J.Y.L. Molecular recognition of thiachlopride by *Aplysia californica* AChBP: new insights from a computational investigation. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2015**, *29*, 1151–1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Alamiddine, Z.; Selvam, B.; Graton, J.; Laurent, A.D.; Landagaray, E.; Lebreton, J.; Mathé-Allainmat, M.; Thany, S.H.; Questel, J.Y.L. Binding of Sulfoxaflor to *Aplysia californica*-AChBP: Computational Insights from Multiscale Approaches. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59*, 3755–3769. [[CrossRef](#)]
86. Taly, A.; Colas, C.; Malliavin, T.; Blondel, A.; Nilges, M.; Corringer, P.J.; Joseph, D. Discrimination of agonists versus antagonists of nicotinic ligands based on docking onto AChBP structures. *J. Mol. Graph. Model.* **2011**, *30*, 100–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
88. Mattei, C.; Taly, A.; Soualah, Z.; Saulais, O.; Henrion, D.; Guéroux, N.C.; Verleye, M.; Legros, C. Involvement of the GABAA receptor α subunit in the mode of action of etifoxine. *Pharmacol. Res.* **2019**, *145*, 104250. [[CrossRef](#)]
89. Krashia, P.; Moroni, M.; Broadbent, S.; Hofmann, G.; Kracun, S.; Beato, M.; Groot-Kormelink, P.J.; Sivilotti, L.G. Human $\alpha 3\beta 4$ Neuronal Nicotinic Receptors Show Different Stoichiometry if They Are Expressed in *Xenopus* Oocytes or Mammalian HEK293 Cells. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Crespin, L.; Legros, C.; List, O.; Tricoire-Leignel, H.; Mattei, C. Injection of insect membrane in *Xenopus* oocyte: An original method for the pharmacological characterization of neonicotinoid insecticides. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2016**, *77*, 10–16. [[CrossRef](#)]
91. Blackburn, M.B.; Andrade, M.A.; Toney, G.M. Hypothalamic PVN contributes to acute intermittent hypoxia-induced sympathetic but not phrenic long-term facilitation. *J. Appl. Physiol.* **2018**, *124*, 1233–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Haniuda, M.; Itoh, N.; Chiba, S. Time-dependent enhancement of xylazine-induced, α -2 adrenoceptor-mediated vasoconstriction in isolated and perfused canine pulmonary veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *249*, 340–347.
93. Wang, Z.; Brooks, B.W.; Zeng, E.Y.; You, J. Comparative mammalian hazards of neonicotinoid insecticides among exposure durations. *Environ. Int.* **2019**, *125*, 9–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Notredame, C.; Higgins, D.G.; Heringa, J. T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. Edited by J. Thornton. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302*, 205–217. [[CrossRef](#)]
95. Webb, B.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2016**, *54*, 5.6.1–5.6.37. [[CrossRef](#)]

96. O'Boyle, N.M.; Banck, M.; James, C.A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G.R. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminform.* **2011**, *3*, 33. [[CrossRef](#)]
97. Koes, D.R.; Baumgartner, M.P.; Camacho, C.J. Lessons Learned in Empirical Scoring with smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 1893–1904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Thompson, D.A.; Lehmler, H.J.; Kolpin, D.W.; Hladik, M.L.; Vargo, J.D.; Schilling, K.E.; LeFevre, G.H.; Peeples, T.L.; Poch, M.C.; LaDuca, L.E.; et al. A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2020**, *22*, 1315–1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

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

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

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



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

Academic Editor: Guido R.M.M. Haenen

Received: 22 December 2021
Accepted: 9 January 2022
Published: 13 January 2022

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



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

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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

2. Results

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

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

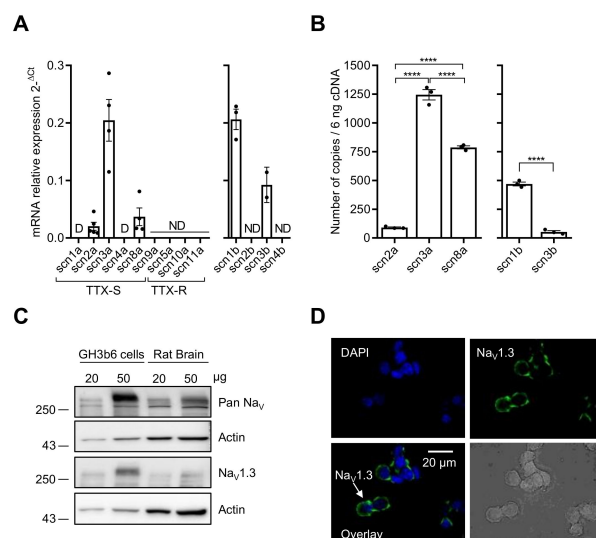


Figure 1. Nav channel expression in GH3b6 cells. (A) The mRNA expression levels of all α and β subunits were first determined by relative RT-qPCR. (B) RT-qPCR with absolute quantification for the genes, which were detected by relative RT-qPCR. One-way ANOVA (**** $p < 0.0001$) followed by Tukey post-hoc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

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

Thus, it is likely that the $\text{Nav}_{1.3}$ channel subtype endorses the genesis of voltage-activated Na^+ current in GH3b6 cells. To address this hypothesis, we characterized the Na^+ current (I_{Na}) in GH3b6 cells by patch-clamp electrophysiology. As expected, depolarizing pulses triggered inward currents, which were blocked by a low concentration of TTX (300 nM, Figure 2A), in accordance with the presence of TTX-S Nav channels as previously described in GH3 cells [27,28]. Current–voltage relationships showed that I_{Na} activated between -45 and -40 mV, gradually increased to a maximum current density of -82.87 ± 12.17 pA/pF at -5 mV, and reversed at $+58.20 \pm 5.14$ mV (Figure 2A). We also observed persistent currents at the end of the depolarization pulse (Figure 2A). The voltage dependence of the activation and steady-state inactivation of I_{Na} were assessed using specific voltage-clamp protocols. The normalized conductance or peak current amplitudes were plotted versus voltage and fitted to the Boltzmann equation, yielding a $V_{1/2}$ of -12.23 ± 1.34 mV ($n = 11$) for activation, and a $V_{1/2}$ of -53.58 ± 1.66 mV ($n = 16$) for inactivation (Figure 2B, Table 1). The recovery from inactivation was also examined and the analysis of the data showed that the recovery of I_{Na} is mono-exponential with a time constant of 9.38 ms. These data were in agreement with those previously reported [27,29]. Finally, to confirm that I_{Na} in GH3b6 cells are endorsed by $\text{Nav}_{1.3}$ channels, we tested slow ramp depolarization stimulation (Figure 2D). Our data showed that GH3b6 cells indeed produce a ramp-triggered inward current, which is the hallmark of the $\text{Nav}_{1.3}$ channel [30].

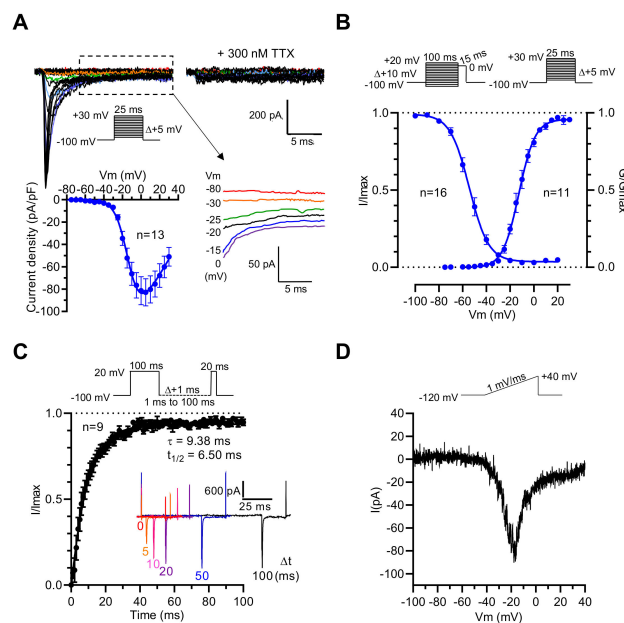


Figure 2. Electrophysiological characterization of I_{Na} in GH3b6 cells by manual patch-clamp recording. (A) Representative family of Na^+ current traces recorded in GH3b6 cells before and after the application of 300 nM TTX. The currents were elicited by stepping the membrane potential (V_m) as shown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

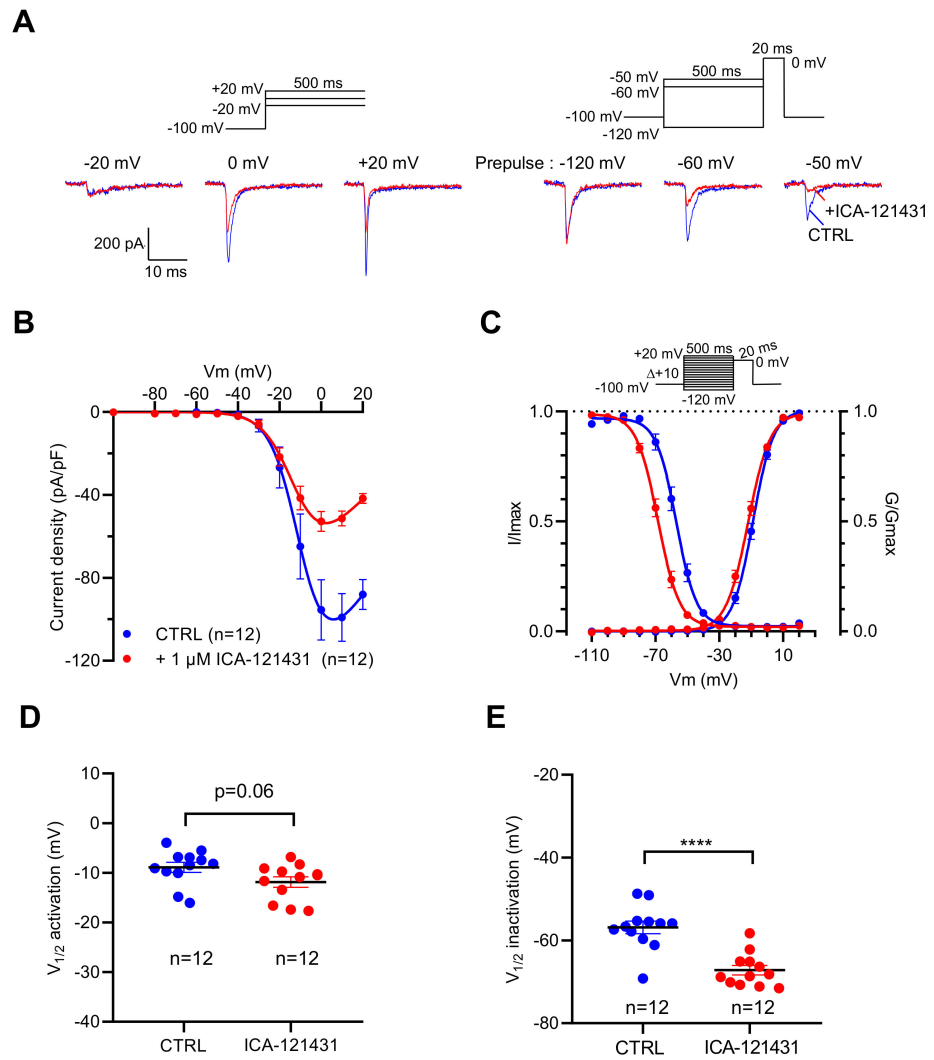


Figure 3. Effects of ICA-121431, a selective inhibitor of $\text{Na}_V1.3$ channels, on I_{Na} recorded in GH3b6 cells by manual patch-clamp. **(A,B)** To illustrate the effects of ICA-121431, examples of superimposed I_{Na} elicited by 500 ms depolarizing pulses (at -20 , 0 , and $+20$ mV) and examples of superimposed I_{Na} elicited by depolarizing pulse at 0 mV immediately after a 500 ms prepulse (-120 , -60 , and -50 mV) are shown. The control traces are in blue (CTRL) and red traces correspond to I_{Na} after ICA-121431 application ($1 \mu\text{M}$). **(B)** Current–voltage relationships and **(C)** activation/inactivation curves of I_{Na} recorded before (blue circles) and after $1 \mu\text{M}$ ICA-121431 (red circles). Comparison of $V_{1/2}$ activation **(D)** and inactivation **(E)** in the absence (CTRL) and in the presence of 1 nM Tf2. Statistical analysis was performed using the two-tailed unpaired *t*-test, **** $p < 0.0001$. Data represent the mean \pm SEM.

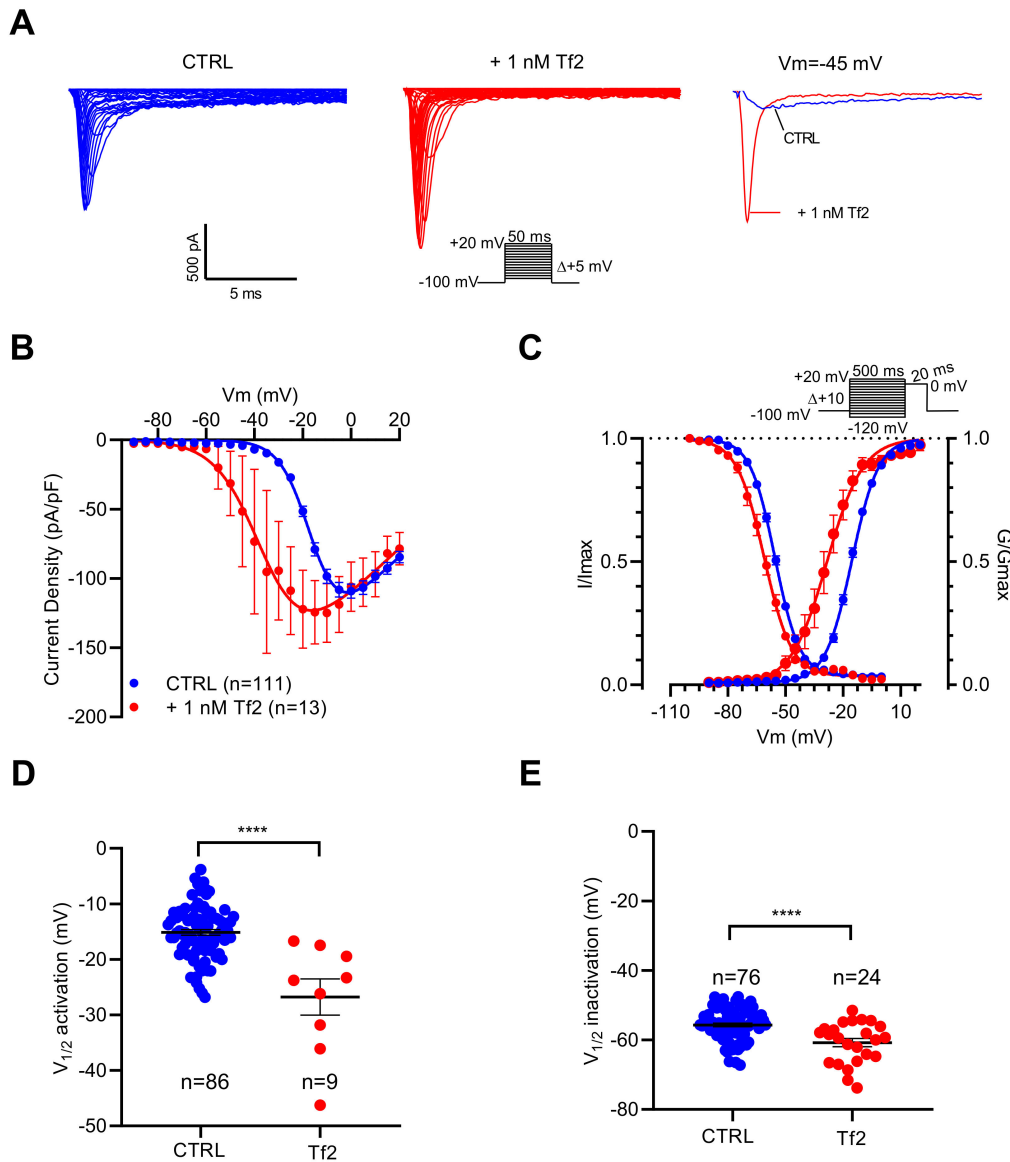


Figure 4. Effects of Tf2, a selective β -scorpion toxin of $\text{Na}_V1.3$ channels, on I_{Na} recorded in GH3b6 cells by automated patch-clamp. **(A)** Representative examples of I_{Na} elicited by 50 ms depolarization steps (protocol inset), in the absence and presence of 1 nM Tf2. To illustrate the strong effect of 1 nM Tf2, superimposed I_{Na} traces at -45 mV are shown. **(B)** Current–voltage relationships **(C)** and activation/inactivation curves of I_{Na} recorded before (blue circles) and after 1 nM Tf2 (red circles). Comparison of $V_{1/2}$ activation **(D)** and inactivation **(E)** in the absence (CTRL) and in the presence of 1 nM Tf2. Statistical analysis was performed using the two-tailed unpaired t -test, **** $p < 0.0001$. Data represent the mean \pm SEM.

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

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

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

To explore the contribution of the Na_v1.3 channel subtype in the genesis of I_{Na} in this cell line, we used ICA-121431 [31–33] and the β-scorpion toxin Tf2 [32,34], two selective ligands of this Na_v channel subtype. At 1 μM, ICA-121431 reduced by 50% the amplitude of I_{Na} when they were elicited by depolarizing pulse from -100 mV, while it almost abolished I_{Na} evoked by the depolarizing pulse from -50 mV (Figure 3A). ICA-121431 reduced the I_{Na} amplitude in a non-voltage-dependent manner (Figure 3B), and thus did not alter the voltage dependency of activation (p = 0.06) (Figure 3C,D). However, ICA-121431 induced a negative shift of 10.3 mV (p < 0.0001) of the voltage dependence of inactivation (Figure 3C,E). These data are in agreement with previous data indicating that ICA-121431 preferentially interacts with inactivated Na_v1.3 channels [31–33]. At a very low concentration (1 nM), Tf2 strongly altered the activation of I_{Na}.

As illustrated in Figure 4A, depolarizing pulses elicited I_{Na} with higher amplitudes in the presence of the Tf2 compared to the control. The current–voltage relationships showed that Na_v channels opened at potentials more negative in the presence than in the absence of Tf2 (Figure 4B). The V_{1/2} of activation was positively shifted by 11.7 mV (p < 0.0001) (Figure 4C,D). In addition, Tf2 induced a negative shift of V_{1/2} of inactivation by 5.1 mV (p < 0.0001) (Figure 4C,E). In conclusion, I_{Na} is sensitive to both ICA-121431 and Tf2, indicating that it is promoted by the Na_v1.3 channel subtype.

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

To explore the impact of Na_v channel activation by neurotoxins on [Ca²⁺]_i, we first determined whether the two most often used Na_v neurotoxins, VTD and BTX, could induce [Ca²⁺]_i elevation in GH3b6 cells. Using the Ca⁺ fluorescent probe, Fura 2-AM, we showed that both VTD and BTX efficiently increased Fura-2 fluorescence, which indicated [Ca²⁺]_i elevation (Figure 5A,D). Thus, both toxins were able to induce [Ca²⁺]_i elevation with different kinetics and in a TTX-sensitive manner (Figure 5A,D). Indeed, the BTX-induced Ca²⁺ response was slow and reached a plateau after 250 s of injection, while in comparison, VTD induced a transient increases in [Ca²⁺]_i, which peaked at ~1 min. The VTD and BTX-induced Ca²⁺ responses were concentration dependent and best fitted by the Hill–Langmuir equation for a bimolecular reaction (Figure 5B,E). As expected, VTD exhibited a lower potency, with an EC₅₀ of 5.39 ± 2.3 μM (Figure 5B), compared to BTX, with an EC₅₀ of 0.66 ± 0.18 μM (Figure 4E). The TTX-induced inhibition of VTD- and BTX-evoked Ca²⁺ responses was fitted by a single site bimolecular equation, yielding similar IC₅₀ values in the nanomolar range in each case (IC₅₀ of 15.63 ± 0.72 nM with VTD and IC₅₀ of 21.13 ± 3.32 nM with BTX), in agreement with the blockade of TTX-S Na_v1.3 channels (Figure 5C,F).

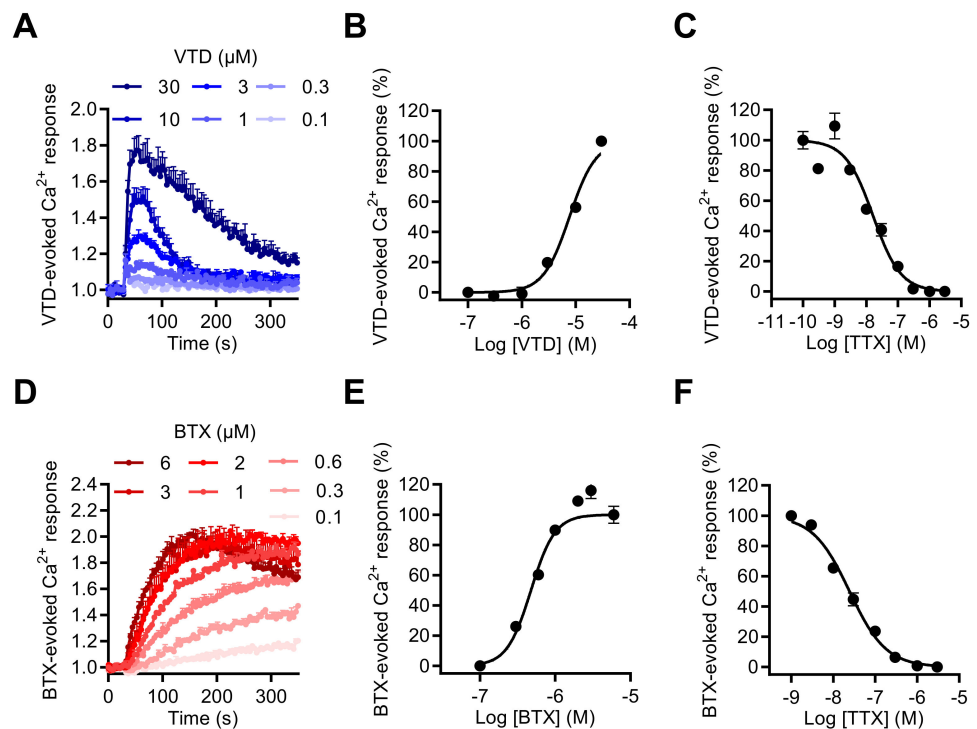


Figure 5. Effects of VTD and BTX, two selective Na_V channel activators, on the intracellular Ca^{2+} level in GH3b6 cells. (A,D) Representative kinetics of Fura-2 fluorescence in GH3b6 cells treated with increasing concentrations of VTD or BTX. The increase of the Fura-2 fluorescence emission ratio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

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

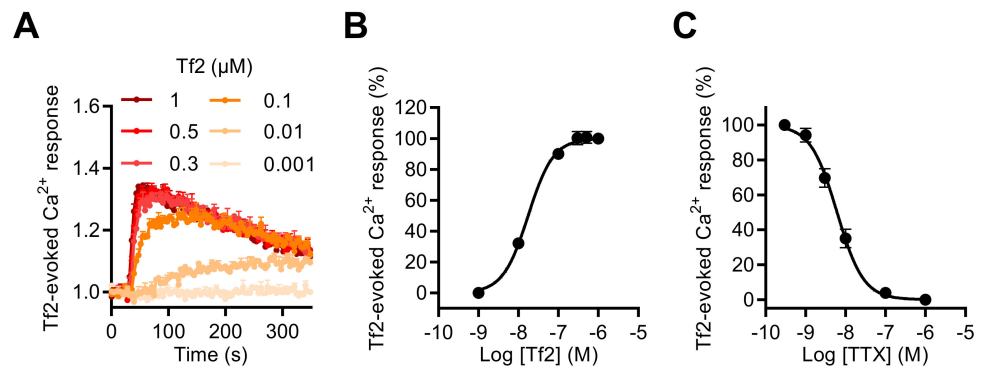


Figure 6. Effect of Tf2, a selective β -scorpion toxin of $\text{Na}_V1.3$, on the intracellular Ca^{2+} level in GH3b6 cells. **(A)** Representative kinetics of Fura-2 fluorescence emission in GH3b6 cells treated with increasing concentrations of Tf2. **(B)** The Ca^{2+} responses induced by Tf2 are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

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

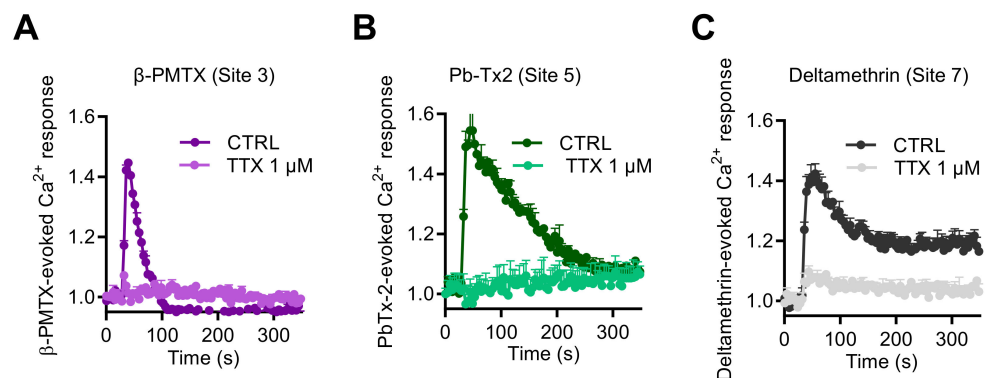


Figure 7. Effects of Na_V channel activators, which bind to Site 3, Site 5, and Site 7, on intracellular Ca^{2+} in GH3b6 cells. Representative Fura-2 fluorescence kinetics traces were obtained after injection of 100 μM β -PMTX **(A)**, 3 μM of Pb-Tx2 **(B)**, or 10 μM of deltamethrin **(C)**. All of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

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

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

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

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

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

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

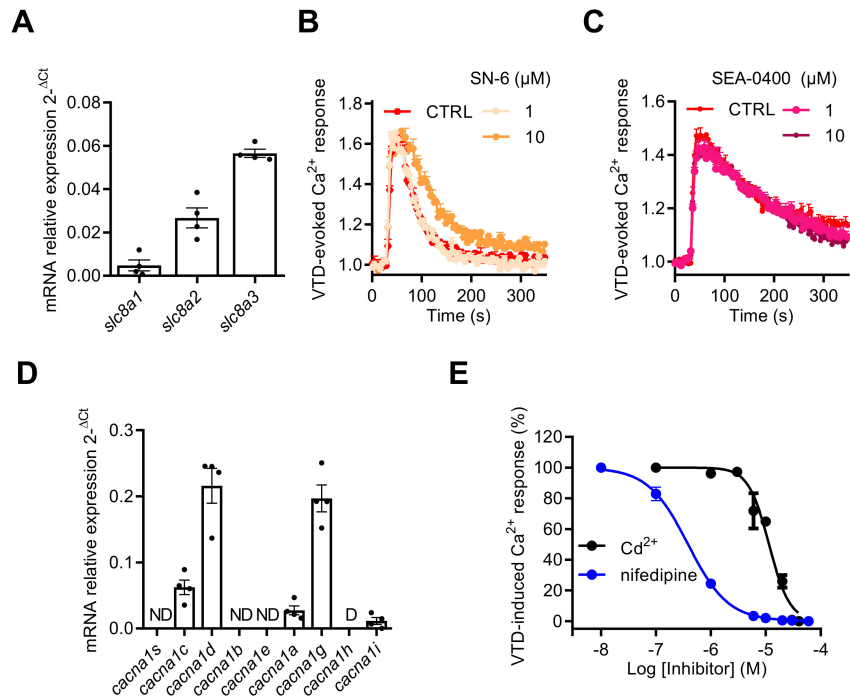


Figure 8. Effects of NCX and Ca_V channel inhibitors on VTD-evoked Ca²⁺ responses in GH3b6 cells. (A) The expression profile of NCX1–3 genes (*slc8a1–3*) in GH3b6 cells was characterized by relative RT-qPCR. The data are mean of mRNA relative expression ± SEM. Effects of SN-6 (B) and SEA0400 (C), two specific inhibitors of NCX, on VTD-induced Ca²⁺ responses in GH3b6 cells. VTD was used at 10 μM. (D) The expression profile of Ca_V channel genes (*cacna1a–e, g–i, and s*) in GH3b6 cells was characterized by relative RT-qPCR. The data are mean ± SEM. D: Disregarded (Ct > 32); ND: Not Detected. (E) Concentration–inhibition relationship of VTD-induced Ca²⁺ responses by nifedipine, a specific blocker of L-type Ca_V channels (IC₅₀ = 1.04 ± 0.65 μM, Hill slope = 1.30 ± 0.11, R² = 0.98) and Cd²⁺, a blocker of Ca_V channels (IC₅₀ = 9.76 ± 1.74 μM, Hill slope = 2.35 ± 0.03, R² = 0.97) with VTD used at 10 μM. Data represent the mean ± SEM (n = 3) from two independent experiments.

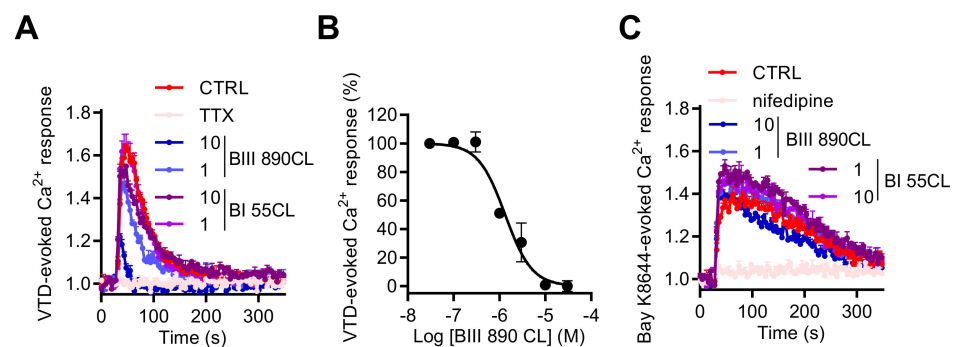


Figure 9. Effects of BIII 890CL on Ca²⁺ responses triggered by VTD or Bay K8644. (A) Representative Fura-2 fluorescence kinetic traces illustrating Ca²⁺ response induced by 10 μM of VTD, alone or co-injected with 1 μM of TTX or with 10 or 1 μM of BIII 890 CL or with BI 55CL (10 and 1 μM), used as a negative control. (B) Concentration–inhibition relationship of VTD-induced Ca²⁺ responses by BIII 890CL, (IC₅₀ = 1.47 ± 0.18 μM, Hill slope = 1.26 ± 0.23, R² = 0.94). (C) Representative Fura-2 fluorescence kinetics traces illustrating Ca²⁺ response induced by 1 μM of Bay K8644, a specific L-type Ca_V channel activator, alone or co-injected with 10 μM of nifedipine or with 10 or 1 μM of BIII 890 CL or with BI 55CL (10 and 1 μM), used as a negative control. Data represent the mean ± SEM (n = 3) of recordings of two independent experiments.

3. Discussion

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

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

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

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

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

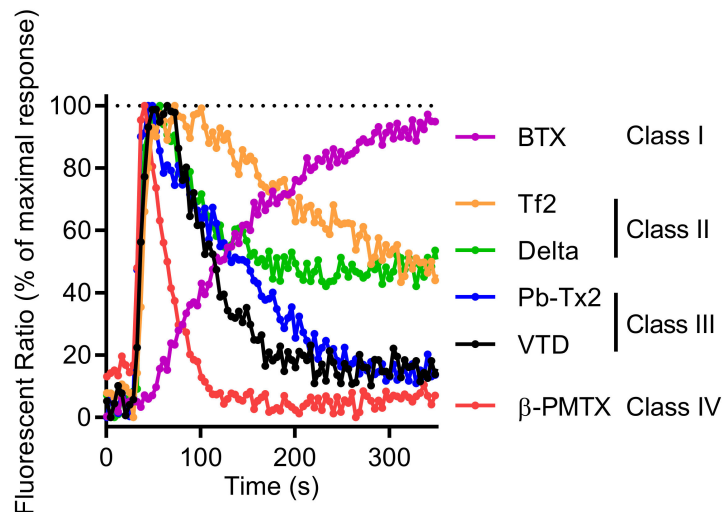


Figure 10. Comparison of representative Fura-2 fluorescence kinetic traces illustrating the Ca^{2+} response induced by 0.6 μM of BTX, 0.5 μM of Tf2, 10 μM of deltamethrin (Delta), 3 μM of Pb-TX2, 10 μM of VTD, and 100 μM of β -PMTX. Each kinetic trace was normalized against the maximum of signal, given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

This strategy could also be useful to characterize new Na_V inhibitors. Indeed, we showed that BIII 890 CL, a use-dependent Na_V channel blocker [43–45], was able to inhibit the VTD-induced Ca^{2+} responses. The absence of effects of BIII 890 CL on Bay K8644-induced Ca^{2+} responses evidenced that BIII 890 CL selectively blocked Na_V channels in GH3b6 cells. In addition, the pharmacological profile towards Na_V channels has not been described. Our data showed for the first time that BIII 890 CL potently inhibits $\text{Na}_V1.3$ channels with IC_{50} in the micromolar range. Since only one report has shown a similar IC_{50} (0.6 μM) on $\text{Na}_V1.8$ channels [44], its selectivity towards the other Na_V channel subtypes deserves to be clarified.

Thus, GH3b6 cells appear as an interesting cellular model, which mainly express the $\text{Na}_V1.3$ channel subtype at the physiological level. This particular Na_V channel subtype is now considered as an emerging pharmacological therapeutic target for neurological diseases, such as epilepsy or neuropathic pain, after channel upregulation due to spinal cord injury [57–60]. The β -scorpion toxin Tf2, which selectively activates the $\text{Na}_V1.3$ subtype, exhibited the strongest EC_{50} value in the nanomolar range, highlighting the relevance of the use of this toxin for investigating the implication of this ion channel in pain [32].

The crosstalk between the Na_V and Ca_V channel appears to be advantageous for characterizing the pharmacological properties of toxins or drugs. The pharmacological profile of BIII 890 CL, which has been claimed to be a potent blocker of the Na_V channel [43], has not been extensively described. In our assay, we rapidly showed that this drug has no effects on LTCC even at high concentrations. The crosstalk between the Na_V and Ca_V channel has been used in screening test-based assay with SH-SY5Y neuroblastoma cells, which has led to the discovery of potent and selective inhibitors of the $\text{Na}_V1.7$ channel subtype [17,61], evidencing the interest in using such a strategy. GH3b6 cells could offer a

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

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals

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

4.2. Cell Line

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

4.3. Quantitative Real-Time PCR

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

4.4. Immunoblot

In total, 100,000 GH3b6 cells per cm^2 were seeded in multiwell 6 plates and cultivated in 2 mL of DMEM/F12 medium supplemented by well until 80% confluence. After 3 days of culture, cells were washed, scratched in ice-cold PBS, and lysed in 100 μL of RIPA buffer (150 mM Tris-HCl, 50 mM Tris, 12 mM sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, pH 8), supplemented with CompleteTM Mini Protease Inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Laval, Quebec). Lysates were centrifuged for 15 min at 15,000 rpm and supernatants were collected. After protein quantification (PierceTM BCA Protein Assay Kit), 20–50 μg of either GH3b6 cells or rat brain protein extracts were separated by 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and were transferred onto a PVDF membrane 0.45 μM (Thermo Fisher Scientific). The primary antibodies used were anti-pan Na_V (rabbit, SP19, ASC-003, Alomone labs, Jerusalem, Israel), anti- $\text{Na}_V1.3$ (rabbit, ASC-004, Alomone labs or mouse, WH0006328M1, Sigma-Aldrich Merck), and anti-actin used as loading control (mouse, clones AC-203 or AC-74, Sigma-Aldrich Merck). Peroxidase-conjugated secondary antibodies and a PierceTM ECL-Plus Chemiluminescence kit (Thermo Fisher Scientific) were used before visualization using a LAS-3000 imager (Fujifilm, Tokyo, Japan).

4.5. Immunofluorescence Staining

In total, 200,000 cells per cm^2 were seeded in a Nunc Lab-Tek chamber slide (Thermo Scientific) and cultivated for 3 days and cultivated until 80% confluence. After being washed with ice-cold PBS, the cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde, rinsed with PBS, and incubated in blocking solution (10% BSA in PBS) for one hour at room temperature (RT). Immunofluorescence staining was processed, first overnight at 4 °C using the mouse primary antibody anti- $\text{Na}_V1.3$ (1/50, WH0006328M1, Sigma-Aldrich) and then for one hour at RT using goat anti-mouse IgG (H + L) cross-adsorbed Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1/200, Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Molecular probes, Invitrogen). The localization and expression of the targeted proteins were visualized using a Nikon Eclipse TE2000S confocal microscope, and the images were analyzed using the Metamorph[®] software. Control experiments excluding the primary antibody were performed to verify the specificity of the fluorescence.

4.6. Measurement of Intracellular Ca^{2+}

GH3b6 cells were plated at a density of 100,000 cells by well (96 wells black/clear bottom plate) in 100 μL of DMEM/F12 medium supplemented by well. Twenty-four hours after plating, cells were incubated with Fura-2 AM. The Fura-2 AM dye (10 mM, DMSO) was freshly prepared in a Fura-2 buffer composed of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) supplemented (in mM): 2.5 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES-K, and 0.5% BSA (pH 7.4). Cells were first incubated with Fura-2 AM (4 μM) and Pluronic[®]-F127 acid (0.02%) in Fura-2 buffer for 60 min at RT. After washing, cells were incubated with Fura-2 buffer for 60 min for a complete de-esterification of the dye. The plates were illuminated at 340 and 380 nm excitation wavelengths and the fluorescence emission spectra was recorded at 510 nm using a FlexStation[®] 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader. After a 30 s baseline, Na_V activators including VTD, BTX, Tf2, PbTx-2, β -PMTX, and deltamethrin and Bay K8644 were automatically injected, and the fluorescence emission spectra were monitored for 320 s at an acquisition frequency of 0.25 Hz. Co-injection of Na_V (TTX, BIII 890 CL, or its negative control BI 55 CL) or NCX (SN-6, SEA 0400) or LTCC (nifedipine, CdCl_2) inhibitors was achieved with activators. All experiments were performed in triplicate at least twice. Data analysis was performed using the SoftMax Pro 5.4.1 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.7. Manual Patch-Clamp Experiments

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

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

4.8. High-Throughput Electrophysiology

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

4.9. Data Analysis

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

5. Conclusions

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

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

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

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

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

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

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

Abbreviations

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

References

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

8. England, S.; de Groot, M.J. Subtype-Selective Targeting of Voltage-Gated Sodium Channels. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 1413–1425. [[CrossRef](#)]
9. Berman, F.W.; Murray, T.F. Brevetoxin-Induced Autocrine Excitotoxicity Is Associated with Manifold Routes of Ca²⁺ Influx. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 1443–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Dravid, S.M.; Baden, D.G.; Murray, T.F. Brevetoxin Activation of Voltage-Gated Sodium Channels Regulates Ca Dynamics and ERK1/2 Phosphorylation in Murine Neocortical Neurons. *J. Neurochem.* **2004**, *89*, 739–749. [[CrossRef](#)]
11. Fekete, Á.; Franklin, L.; Ikemoto, T.; Rózsa, B.; Lendvai, B.; Vizi, E.S.; Zelles, T. Mechanism of the Persistent Sodium Current Activator Veratridine-evoked Ca²⁺ Elevation: Implication for Epilepsy. *J. Neurochem.* **2009**, *111*, 745–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Li, W.I.; Berman, F.W.; Okino, T.; Yokokawa, F.; Shioiri, T.; Gerwick, W.H.; Murray, T.F. Antillatoxin Is a Marine Cyanobacterial Toxin That Potently Activates Voltage-Gated Sodium Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7599–7604. [[CrossRef](#)]
13. Meder, W.; Fink, K.; Zentner, J.; Göthert, M. Calcium Channels Involved in K⁺- and Veratridine-Induced Increase of Cytosolic Calcium Concentration in Human Cerebral Cortical Synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *290*, 1126–1131. [[PubMed](#)]
14. George, J.; Baden, D.G.; Gerwick, W.H.; Murray, T.F. Bidirectional Influence of Sodium Channel Activation on NMDA Receptor-Dependent Cerebrocortical Neuron Structural Plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 19840–19845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kopper, K.L.; Adorante, J.S. Regulation of Intracellular Calcium in N1E-115 Neuroblastoma Cells: The Role of Na⁺/Ca²⁺ Exchange. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2002**, *282*, C1000–C1008. [[CrossRef](#)]
16. LePage, K.T.; Goeger, D.; Yokokawa, F.; Asano, T.; Shioiri, T.; Gerwick, W.H.; Murray, T.F. The Neurotoxic Lipopeptide Kalkitoxin Interacts with Voltage-Sensitive Sodium Channels in Cerebellar Granule Neurons. *Toxicol. Lett.* **2005**, *158*, 133–139. [[CrossRef](#)]
17. Vetter, I.; Mozar, C.A.; Durek, T.; Wingerd, J.S.; Alewood, P.F.; Christie, M.J.; Lewis, R.J. Characterisation of Na(v) Types Endogenously Expressed in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 1562–1571. [[CrossRef](#)]
18. Fletcher, P.A.; Sherman, A.; Stojilkovic, S.S. Common and Diverse Elements of Ion Channels and Receptors Underlying Electrical Activity in Endocrine Pituitary Cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *463*, 23–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Verkhatsky, A.; Trebak, M.; Perocchi, F.; Khananshvili, D.; Sekler, I. Crosslink between Calcium and Sodium Signalling. *Exp. Physiol.* **2018**, *103*, 157–169. [[CrossRef](#)]
20. Szabat, M.; Modi, H.; Ramracheya, R.; Girbinger, V.; Chan, F.; Lee, J.T.C.; Piske, M.; Kamal, S.; Carol Yang, Y.H.; Welling, A.; et al. High-Content Screening Identifies a Role for Na⁺ Channels in Insulin Production. *R. Soc. Open Sci.* **2015**, *2*, 150306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Vandael, D.H.F.; Ottaviani, M.M.; Legros, C.; Lefort, C.; Guérineau, N.C.; Allio, A.; Carabelli, V.; Carbone, E. Reduced Availability of Voltage-Gated Sodium Channels by Depolarization or Blockade by Tetrodotoxin Boosts Burst Firing and Catecholamine Release in Mouse Chromaffin Cells. *J. Physiol.* **2015**, *593*, 905–927. [[CrossRef](#)]
22. Stojilkovic, S.S.; Bjelobaba, I.; Zemkova, H. Ion Channels of Pituitary Gonadotrophs and Their Roles in Signaling and Secretion. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 126. [[CrossRef](#)]
23. Zhang, Q.; Chibalina, M.V.; Bengtsson, M.; Groschner, L.N.; Ramracheya, R.; Rorsman, N.J.G.; Leiss, V.; Nassar, M.A.; Welling, A.; Gribble, F.M.; et al. Na⁺ Current Properties in Islet α - and β -Cells Reflect Cell-Specific Scn3a and Scn9a Expression. *J. Physiol.* **2014**, *592*, 4677–4696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Beltran-Parrazal, L.; Charles, A. Riluzole Inhibits Spontaneous Ca²⁺ Signaling in Neuroendocrine Cells by Activation of K⁺ Channels and Inhibition of Na⁺ Channels. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 881–888. [[CrossRef](#)]
25. Campos, F.V.; Coronas, F.I.V.; Beirão, P.S.L. Voltage-Dependent Displacement of the Scorpion Toxin Ts3 from Sodium Channels and Its Implication on the Control of Inactivation. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 1115–1122. [[CrossRef](#)]
26. Kushmerick, C.; Romano-Silva, M.A.; Gomez, M.V.; Prado, M.A. Changes in Ca²⁺ Channel Expression upon Differentiation of SN56 Cholinergic Cells. *Brain Res.* **2001**, *916*, 199–210. [[CrossRef](#)]
27. Dubinsky, J.M.; Oxford, G.S. Ionic Currents in Two Strains of Rat Anterior Pituitary Tumor Cells. *J. Gen. Physiol.* **1984**, *83*, 309–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Matteson, D.R.; Armstrong, C.M. Na and Ca Channels in a Transformed Line of Anterior Pituitary Cells. *J. Gen. Physiol.* **1984**, *83*, 371–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kushmerick, C.; Kalapothakis, E.; Beirão, P.S.; Penaforte, C.L.; Prado, V.F.; Cruz, J.S.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Gomez, M.V.; Romano-Silva, M.A.; et al. Phoneytria Nigriventer Toxin Tx3-1 Blocks A-Type K⁺ Currents Controlling Ca²⁺ Oscillation Frequency in GH3 Cells. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 1472–1481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Theile, J.W.; Cummins, T.R. Recent Developments Regarding Voltage-Gated Sodium Channel Blockers for the Treatment of Inherited and Acquired Neuropathic Pain Syndromes. *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*, 54. [[CrossRef](#)]
31. Garrison, C.E.; Guan, W.; Kato, M.; Tamsett, T.; Patel, T.; Sun, Y.; Pathak, T.P. Structure-Activity Relationship Evaluation of Wasp Toxin β -PMTX Leads to Analogs with Superior Activity for Human Neuronal Sodium Channels. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 353–357. [[CrossRef](#)]
32. Israel, M.R.; Dash, T.S.; Bothe, S.N.; Robinson, S.D.; Deuis, J.R.; Craik, D.J.; Lampert, A.; Vetter, I.; Durek, T. Characterization of Synthetic Tf2 as a NaV1.3 Selective Pharmacological Probe. *Biomedicines* **2020**, *8*, 155. [[CrossRef](#)]
33. McCormack, K.; Santos, S.; Chapman, M.L.; Krafte, D.S.; Marron, B.E.; West, C.W.; Krambis, M.J.; Antonio, B.M.; Zellmer, S.G.; Printzenhoff, D.; et al. Voltage Sensor Interaction Site for Selective Small Molecule Inhibitors of Voltage-Gated Sodium Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E2724–E2732. [[CrossRef](#)]

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

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

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

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

signé par l'étudiant(e) le **21 / 11 / 2022**

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

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Étude du rôle des canaux Na^+ dépendant du potentiel dans la vasomotricité des artères de résistance.

Mots clés : Canaux Na^+ dépendant du potentiel, vasomotricité, artères mésentériques, vératridine, échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

Résumé : L'expression des canaux Na^+ dépendant du potentiel (canaux Na_v) a été bien décrite dans les artères, cependant leur rôle physiologique dans la vasomotricité reste à démontrer. Leur activation a des effets opposés sur des artères de résistance, à savoir, une vasoconstriction des artères mésentériques (MA) de rat et une vasorelaxation des artères crémastériques de souris. Cette thèse a donc pour objectif de préciser le rôle de ces canaux dans la vasomotricité des MA de souris par une approche pharmacologique basée sur l'utilisation de toxines sélectives, l'une inhibitrice, la tétrodotoxine (TTX) et l'autre activatrice, la vératridine (VTD).

Dans une 1^{ère} étude, nous avons caractérisé l'expression des canaux Na_v dans l'endothélium et la media de l'aorte et de différentes branches des MA : les MA de 1^{er} ordre (FOMA) et les artères cécocoliques (CA). Ces artères expriment majoritairement le gène *Scn2a* codant l'isoforme $\text{Na}_v1.2$. En myographie, la TTX a entraîné une relaxation totale des FOMA et des CA, démontrant que les canaux Na_v sont des régulateurs de la contraction de la musculature lisse de l'artère. Par artériographie, nous avons pu montrer que la TTX potentialise la dilatation flux-dépendante des FOMA et des CA, suggérant que les canaux Na_v seraient impliqués dans la mécanotransduction. L'expression de *Scn2a* est significativement diminuée dans les aortes de souris hypertendues à l'angiotensine 2 et de souris âgées. En conclusion, cette 1^{ère} étude propose que les canaux Na_v devraient être considérés comme de nouveaux acteurs de la régulation du tonus vasculaire des MA et notamment de la mécanotransduction. Par ailleurs, la modulation de leur expression dans des modèles d'hypertension et de vieillissement nous laisse supposer que les canaux Na_v seraient impliqués dans les mécanismes physiopathologiques.

Dans une 2^{ème} étude, nous avons caractérisé les effets de l'activation des canaux Na_v par la VTD sur les FOMA et les CA. Nous avons pu démontrer par myographie que la VTD induit une vasoconstriction des FOMA et une vasorelaxation des CA isolées. En présence de prazosine, un antagoniste des α_1 -adrénocepteurs, la contraction des FOMA induite par la VTD est inhibée, indiquant que la toxine a entraîné la libération de noradrénaline par des terminaisons nerveuses sympathiques. Quant aux CA, la vasorelaxation provoquée par la VTD était résistante à la prazosine, mais inhibée par l'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques. Par conséquent, la VTD a causé la libération d'acétylcholine (ACh) par des terminaisons nerveuses parasympathiques présentes dans les CA. Cette réponse vasorelaxante de la VTD est dépendante de la voie du NO. De plus, ces effets vasorelaxants ont été fortement réduits par des antagonistes des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), KB-7943 et SEA0400. Ceci est en accord avec l'expression de NCX1, observée au niveau de l'endothélium. Pour confirmer l'implication du NCX1 dans la production de NO, nous avons utilisé une lignée de cellules endothéliales de souris. L'élévation du Ca^{2+} intracellulaire induite par l'ACh est très réduite par les antagonistes des NCX et également un inhibiteur de protéine kinase C (PKC). En conclusion de cette 2^{ème} étude, la VTD modifie de façon opposée la contractilité des FOMA et des CA en agissant sur leur innervation motrice différente. Les FOMA ont une innervation sympathique motrice, alors que les CA disposeraient d'une innervation motrice principalement parasympathique. Par ailleurs, le NCX1 endothélial serait un acteur à considérer dans l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire à l'origine de l'activation de la voie du NO et il pourrait être activé par la PKC.