UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
*Biologie Santé*
Spécialité : « *Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale* »

Par
**Andréa FONTENEAU**

## Le canal sodique voltage-dépendant $Na_v1.5$ : expressions pulmonaires et rôles potentiels dans la fonction respiratoire chez la souris.

**Thèse présentée et soutenue à Nantes, le lundi 1er octobre 2018**
**Unité de recherche : l'institut du thorax, Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291**

**Composition du Jury :**

| | |
|---|---|
| Patricia LEMARCHAND<br>Présidente du jury | Professeur des universités-Praticien hospitalier, Nantes |
| Flavien CHARPENTIER<br>Examinateur | Directeur de recherche INSERM, Nantes |
| Sébastien ROGER<br>Christelle GUIBERT<br>Rapporteurs | Maître de conférences des Universités, Tours<br>Chargée de recherche INSERM, Bordeaux |
| Thierry LE TOURNEAU<br>Directeur de thèse | Professeur des universités-Praticien hospitalier, Nantes |
| Gilles TOUMANIANTZ<br>Co-encadrant de thèse | Maître de conférences des Universités, Nantes |

# REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr. Hervé LE MAREC et le Dr. Richard REDON, directeurs de l'institut du thorax, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Merci aux Dr. Bijan GALEH-MARZBAN et Dr. Vincent SAUZEAU d'avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse. Vincent, merci pour ta disponibilité, tes conseils, et pour avoir suivi attentivement mon évolution au sein du laboratoire.

Je remercie le Dr. Flavien CHARPENTIER de m'avoir accueilli dans l'équipe IIa. Merci également pour votre disponibilité, et pour avoir accepté de participer à mon comité de suivi et à mon jury de thèse.

Merci aux Dr. Christelle GUIBERT, Dr. Sébastien ROGER, Dr. Magali SAVIGNAC et Pr. Patricia LEMARCHAND d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury et pour le temps consacré à examiner mes travaux.

À Thierry LE TOURNEAU, mon directeur de thèse, merci de m'avoir permis de réaliser ce travail durant trois ans, et d'avoir participé à la relecture de mon article et de ma thèse.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Gilles TOUMANIANTZ, mon encadrant de thèse. Votre confiance m'a permis de devenir pleinement autonome dans la réalisation de ce projet de recherche. Merci également de m'avoir donné l'opportunité d'apprendre la chirurgie, de faire de l'enseignement, et d'avoir participé à la rédaction de mon article et à la relecture de ma thèse.

## *À mes collègues,*

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes du laboratoire avec qui j'ai eu la chance de travailler.

Le bureau 227, merci pour nos nombreux échanges (scientifiques ou non), et pour tous les kilos de sucreries que l'on a pu partager : Leslie, merci pour ton extrême gentillesse, ta disponibilité, et plus généralement pour le soutien que tu apportes à tous les membres du laboratoire qui font appel à toi ; Benoît, merci pour ta patience et ta confiance lors de mon

arrivée en Master en tant que débutante dans le laboratoire ; Émeline et Alice, dans les difficultés comme dans les bons moments, merci d'avoir été des alliées de confiance et de fous-rires.

« Les Agnès », merci pour tout ce que vous m'avez appris, sur le plan technique et sur tant d'autres sujets : Agnès C., merci pour ton efficacité, ta réactivité, ta rigueur, et pour le souci que tu te fais de chacun des doctorants en détresse que tu croises sur ton chemin ; Agnès H., merci pour ta disponibilité, ton implication, ton oreille attentive et ta bienveillance. Les longues heures passées à l'animalerie auraient paru une éternité sans ton énergie communicative.

« Les Magnans » : Marie-Aude, tu m'auras presque tout appris sur l'expérimentation animale et sur les investigations fonctionnelles respiratoires. Pour résumer, tu auras été indispensable à la réalisation de ces travaux, et pour cela un grand merci à toi. Je te remercie également pour ta patience, ta bonne humeur, et pour m'avoir remis officiellement mon « Bertrand », un diplôme dont je suis tout particulièrement fière ; Grégory, merci d'avoir consacré du temps à mon projet et d'avoir été attentif à mon évolution en fin de thèse, tes conseils m'ont été d'une grande aide au cours de cette dernière année.

« Les Loirands » : Nathalie V. et Florian D., merci pour vos très nombreux conseils techniques et scientifiques.

Merci à tout le personnel logistique et administratif, en particulier Corinne, dont le travail considérable nous permet d'éviter un grand nombre de soucis.

À tous les doctorants du laboratoire, merci pour votre bonne humeur et votre solidarité. Claire, merci pour toutes tes adorables petites attentions (culinaires et autres). Martin et Damien, merci pour votre bonne humeur et votre optimisme constant.

Je tiens à remercier les étudiants qui ont participé à mon évolution en tant qu'encadrante de stage ou en tant que monitrice d'enseignements (surtout Albane qui, pas de chance, a dû me subir avec ces deux casquettes !)

Enfin, merci aux membres des différentes plateformes avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler, en particulier ceux de l'Unité Thérapeutique Expérimentale et de la plateforme MicroPiCell.

## *À mes amis,*

À Aurélie, Camille, Ingrid, Lucie, Sophie et Mädli, merci pour votre amitié depuis tant d'années.

À Antoine, merci de m'avoir donné de ton temps et de ton énergie quand j'en avais besoin. Tu es un ami exceptionnel.

À Morgane, merci d'être mon amie la plus fidèle depuis l'enfance et d'avoir toujours cru en moi.

À vous mes morues, que dire à part que cette thèse c'est avec vous et surtout grâce à vous que je l'ai réalisée. Notre complicité aura été essentielle à mon équilibre, que ce soit de manière hebdomadaire chez Etienne accompagnées d'une (ou plusieurs) bière(s) et de certains nycthémères douloureux ; autour de nos gazinières chaque mois, à savourer des festins à s'en faire des vergetures ; enfin lors d'occasions plus exceptionnelles comme à Madrid, à laver nos pieds dans le bidet… Quoi qu'il en soit, ces instants passés ensemble font pour moi partie des meilleurs souvenirs de cette aventure doctorale.

Jeanne, on s'est rencontrées au premier semestre de la première année de fac, et voilà où ça nous a mené ! Merci pour ton empathie, ton énergie, et surtout pour ton grand dévouement pour tes amis dont je suis particulièrement fière de faire partie.

LaËtitia, la force tranquille, merci d'avoir été un exemple de résilience et de persévérance pendant cette thèse. Et aussi « merci » pour les nombreux dossiers photos et vidéos compromettants que tu as accumulés sur nous...

Laure, nos nombreux points communs et ta grande ouverture d'esprit nous auront permis de partager énormément de difficultés. Merci d'avoir été une confidente attentive et sincère.

Justine, ma co-équipière de choc. Merci d'avoir été là au quotidien, de m'avoir donné de l'énergie quand j'étais fatiguée, de m'avoir fait rire quand j'étais déprimée, de m'avoir encouragée quand j'ai douté, de m'avoir épaulée quand j'étais débordée, de m'avoir écoutée quand j'étais submergée. On aura vécu de vraies sensations fortes pendant 5 ans au labo, et je suis chanceuse d'avoir pu vivre ça avec toi.

## *À ma famille,*

À mes frangin(e)s : Joëlle, Ayrton, Elisabeth ; à mes « beaufs » Pierre et Maxime ; à mes nièces Clémence et Lyana, et enfin à mes grands-parents. Merci pour votre affection et pour le soutien indéfectible que vous m'avez apporté.

À mon Vincent, merci d'avoir eu la folle idée d'entrer dans ma vie au début de ma troisième année de thèse. Cette dernière s'annonçait être la plus difficile, et grâce à toi elle a été la plus belle de toutes.

Enfin, je tiens à dédier cette thèse à mes parents. Papa, Maman : sans votre aide, votre implication, et surtout sans votre amour inconditionnel qui m'a donné tant de liberté et de courage, tout ce travail n'aurait jamais existé. De tous mes accomplissements passés, présents ou futurs, vous rendre fiers sera toujours pour moi la plus précieuse des récompenses. Merci infiniment.

# SOMMAIRE


***TABLE DES ILLUSTRATIONS*** ..... ***1***

***INDEX DES TABLES*** ..... ***3***

***LISTE DES ABREVIATIONS*** ..... ***4***

***AVANT-PROPOS*** ..... ***5***

***INTRODUCTION*** ..... ***8***

**I. Le canal sodique voltage dépendant $Na_v1.5$ : physiologie et physiopathologie ..... 8**

A. $Na_v1.5$ : structure et régulation ..... 8

1. Le gène SCN5A ..... 8

a. Structure du gène *SCN5A* ..... 8

b. Variants d'épissage ..... 8

c. Régulations transcriptionnelles ..... 10

d. Régulations post-transcriptionnelles ..... 11

2. La protéine $Na_v1.5$ ..... 11

a. Structure de la protéine ..... 11

b. Protéines partenaires régulatrices ..... 13

c. Régulations traductionnelles ..... 15

d. Régulations post-traductionnelles ..... 15

B. $Na_v1.5$ et son activité cardiaque ..... 17

1. Le cœur : anatomie et fonction ..... 17

a. Structure et rôle du cœur ..... 17

b. Le couplage excitation contraction dans le cœur ..... 18

c. L'activité électrique du cœur ..... 20

2. Les expressions de $Na_v1.5$ dans le cœur ..... 23

a. Localisation dans le myocarde ..... 23

b. Rôle majeur de $Na_v1.5$ dans l'activité électrique cardiaque ..... 23

3. Pathologies cardiaques associées et modèles d'études ..... 25

a. Pathologies héréditaires ..... 25

b. Pathologies acquises ..... 27

c. Modèles d'études de $Na_v1.5$ dans les pathologies cardiaques ..... 28

**II. Le canal sodique voltage dépendant $Na_v1.5$ : une protéine à explorer dans beaucoup d'autres contextes ..... 30**

A. $Na_v1.5$ dans les autres cellules excitables ..... 30
1. $Na_v1.5$ dans les neurones ..... 30
a. $Na_v1.5$ dans neurones centraux ..... 30
b. $Na_v1.5$ dans les neurones périphériques ..... 31
2. $Na_v1.5$ dans les muscles squelettiques ..... 32
3. $Na_v1.5$ dans les muscles lisses ..... 33
B. $Na_v1.5$ dans les cellules dites non-excitables ..... 36
1. $Na_v1.5$ dans les fibroblastes ..... 36
2. $Na_v1.5$ dans les cellules endothéliales ..... 37
3. $Na_v1.5$ dans les cellules épithéliales ..... 38
4. $Na_v1.5$ dans les cellules gliales ..... 38
5. $Na_v1.5$ dans les cellules immunitaires ..... 39
6. $Na_v1.5$ dans les cellules tumorales ..... 40

**III. Le système respiratoire : physiologie et physiopathologie ..... 45**

A. Anatomie et fonction ..... 45
1. Le système respiratoire ..... 45
2. La zone de conduction ..... 47
3. La circulation pulmonaire ..... 48
4. La zone d'échanges ..... 49
5. La régulation de la réactivité bronchique par les cellules musculaires lisses respiratoires 50
a. La contraction des cellules musculaires lisses ..... 50
b. Le couplage électromécanique ..... 52
c. Le couplage pharmacomécanique ..... 52
B. Les pathologies de la respiration ..... 55
1. L'asthme ..... 55
2. La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ..... 56

**IV. Associations entre les pathologies respiratoires et les pathologies des troubles du rythme cardiaque. ..... 57**

**V. Objectifs du travail de thèse ..... 59**

***MATERIELS ET METHODES..... 60***

**I. Matériels biologiques ..... 60**

A. Souris ..... 60
B. Modèle d'asthme allergique par exposition aux acariens ..... 61
C. Prélèvements pour préparations d'organes ..... 61
D. Préparations de cellules ..... 62

**II. Techniques de biologie moléculaire et de biochimie ..... 62**

A. RT-PCR ..... 62

B. Western Blot ..... 64

C. Colorations histologiques ..... 66

D. Immunofluorescences ..... 66

E. Cytométrie en flux ..... 67

**III. Procédures d'investigations fonctionnelles *ex vivo* et *in vivo* ..... 68**

A. Contractilité *ex vivo* de trachées isolées ..... 68

B. Pléthysmographie corporelle totale barométrique ..... 68

C. Technique des oscillations respiratoires forcées ..... 69

D. Electrocardiographie ..... 70

E. Echocardiographie ..... 71

**IV. Tests de biostatistiques ..... 72**

***RESULTATS ..... 73***

**I. Article : New role of the "cardiac" sodium channel $Na_v1.5$ in lungs: localization and functional involvements in mouse. ..... 73**

**II. Résultats complémentaires sur les remodelages pulmonaires. ..... 101**

A. Expression pulmonaire de $Na_v1.5$ *in situ* ..... 101

B. $Na_v1.5$ et remodelages pulmonaires ..... 102

C. Le modèle murin C57BL/6J *Scn5a*$^{+/-}$ : mise en évidence d'une différence d'expression de l'invalidation génique en fonction du sexe. ..... 104

D. $Na_v1.5$ et réaction immunitaire pulmonaire ..... 107

***DISCUSSION GENERALE ..... 110***

**I. $Na_v1.5$ est exprimé dans les cellules musculaires lisses des voies aériennes. ..... 110**

**I. $Na_v1.5$ est majoritairement exprimé à la membrane plasmique des « cardiomyocytes » veineux dans les poumons. ..... 112**

**II. L'activité électrique de $Na_v1.5$ dans les poumons est nécessaire à la bronchoconstriction induite par la méthacholine. ..... 114**

**III. La diminution d'expression de $Na_v1.5$ n'est pas associée à des remodelages pulmonaires. ..... 119**

**IV. L'expression et la fonction de la protéine $Na_v1.5$ semblent différentes selon le sexe. ..... 122**

**V. Limitations majeures de cette étude.....124**

***CONCLUSION .....127***

***BIBLIOGRAPHIE.....130***

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

*Figure 1.* ***Expression de SCN5A et remodelages pulmonaires en conditions pathologiques.*** ---------- *7*

*Figure 2.* ***Structure du gène Scn5a et ses différentes formes d'épissage.*** ---------- *9*

*Figure 3.* ***Représentation schématique du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$.*** ----------*12*

*Figure 4.* ***Interactions de $Na_v1.5$ avec diverses protéines partenaires régulatrices.*** ----------*14*

*Figure 5.* ***Représentation des complexes macromoléculaires de $Na_v1.5$ selon leurs localisations.*** ----------*14*

*Figure 6.* ***Anatomie du cœur et systèmes circulatoires.*** ----------*18*

*Figure 7.* ***Le couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes.*** ----------*20*

*Figure 8.* ***Le potentiel d'action cardiaque : hétérogénéité électrique du coeur et canaux ioniques impliqués.*** -*22*

*Figure 9.* ***$Na_v1.5$ et activité électrique dans le coeur en condition normale.*** ----------*25*

*Figure 10.* ***Perturbations des courants $I_{Na}$ et $I_{NaL}$ provoqués par les mutations du gène SCN5A, et leurs répercussions sur le potentiel d'action.*** ----------*26*

*Figure 11.* ***Schéma de l'anatomie générale du système respiratoire inférieur humain.*** ----------*46*

*Figure 12.* ***Structure des voies respiratoires saines humaines.*** ----------*48*

*Figure 13.* ***Image de microscopie électronique d'une barrière alvéolo-capillaire.*** ----------*50*

*Figure 14.* ***Schéma illustrant le mécanisme de contraction de la cellule musculaire lisse respiratoire par augmentation du niveau de calcium cytosolique.*** ----------*51*

*Figure 15.* ***Schéma illustrant les mécanismes électromécaniques conduisant à la contraction et à la relaxation de la cellule musculaire lisse respiratoire.*** ----------*52*

*Figure 16.* ***Illustration du mécanisme pharmacomécanique de contraction de la cellule musculaire lisse respiratoire par l'activation du récepteur muscarinique $M_3$.*** ----------*54*

*Figure 17.* ***Illustration du mécanisme pharmacomécanique de relaxation de la cellule musculaire lisse respiratoire par l'activation du récepteur muscarinique M2 et adrénergique β2.*** ----------*55*

*Figure 18.* ***Images d'histologie illustrant la comparaison entre les remodelages des voies respiratoires observées dans l'asthme et dans la BPCO.*** ----------*57*

*Figure 19.* ***Chronologie du protocole de la mise en place du modèle d'asthme allergique HDM chez les souris.*** ----------*61*

*Figure 20.* ***Pléthysmographie corporelle totale barométrique chez la souris in vivo.*** ----------*69*

*Figure 21.* ***Technique des oscillations forcées flexiVent à une fréquence respiratoire imposée chez la souris in vivo.*** ----------*70*

*Figure 22.* ***Représentations des plans d'incidence mesurés par électrocardiographie.*** ----------*71*

*Figure 23.* ***Représentations des plans d'incidence observés par échocardiographie.*** ----------*72*

*Figure 24.* ***Marquages immunofluorescents de coupes congelées de poumons de souris.*** ---------- *101*

*Figure 25.* ***Absence d'effet de l'expression de $Na_v1.5$ sur les remodelages pulmonaires en conditions physiologiques chez les souris femelles.*** ---------- *103*

*Figure 26.* ***Absence de modulation de la fonction cardiaque chez les souris mâles du modèle C57BL/6J Scn5a$^{+/-}$.*** *---------- 105*

*Figure 27.* ***Absence de modulation de la fonction respiratoire chez les souris mâles du modèle C57BL/6J Scn5a$^{+/-}$.*** *---------- 106*

*Figure 28.* ***Expression de $Na_v1.5$ dans l'inflammation chez les souris femelles.*** *---------- 108*

# INDEX DES TABLES

*Table 1.* ***$Na_v1.5$ et ses différentes fonctions à explorer dans les cellules excitables et non-excitables.*** *----------45*

*Table 2.* ***Gènes étudiés sur les plaques de qPCR Qiagen Mouse Woung Healing RT² Profiler Array PAMM-121Z.***

*----------64*

# LISTE DES ABREVIATIONS

***AC :*** *Adénylate cyclase*

***ADN :*** *Acide désoxyribonucléique*

***AMPc :*** *Adénosine monophosphate cyclique*

***AMPK :*** *AMP-activated protein kinase*

***ARN :*** *Acide ribonucléique*

***ARNsh :*** *Short hairpin RNA*

***ATP :*** *Adénosine triphosphate*

***B2M :*** *Beta-2-microglobulin*

***BPCO :*** *Bronchopneumopathie chronique obstructive*

***CaM :*** *Calmoduline*

***CaMK :*** *Calmoduline kinase*

***$Ca_v$ :*** *Canal calcique voltage-dépendant*

***Ct :*** *Cycle threshold*

***CTGF :*** *Connective tissue growth factor*

***Cx :*** *Connexine*

***DAG :*** *Diacylglycérol*

***DP :*** *condition contrôle DMSO/PBS*

***ECG :*** *Electrocardiogramme*

***FGF :*** *Fibroblast growth factor*

***FOXO1 :*** *Forkhead box protein O1*

***GAPDH :*** *Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase*

***GUSB :*** *Beta-glucuronidase*

***HDM :*** *Host dust mite*

***HH :*** *condition pathologique d'asthme allergique à l'HDM*

***HKG :*** *Housekeeping gene*

***HPRT :*** *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase*

***HSP :*** *heat shock protein*

***$I_{Ca}$ :*** *Courant calcique*

***$I_K$ :*** *Courant potassique*

***$I_{Na}$ :*** *Courant sodique*

***IP3 :*** *inositol 1, 4, 5 trisphosphate*

***$K_v$ :*** *Canal potassique voltage-dépendant*

***LOX :*** *Lysyl oxidase*

***LPS :*** *Lipopolysaccharide*

***MLC :*** *Myosin-light-chain*

***MLCK :*** *Myosin-light-chain kinase*

***MLCP :*** *Myosin-light-chain phosphatase*

***MMP :*** *Matrix metalloproteinase*

***$Na_v$ :*** *Canal sodique voltage-dépendant*

***NCX :*** *Sodium-calcium exchanger*

***NFκB :*** *Nuclear factor-kappa B*

***NHE :*** *Sodium–hydrogen antiporter*

***NKX :*** *Homeobox Protein*

***PCR :*** *Polymerase chain reaction*

***Penh :*** *enhanced pause*

***PI3K :*** *Phosphoinositide 3-kinase*

***PKC :*** *Protéine kinase C*

***PLC :*** *Phospholipase C*

***qPCR :*** *uantitative Polymerase chain reaction*

***RBC :*** *Red blood cell*

***RE :*** *Reticulum endoplasmique*

***RhoA :*** *Ras homolog gene family*

***ROCK :*** *Rho-associated protein kinase*

***ROS :*** *Reactive oxygen species*

***Rrs :*** *Résistance du système respiratoire*

***RYR :*** *Ryanodine receptor*

***SEM :*** *Erreur standard à la moyenne*

***SERCA :*** *sarco/endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase*

***SM :*** *Smooth muscle*

***TGF :*** *Transforming growth factor*

***TTX :*** *Tétrodotoxine*

***WT :*** *Wild-type*

# AVANT-PROPOS

Créé en 2004, l'institut du thorax est une structure qui rassemble les soins, l'enseignement et la recherche dans les disciplines cardiovasculaires, respiratoires et métaboliques. Aujourd'hui, l'institut du thorax associe un pôle médical fort au sein du CHU de Nantes, une structure de recherche clinique (CIC 1413, module thorax) labellisée par l'Inserm et la DGOS, et une Unité Mixte de Recherche (Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291) labellisée par l'Inserm, le CNRS et l'Université de Nantes.

Cette unité de recherche, précédemment sous la direction du Professeur Hervé Le Marec, est dirigée par le Docteur Richard Redon depuis janvier 2017. Elle est aujourd'hui forte de 165 membres dont 58 chercheurs. Pour favoriser la réalisation des projets translationnels, l'unité est organisée en 6 équipes aux compétences complémentaires :

- Equipe I : Génétique cardiovasculaire.
- Equipe II :
    - IIa : Arythmies Cardiaques - Canaux ioniques et arythmies cardiaques ;
    - IIb : Arythmies Cardiaques - Insuffisance cardiaque et approches pharmacologiques.
- Equipe III : Signalisation en physiopathologie vasculaire et pulmonaire.
- Equipe IV : Dyslipidémies et lipotoxicité.
- Equipe V : Rythmes mitochondriaux nycthéméraux et maladies métaboliques.
- Equipe VI : Génétique médicale.

J'ai été accueillie dès mes premiers stages de recherche, en Licence 3, par l'équipe IIa, dirigée par le Docteur Flavien CHARPENTIER. Cette équipe est divisée en quatre thèmes de recherche :

- « Le canal $Na_v1.5$ : structure, fonction et implication dans les arythmies et les cardiomyopathies » ;
- « De la biophysique des canaux ioniques au développement de nouvelles approches thérapeutiques des arythmies » ;
- « Insuffisance cardiaque ».

- « Cardiomyocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites (IPs), de nouveaux modèles cellulaires des arythmies cardiaques héréditaires »

Avant mon arrivée dans le laboratoire, un projet de thèse dans mon équipe de recherche portait sur les implications du gène *SCN5A* et de ses variants dans les remodelages ventriculaires. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet, porté par Benoît Jagu, suggéraient une implication du canal sodique $Na_v1.5$ dans les remodelages pathologiques dans un modèle murin d'infarctus du myocarde au cours de la phase post-ischémique. Ces résultats ont conduit l'équipe à s'intéresser aux implications du gène *SCN5A* dans la mise en place de l'insuffisance cardiaque post-infarctus. Or, comme expliqué dans l'introduction, les altérations circulatoires importantes observées dans le cœur gauche au cours de la phase dite décompensée de l'insuffisance cardiaque conduisent à des altérations circulatoires également dans les poumons qui sont anatomiquement en amont. Ces modifications de pression provoquent divers remodelages pulmonaires adaptatifs, structuraux et inflammatoires, essentiellement au niveau vasculaire (Chen et al., 2012). L'hypothèse d'une implication du canal sodique $Na_v1.5$ dans les processus de remodelages cardiaques pathologiques a permis de s'interroger également sur le rôle potentiel de ce canal dans les remodelages pulmonaires dans ce même contexte. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire semblaient confirmer cette hypothèse. En effet il a été montré une diminution de l'expression du gène Scn5a chez des souris sauvages (WT) dès le stade dit compensé de l'insuffisance cardiaque (Figure 1A). Une augmentation de cette expression a également été décrite chez des rats WT dans un autre contexte pathologique grâce à un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire d'origine hypoxique (Figure 1B).

L'expression du gène *SCN5A* dans les poumons a été décrite auparavant dans quelques rares études. Cette expression, fonctionnelle, a été documentée chez l'homme dans des cellules musculaires lisses isolées de vaisseaux sanguins (Firth et al., 2011; Platoshyn, et al., 2005) et chez le lapin dans des cellules musculaires lisses isolées de voies respiratoires (Bradley et al., 2013). Cependant, ces études sont assez limitées dans leur méthodologie : l'expression de ce canal a été étudiée uniquement par la détection de son ARNm et jamais par son expression protéique. De plus, ces travaux sont des études électrophysiologiques, c'est pourquoi seule l'utilisation de la cellule isolée, parfois mise en culture a été évaluée jusqu'alors. Enfin, rien de tout cela n'avait encore jamais été décrit chez la souris, qui est

l'espèce la plus largement étudiée dans les domaines de recherche cardiovasculaire et pulmonaire.

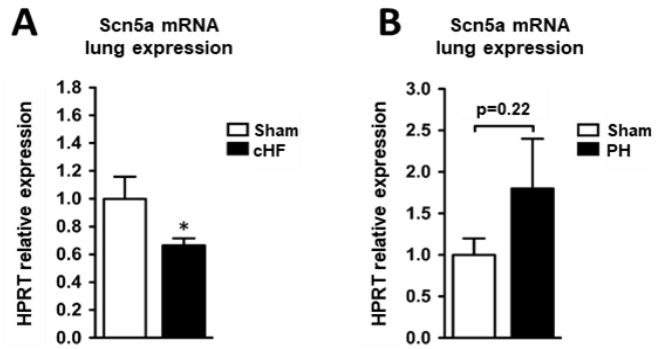


Figure 1. **Expression de *Scn5a* et remodelages pulmonaires en conditions pathologiques.** Expression du gène *Scn5a* dans les poumons d'animaux sauvages *versus* pathologiques, (A) au cours de l'insuffisance cardiaque compensée à 6 semaines post-infarctus du myocarde chez la souris (n=5/condition) et (B) au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire d'origine hypoxique chez le rat (n=5/condition). Les résultats sont représentés par la moyenne ±SEM. Issu de la thèse de Benoît Jagu, 2015. (*cHF* : compensated Heart Failure ; *HPRT* : contrôle ubiquitaire Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase ; *PH* : Pulmonary Hypertension ; *Sham* : contrôle de la procédure. *p<0,05 *versus* Sham).

Le but de mon travail de thèse a été de constituer une base solide de connaissances sur l'expression de $Na_v1.5$ dans les poumons chez la souris en condition physiologique, avant de pouvoir s'intéresser plus tard à son rôle dans les contextes pathologiques. Mes objectifs ont donc été de :

- Faire une description exhaustive de l'expression du canal sodique $Na_v1.5$ dans la sphère respiratoire, en confirmant l'expression du gène Scn5a puis en étudiant l'expression et la localisation précise de la protéine $Na_v1.5$ dans cet organe.

- Etudier le rôle potentiel du canal sodique $Na_v1.5$ dans la sphère respiratoire en étudiant sa fonction *ex vivo* et *in vivo*, en émettant des hypothèses sur les mécanismes potentiellement impliqués.

Afin de réaliser cette étude, nous avons eu accès à un modèle murin initialement utilisé au laboratoire dans les projets de recherche portant sur l'étude des troubles du rythme cardiaque. Ce modèle, développé sur fond génétique C57BL/6J, présente une invalidation hétérozygote du gène *Scn5a* (*Scn5a*$^{+/-}$).

# INTRODUCTION

## I. Le canal sodique voltage dépendant $Na_v1.5$ : physiologie et physiopathologie

### A. $Na_v1.5$ : structure et régulation

#### *1. Le gène SCN5A*

##### a. Structure du gène *SCN5A*

Le gène *SCN5A*, codant pour $Na_v1.5$, appartient à une famille de dix gènes codant pour les diverses sous-unités α des canaux sodiques voltage-dépendants. Il s'étend sur environ 80kb sur le chromosome humain 3p22 et comprend au moins 28 exons (van Stuijvenberg et al., 2010). L'exon 1 et une partie de l'exon 2 forment la région non-codante 5', aussi appelée 5'UTR (UnTranslated Region), la séquence codante du gène *SCN5A* s'étend de l'exon 2 à l'exon 28, et la partie finale de l'exon 28 forme la région non-codante 3' (3'UTR). Cette organisation semble bien conservée parmi les différentes espèces. En effet les gènes *Scn5a* de souris et rat possèdent la même organisation que le gène humain.

##### b. Variants d'épissage

Plus de dix transcrits, issus de différents épissages, ont été détectés suggérant de grandes diversités d'expressions et de régulations pour la protéine $Na_v1.5$. Certains de ces transcrits semblent être générés par des mécanismes bien conservés dans l'évolution, tandis que d'autres semblent dépendant de l'espèce (Rook et al., 2012; van Stuijvenberg et al., 2010) (Figure 2). Ces différents variants décrits n'ont pas encore tous été étudiés en détail (Veerman, Wilde, & Lodder, 2015). Dans les cœurs humain et murin, deux variants majoritaires sont décrits au niveau de l'extrémité 3'UTR. Ils diffèrent au niveau de l'exon 28A codant pour des queues de poly-adénine courte ou longue (Rook et al., 2012). Dans cette même région, trois variants minoritaires ont également été identifiés chez l'Homme, correspondant à l'épissage alternatif de l'exon 28A par les exons 28B, 28C et 28D à l'origine de formes tronquées et non fonctionnelles pour $Na_v1.5$ (Shang et al., 2007). A ce jour, seuls les mécanismes de ce site d'épissage sont réellement décrits et impliquent des interactions avec les protéines RBM25 et

LUC7F3 (Gao & Dudley, 2013). Du côté de l'extrémité 5'UTR, quatre variants d'épissage chez l'Homme et trois chez la souris ont été décrits. Ces derniers diffèrent de la séquence non codante de l'extrémité 5'UTR par un épissage alternatif de l'exon 1 avec l'exon 2, nommés de 1A à 1D (Rook et al., 2012). Cependant, de nombreuses variations de l'organisation génomique ont été observées dans cette région. L'existence de l'exon 1D semble être spécifique de l'Homme et abolir complètement la traduction de $Na_v1.5$. L'exon 1A lui, reste homologue entre les espèces. Les exons 1B et 1C en revanche vont présenter une séquence et une localisation qui vont être différentes entre l'Homme et d'autres mammifères comme le rat, le

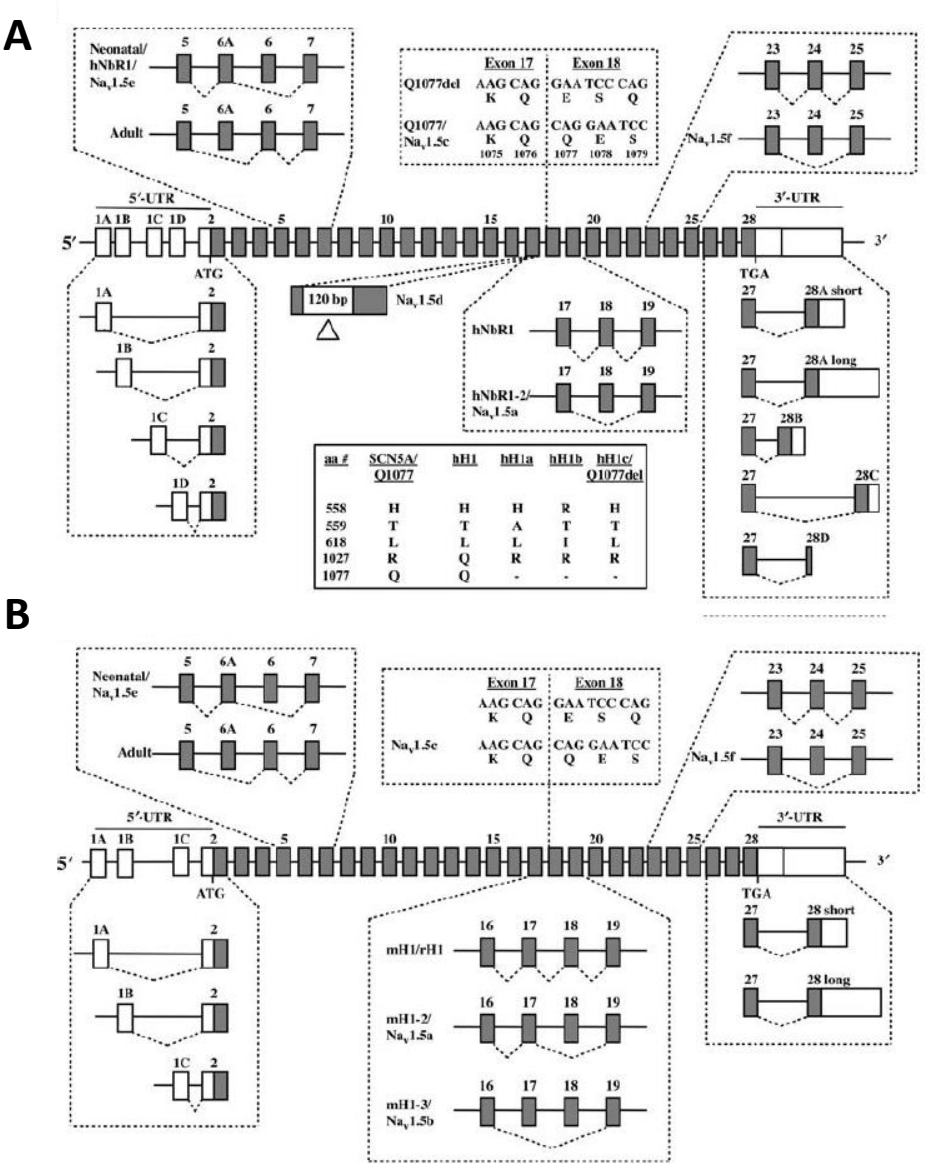


Figure 2. **Structure du gène *SCN5A* et ses différentes formes d'épissage.**
(A) Schéma des gènes *SCN5A* humain et (B) *Scn5a* de souris et rat. Les exons sont illustrés sous forme de rectangles reliés par des lignes représentant les parties introniques. Les régions non-codantes sont en blanc, tandis que les régions codantes sont en gris. Schéma de Rook et al., 2012.

chien ou la souris (van Stuijvenberg et al., 2010). Au niveau de la région codante, il a aussi été rapporté l'existence d'un ARN messager dit néonatal contenant un exon 6A présentant 31 nucléotides, soit 7 acides aminés de différence au niveau de la boucle S3-S4 du domaine DI de la protéine par rapport à l'exon 6 de la forme adulte (Rook et al., 2012). Ce variant fonctionnel est notamment décrit dans les cellules cancéreuses du sein (Chioni et al., 2010; Yamaci et al., 2017), du colon (Baptista-Hon et al., 2014; House et al., 2010), et dans l'astrocytome (Xing et al., 2014), où il est associé à une invasivité accrue et au développement de métastases (Besson et al., 2015). Les autres variants d'épissage de *SCN5A* sont répertoriés avec leurs effets potentiels sur $Na_v1.5$ dans les revues généralistes de Rook et ses collaborateurs en 2011 ainsi que dans celle de Veerman et ses collaborateurs en 2015.

### c. Régulations transcriptionnelles

L'expression du canal sodique $Na_v1.5$ n'est pas ubiquitaire dans l'organisme, et dépend donc d'une régulation transcriptionnelle de son gène *SCN5A*. Pour le gène humain, des séquences associées avec l'exon 1A, 1B, 1C et 1D jouant un rôle promoteur ont été identifiées. Ces promoteurs alternatifs P1, P2 et P3 génèrent des variants d'ARNm différents par la nature de leurs région 5'-UTR tout en codant pour la même protéine $Na_v1.5$ (van Stuijvenberg et al., 2010; Veerman et al., 2015). Parallèlement chez la souris, certains facteurs de transcription ont été identifiés comme modulant l'expression du gène *Scn5a*.

Il a été décrit dans la littérature un effet inhibiteur de l'expression du gène *SCN5A* par les ROS (Reactive Oxygen Species), passant par l'activation de deux facteurs de transcription : Le facteur de transcription FOXO1 (Mao et al., 2012) dans un modèle de cardiomyocyte en culture HL-1, et le facteur NFκB (Shang et al., 2008) dans des modèles cellulaires de cardiomyocytes de rats néonataux en culture H9c2, ou fraîchement isolés. Il est expliqué qu'une augmentation de production de ROS induit l'activation de ces deux facteurs *via* leur translocation dans le noyau, conduisant ainsi à une répression de l'expression du gène *SCN5A* par fixation sur la région promotrice. Inversement, une autre étude réalisée chez la souris adulte montre que le facteur de transcription TBX5 stimule l'expression de *SCN5A* dans le système de conduction ventriculaire par fixation sur une région amplificatrice « enhancer » en amont du gène (Arnolds, Patel, & Moskowitz, 2012). L'étude suggère également qu'un équilibre des activités des facteurs TBX5, TBX3 et NKX2-5 est essentiel pour cette régulation régionale de $Na_v1.5$ dans le système de conduction cardiaque.

### d. Régulations post-transcriptionnelles

Au niveau post-transcriptionnel, il existe très peu d'études à ce jour concernant la modulation de la traduction de l'ARNm *SCN5A*. Il a toutefois été montré une implication du miR-192-5p dans la régulation négative de la stabilité de l'ARNm de *SCN5A*, de l'expression de la protéine $Na_v1.5$ et de la réduction de la densité du courant de sodium de pointe généré par $Na_v1.5$ dans des cellules en culture SW620 et HEK293 (Zhao et al., 2015). Il a également été montré une régulation cette fois-ci positive de la stabilité de l'ARNm de *SCN5A* et de l'expression de la protéine $Na_v1.5$ par le miR-219 dans des cellules HL-1 (Daimi et al., 2015).

## *2. La protéine $Na_v1.5$*

### a. Structure de la protéine

Les canaux sodiques voltage dépendants sont des protéines transmembranaires localisées au niveau de la membrane plasmique des cellules excitables (Amin et al., 2010). Ces canaux sont constitués d'une sous-unité α comprenant le pore et donnant son nom aux différentes isoformes du canal, et de sous-unités dites accessoires β. Différentes isoformes de ce canal existent, ayant chacune un site d'expression privilégié (Veerman et al., 2015) :

- $Na_v1.5$ est la forme majoritairement exprimée dans le cœur ;
- $Na_v1.4$ est la forme principalement retrouvée dans les muscles squelettiques ;
- $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.6$ et $Na_v2.1$ sont majoritairement exprimés dans le système nerveux central ;
- $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ sont les formes les plus souvent décrites dans le système nerveux périphérique.

Il est possible de discriminer ces différentes isoformes par leurs activités électriques, qui présentent des sensibilités différentes à l'inhibition par la tétrodotoxine (TTX). Six d'entre elles sont hautement sensibles à la TTX avec des valeurs d'IC50 dans la gamme du nanomolaire. Les trois autres, l'isoforme cardiaque $Na_v1.5$ et les isoformes neuronales $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$, sont relativement résistantes à la TTX (IC50 ≥ 1 µM) (Zimmer, Haufe, & Blechschmidt, 2014). Toutefois, l'isoforme $Na_v1.5$ est moins résistante que les isoformes $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$, le courant sodique $Na_v1.5$ pouvant donc être également inhibé par la TTX mais à de très fortes doses.

La sous-unité α nommée $Na_v1.5$, encodée par le gène *SCN5A*, est une protéine transmembranaire glycosylée qui va compter entre 2015 et 2016 acides aminés en fonction des différents variants d'épissage, avec un poids moléculaire apparent d'environ 220kDa (Abriel, 2010). Elle va être organisée en une extrémité N terminale cytoplasmique, quatre domaines répétitifs transmembranaires homologues (DI à DIV) reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques, et une extrémité C terminale cytoplasmique. Chaque domaine répétitif comprend six segments transmembranaires en hélice α (S1 à S6) connectés par une alternance de boucles cytoplasmiques et extracellulaires (Figure 3A). Une fois insérés dans la bicouche lipidique, la conformation prise par les quatre domaines permet l'association des segments S5 et S6 de chaque domaine pour former le pore du canal (Figure 3B). De plus, les boucles extracellulaires des segments S5 et S6 appelées boucles P, ou « P-loop », contiennent une composition particulière en acides aminés leur conférant la sélectivité du canal pour les ions sodium (Amin et al., 2010; Catterall, 2000; Detta, Frisso, & Salvatore, 2015; Remme & Bezzina, 2010). Le segment S4 de chaque domaine, comprenant une succession de motifs comportant un résidu chargé positivement (Lysine ou Arginine) suivi de deux résidus hydrophobes, présente un rôle crucial dans l'activation du canal. En effet c'est lui qui assure le rôle de détecteur de dépolarisation membranaire, d'où son nom de « voltage-sensor ». Enfin, la particule d'inactivation localisée dans la boucle reliant DIII et DIV comprend le motif « IFM » (pour $Na_v1.5$, Ile1485–Phe1486-Met1487) qui intervient dans l'inactivation rapide des canaux sodiques (Detta et al., 2015) (Figure 3A).

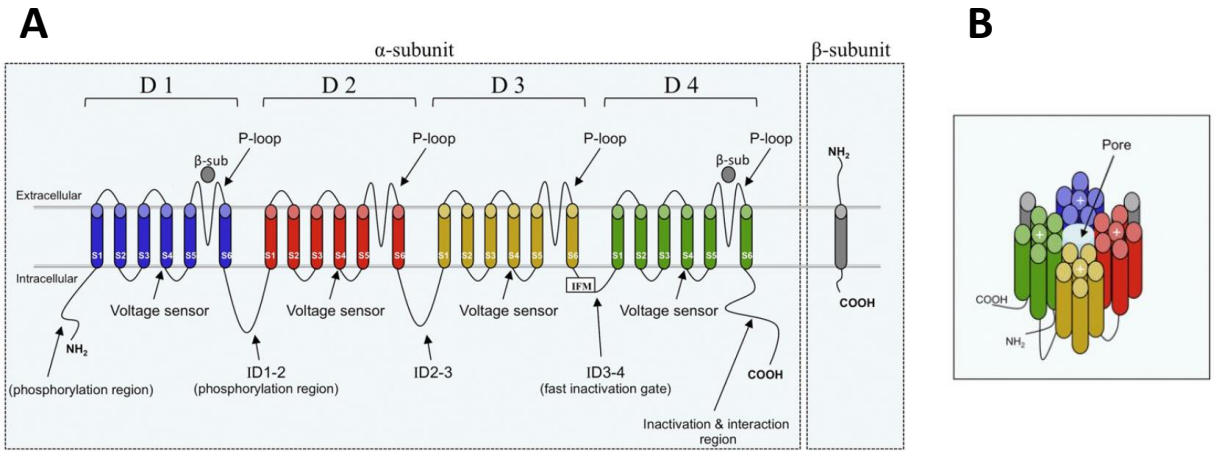


Figure 3. **Représentation schématique du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$.**
(A) Représentation linéaire du canal sodique $Na_v1.5$ à la membrane plasmique des cardiomyocytes. (B) Représentation 3D de $Na_v1.5$. D : Domain ; ID : Interdomain Linkers ; IFM : Ile1485–Phe1486-Met1487 domain ; S : Segment. Schéma modifié d'après Detta et al., 2015

### b. Protéines partenaires régulatrices

Le canal $Na_v1.5$ est composé d'une sous-unité fonctionnelle α mais également d'une sous-unité régulatrice accessoire β. Il existe cinq sous-unités β retrouvées dans les cœurs de mammifères : β1, β1B, β2, β3 et β4. Ces sous-unités sont codées par quatre gènes: *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* et *SCN4B*, β1B étant un variant d'épissage de *SCN1B* (Brackenbury et al., 2011; Maier et al., 2004). Les sous-unités β1, β2, β3 et β4 sont des protéines monomériques de 30 à 40 kDa composées d'une extrémité N terminale extracellulaire, d'un segment transmembranaire et d'une extrémité C terminale cytoplasmique (Abriel, 2010; Amin et al., 2010) (Figure 3A).

De plus, le canal $Na_v1.5$ à la membrane plasmique des cardiomyocytes n'est pas exprimé seul puisqu'il fait toujours partie d'un complexe dit macromoléculaire. Il est exprimé avec de nombreuses protéines partenaires qui modulent la biologie et la fonction du canal. Ces protéines interagissent avec $Na_v1.5$ sur différentes régions de la protéine. On les retrouve sur les boucles intra-domaines, et en grand nombre sur la partie C terminale de $Na_v1.5$ (Detta et al., 2015; Rook et al., 2012; Shy, Gillet, & Abriel, 2013) (Figure 4) :

- Boucle intra-domaines DI-II : Les protéines 14-3- 3η et CaMKIIδc ;
- Boucle intra-domaines DII-III : Les protéines MOG1 et ankyrine G ;
- Boucle intra-domaines DIII-IV : La protéine α-actinine-2 ;
- Partie C-terminale : FGF13 ; Calmoduline ; Nedd4-like ; PTP-H1 ; syntrophine et SAP97.

Les protéines plakophiline-2, desmogléine 2, cavéoline-3, téléthonine, GPD1L et ZASP interagissent également avec $Na_v1.5$, mais leurs sites d'interaction sur le canal sont inconnus à ce jour.

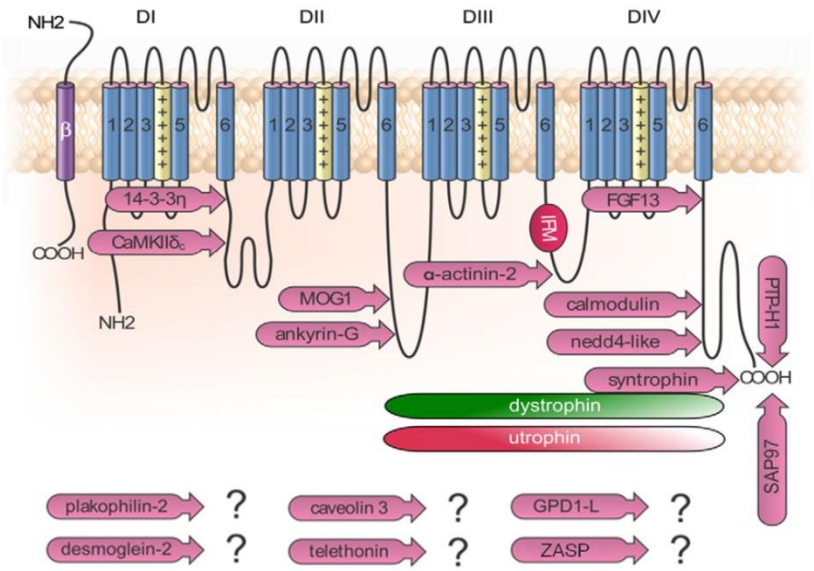


Figure 4. **Interactions de $Na_v1.5$ avec diverses protéines partenaires régulatrices.**
Les protéines partenaires non localisées sur $Na_v1.5$ sont celles dont les sites d'interactions avec le canal n'ont pas encore été démontrés. Schéma de Shy et al., 2013

Cet important complexe macromoléculaire va toutefois être différent selon la localisation de $Na_v1.5$ dans le cardiomyocyte. En effet, $Na_v1.5$ contribuerait à au minimum deux complexes multiprotéiques distincts dans les cardiomyocytes ventriculaires : l'un à la membrane latérale, avec notamment la dystrophine et la syntrophine, et l'autre au niveau du disque intercalaire, avec entre autres les protéines plakophiline-2 et SAP97 (Petitprez et al., 2011; Shy et al., 2013) (Figure 5).

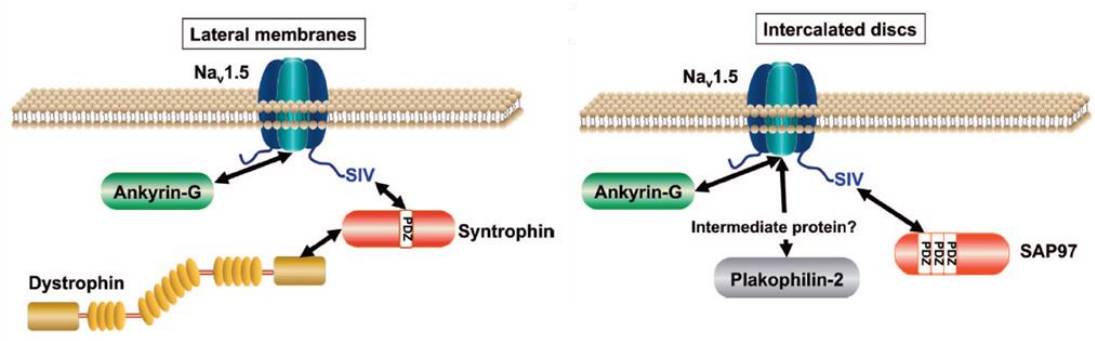


Figure 5. **Représentation des complexes macromoléculaires de $Na_v1.5$ selon leurs localisations**.
Schéma de Petitprez et al., 2011.

### c. Régulations traductionnelles

Il est classiquement admis que les sous-unités β fonctionnent avec les sous-unités α afin de promouvoir l'adressage de canaux vers la membrane plasmique et moduler leurs propriétés biophysiques. En effet la co-expression des sous-unités β *in vitro* et *in vivo* conduit à une augmentation de l'expression de la sous-unité α au niveau de la membrane plasmique (O'malley & Isom, 2016; Rook et al., 2012). Cependant les données actuelles sont parfois contradictoires et semblent dépendre principalement des systèmes d'expression/espèces utilisés selon les études (Shy et al., 2013). Néanmoins, plus de 20 mutations d'origine naturelle ont été décrites dans les gènes codant pour les sous-unités β. Parmi les pathologies associées à ces mutations, on retrouve le syndrome de Brugada, le syndrome du QT long et la fibrillation atriale. Les mécanismes moléculaires sous-jacents aux phénotypes observés sont divers, mais la majorité de ces mutations des sous-unités β réduisent le courant sodique médié par $Na_v1.5$ (Abriel, 2010; Abriel, Rougier, & Jalife, 2016).

Les protéines partenaires appartenant aux différents complexes macromoléculaires de $Na_v1.5$ à la membrane plasmique ont également des fonctions régulatrices importantes sur le canal. Ces protéines peuvent être classées en trois groupes en fonction de leurs actions régulatrices sur $Na_v1.5$ (Detta et al., 2015; Rook et al., 2012; Shy et al., 2013):

- Les protéines d'ancrage, qui vont intervenir dans l'adressage et la stabilisation de l'expression de $Na_v1.5$ à la membrane plasmique : MOG1, ankyrine G, α-actinine-2, calmoduline, syntrophine et SAP97.
- Les protéines modulant les propriétés biophysiques du canal : 14-3-3η, ZASP, FGF13, GPD1L, plakophiline-2, desmogléine, cavéoline 3 et téléthonine.
- Les enzymes qui vont moduler l'expression ou les propriétés biophysiques de $Na_v1.5$ par des modifications post traductionnelles : CaMKIIδc, Nedd4-like et PTP-H1.

### d. Régulations post-traductionnelles

Le canal sodique $Na_v1.5$ subit en effet plusieurs modifications post-traductionnelles au cours de son cycle de vie. Ces modifications peuvent moduler à la fois l'adressage de la protéine vers la membrane cellulaire et la cinétique des canaux (Detta et al., 2015).

La voie de régulation post-traductionnelle de $Na_v1.5$ la mieux documentée à ce jour est la phosphorylation, impliquant de nombreuses protéines kinases reconnues pour affecter divers aspects de la fonction du canal (Marionneau & Abriel, 2015). L'un des principaux acteurs de ces phosphorylations de $Na_v1.5$ est la CaMKII, l'une des protéines partenaires exprimées à la membrane plasmique. Son activité kinase sur $Na_v1.5$ conduit à des modulations de la cinétique du canal : il a notamment été décrit un effet réducteur de la disponibilité des canaux et une augmentation de l'inactivation associée à un ralentissement du retour de l'état d'inactivation. (Wagner et al., 2006). Plusieurs sites de phosphorylation induits par la CaMKII ont été identifiés dans la boucle interdomaine DI-II de $Na_v1.5$ et impliqués dans les modifications sur le courant sodique (Ashpole et al., 2012), bien que la mécanistique propre au fonctionnement de chacun de ces sites de phosphorylation ne soit toujours pas clairement identifiée (DeMarco & Clancy, 2016; Marionneau & Abriel, 2015). Deux sites de phosphorylation pour la PKA ont aussi été décrits dans la boucle DI-II (Murphy et al. 1996), proches de motifs potentiels de rétention dans le RE de type RXR. La phosphorylation directe de $Na_v1.5$ par la protéine kinase A (PKA) augmente la densité des canaux à la surface de la cellule. Il est suggéré que cette action soit médiée par un probable masquage des signaux de rétention du RE bien que la démonstration directe de cette hypothèse soit manquante à ce jour (Zhou et al., 2002). La protéine kinase C (PKC) serait plutôt impliquée dans une réduction de l'amplitude du courant $I_{Na}$. Cet effet s'expliquerait par une internalisation et une redistribution du canal loin de la membrane plasmique suite à l'activation de la PKC (Hallaq et al., 2011). Une production de ROS par les mitochondries a également été associée à l'activation de la PKC, conduisant à une diminution de l'expression du canal $Na_v1.5$ (M. Liu et al., 2009). D'autres kinases moins documentées interviennent dans la régulation du canal sodique $Na_v1.5$. On peut notamment citer la PI3K, dont l'inhibition dans des cœurs de souris diabétiques conduit à une augmentation du courant persistant sodique de $Na_v1.5$ (Z. Lu et al., 2013). La protéine PTPH1, partenaire de $Na_v1.5$ à la membrane plasmique, aurait également une action sur le courant sodique. En effet une étude suggère que la stabilité de l'état inactivé de $Na_v1.5$ serait régulée par son niveau en tyrosines phosphorylées, niveau sous contrôle d'enzymes comme PTPH1 (Jespersen et al., 2006). Enfin, l'action de l'AMPK a été mise en évidence dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats, où il est observé un ralentissement de l'inactivation des canaux sodiques induit par l'AMPK, associé à un décalage du potentiel d'activation de $Na_v1.5$ vers des potentiels plus négatifs (Light, Wallace, & Dyck, 2003).

La glycosylation est également une voie de régulation post-traductionnelle de $Na_v1.5$ qui peut intervenir sur son activation comme sur son inactivation (Detta et al., 2015; Rook et al., 2012). Plusieurs asparagines ont été identifiées dans la séquence peptidique de $Na_v1.5$ comme étant de potentiels sites de N-glycosylation (Ahmad et al., 2007). Concernant leur rôle régulateur, des études chez des souris ont démontré que l'absence de cette modification post-traductionnelle déplaçait significativement les potentiels d'activation et d'inactivation de $Na_v1.5$ vers des potentiels plus positifs et accélérait ainsi la cinétique d'inactivation rapide du canal sans affecter son adressage à la membrane (Ednie et al., 2013). Un décalage dépolarisant du potentiel d'activation du canal sodique a été également observé dans les myocytes ventriculaires de rats adultes après élimination des sites de N-glycosylation (Stocker & Bennett, 2006).

Enfin, des études montrent une implication de la voie d'ubiquitinylation dans la régulation de l'expression membranaire de $Na_v1.5$ par une internalisation et/ou une dégradation de la protéine. Il a été notamment montré que Nedd4-2, protéine partenaire de $Na_v1.5$ à la membrane plasmique, est à l'origine d'une diminution de la densité de courant par ubiquitinylation du canal, sans affecter ses cinétiques d'activation et d'inactivation (van Bemmelen et al., 2004).

# B. $Na_v1.5$ et son activité cardiaque

## *1. Le cœur : anatomie et fonction*

### a. Structure et rôle du cœur

Le cœur est un organe musculaire creux assurant un rôle de pompe, divisé en deux parties indépendantes droite et gauche mais aux fonctionnements similaires. Chaque côté du cœur est constitué de deux cavités : une oreillette en partie haute et un ventricule en partie basse, séparés par une valve permettant une circulation à sens unique du sang de l'oreillette vers le ventricule (Figure 6A). Le cœur droit assure un apport sanguin désoxygéné dans la circulation pulmonaire. La partie gauche quant à elle assure l'apport de sang nouvellement oxygéné à l'ensemble de l'organisme par le biais de la circulation systémique (Figure 6A et Figure 6B). Ainsi, le sang appauvri en oxygène en fin de circulation systémique est retourné au cœur *via* les veines caves supérieures et inférieures. Il entre dans l'oreillette droite, qui se remplit jusqu'à l'ouverture de la valve tricuspide pour passer dans le ventricule droit au cours

d'une phase de relaxation cardiaque appelée diastole. Une fois le sang accumulé, une contraction des ventricules a lieu au cours de la systole, provoquant une expulsion du sang qui est alors envoyé dans l'artère pulmonaire. Après avoir traversé la zone d'échange de la circulation pulmonaire, le sang néo-oxygéné est retourné au cœur *via* les veines pulmonaires. Il entre cette fois-ci dans l'oreillette gauche, qui se remplit jusqu'à l'ouverture de la valve mitrale au cours de la diastole pour passer dans le ventricule gauche. Enfin, au cours de la systole, le ventricule gauche se contracte pour éjecter son contenu sanguin oxygéné dans l'aorte afin d'irriguer l'ensemble de l'organisme *via* la circulation systémique (Figure 6A et Figure 6B). Le cœur est par conséquent un organe essentiel au bon fonctionnement de l'organisme entier. La synchronisation et la rythmicité des contractions cardiaques sont des facteurs clés du fonctionnement normal du cœur, contrôlées par la propagation d'un courant électrique appelé potentiel d'action. De plus, le rapprochement anatomique du cœur et des poumons, expliqué par l'activité même de pompe circulatoire, impose une connexion très étroite entre les fonctions cardiaque et respiratoire qui sont interdépendantes.

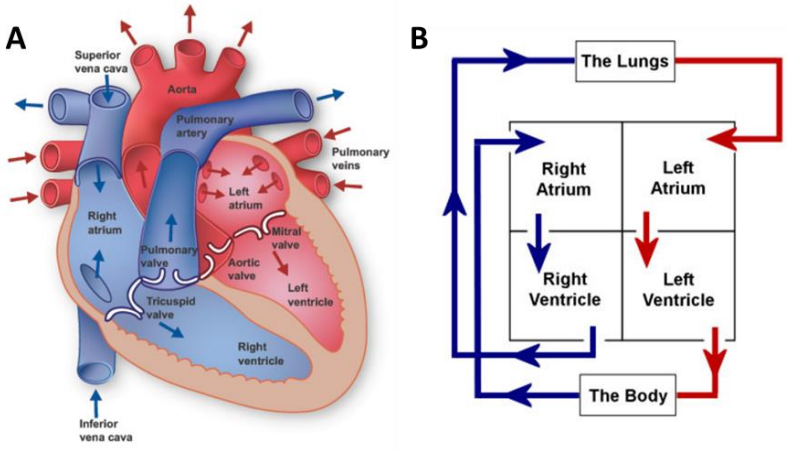


Figure 6. **Anatomie du cœur et systèmes circulatoires.**
(A) Schéma illustrant l'anatomie du cœur, issu de www.texasheart.org. (B) Représentation schématique des systèmes circulatoires, issue de www.teachpe.com. La circulation du sang désoxygéné est indiquée par les zones et flèches en bleu, tandis que la circulation du sang oxygéné est en rouge.

## b. Le couplage excitation contraction dans le cœur

Le couplage excitation-contraction est une notion regroupant l'ensemble des processus assurant la transformation d'un signal électrique (potentiel d'action) en un signal intracellulaire qui aboutit à la contraction de la cellule musculaire. Cette contraction étant

médiée par le calcium, le fonctionnement normal du cœur passe donc par une fine régulation des niveaux de calcium intra-cellulaire (Neef & Maier, 2013). Pour cela, l'excitation électrique du cardiomyocyte va déclencher une augmentation de la concentration de calcium cytosolique, conduisant *in fine* à une interaction actine-myosine au niveau des sarcomères puis à une contraction de la cellule au cours de la systole.

Tout d'abord pour initier la contraction, lors d'un potentiel d'action la dépolarisation de l'ensemble de la membrane plasmique du cardiomyocyte déclenche l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants de type L $Ca_v1.2$ (Landstrom, Dobrev, & Wehrens, 2017). Ces canaux sont exprimés du côté latéral de la membrane plasmique des cardiomyocytes, dans des invaginations appelées tubules transverses et formant un réseau hautement ramifié et interconnecté à proximité des sarcomères (Hong & Shaw, 2017) et du réticulum sarcoplasmique (Figure 7). L'ouverture des $Ca_v1.2$ permet le passage d'ions $Ca^{2+}$, qui en entrant dans la cellule vont déclencher l'ouverture des canaux RYR2 à proximité, situés à la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ces RYR2 une fois activés par le calcium vont permettre la libération du stock d'ions $Ca^{2+}$ contenu dans le réticulum sarcoplasmique vers le cytosol (Figure 7). Ces ions $Ca^{2+}$ libérés en grande quantité vont se fixer à la troponine C appartenant au complexe troponine/tropomyosine, libérant le site d'interaction entre l'actine et la myosine masqué par ce complexe au repos. Les myofilaments d'actine et de myosine des sarcomères ainsi activés vont déclencher la contraction (Bers, 2002; Neef & Maier, 2013).

Pour induire la relaxation de la cellule, il faut que le complexe troponine/tropomyosine retourne à son état de repos en masquant le site d'interaction entre l'actine et la myosine. Pour cela le calcium libre pouvant se fixer à la troponine C doit être éliminé du cytosol. Il existe au sein du cardiomyocyte trois manières d'extruder le calcium du cytosol. Premièrement, la grande majorité de l'élimination du calcium est assurée par une réabsorption du $Ca^{2+}$ dans le réticulum sarcoplasmique, cette fois-ci *via* l'activation d'une protéine SERCA2a. Ensuite, l'extrusion de $Ca^{2+}$ peut se faire par la membrane plasmique de la cellule, notamment *via* des échangeurs NCX (pouvant éliminant un ion $Ca^{2+}$ du cytosol en échange de l'entrée de trois ions $Na^{+}$). Enfin, une part infime de l'élimination de $Ca^{2+}$ du cytosol est assurée par les mitochondries grâce à un canal $Ca^{2+}$ uniport (Bers, 2002; Neef & Maier, 2013). Ces différents processus intervenant dans le couplage excitation-contraction,

essentiels au bon fonctionnement du cœur, reposent sur le contrôle précis de divers équilibres ioniques au sein de la cellule sur toute la durée du cycle cardiaque (Figure 7).

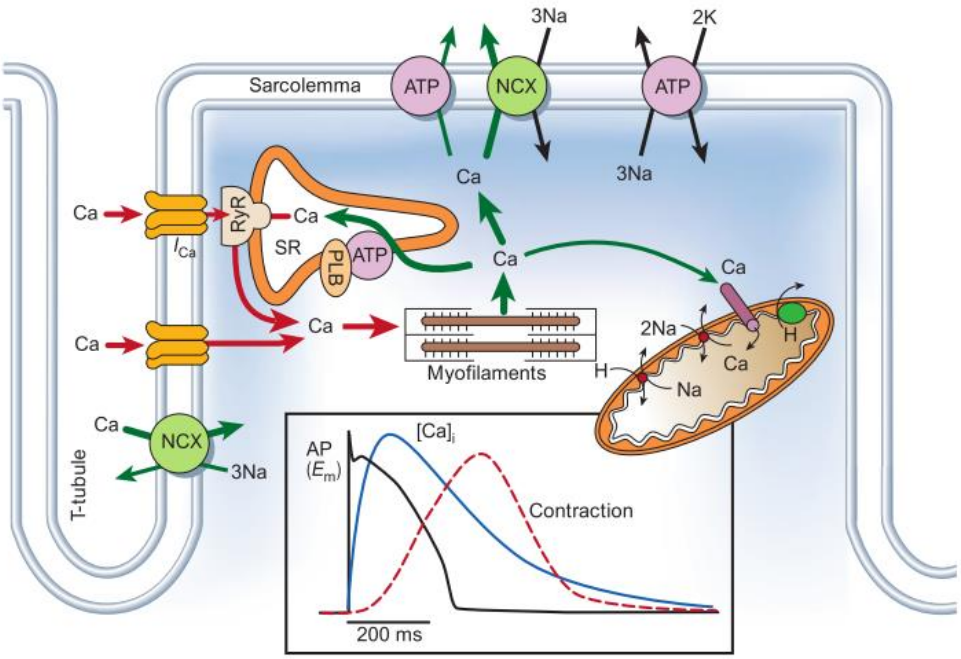


Figure 7. **Le couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes.**
Les déplacements des ions $Ca^{2+}$ entre le milieu extérieur, le sarcolemme, le réticulum sarcoplasmique et la mitochondrie sont illustrés par des flèches. Au centre, graphique illustrant la cinétique de déclenchement de la contraction de la cellule en fonction du potentiel d'action (AP) et du pic de concentration calcique intracytosolique. Schéma de Bers et al., 2002.

### c. L'activité électrique du cœur

Le cœur est une pompe dont l'activité repose sur des cellules musculaires de type strié appelées cardiomyocytes, et la commande de cette pompe cardiaque se fait par le biais du couplage entre une activité électrique et une activité contractile comme expliqué précédemment. Les cardiomyocytes vont se contracter et se relâcher selon un rythme précis qui va être imposé par le potentiel d'action, initié au niveau du nœud sinusal et qui se propage de cellule en cellule. Au repos, chaque cardiomyocyte a un potentiel transmembranaire stable d'environ -80 mV (Michael et al., 2009). Ce potentiel transmembranaire, toujours négatif au repos, est maintenu par une répartition dynamique et équilibrée des charges de part et d'autre de la membrane plasmique du cardiomyocyte. Cette répartition dynamique est essentiellement liée à la perméabilité des canaux potassiques Kir2.1, Kir 2.2 et Kir2.3 à l'origine d'un courant sortant appelé $IK_1$. Ce potentiel de repos reste stable tant que l'équilibre n'est

pas perturbé par une stimulation électrique de la membrane. En effet, les autres canaux ioniques voltage-dépendants présents à la membrane ne sont pas ouverts au repos et une modification du potentiel transmembranaire est nécessaire pour provoquer leur perméabilité. Au niveau de l'oreillette droite du cœur, des cellules particulières formant le nœud sinusal et ayant un potentiel de repos instable vont subir de manière spontanée et rythmique une élévation brutale (dépolarisation) de leur potentiel de membrane à l'origine du potentiel d'action (Bartos, Grandi, & Ripplinger, 2015). Cet influx électrique rythmé va se propager de cardiomyocyte en cardiomyocyte, allant des oreillettes jusqu'aux ventricules *via* le réseau de conduction du nœud atrio-ventriculaire et des fibres de His-Purkinje (Bartos et al., 2015; Michael et al., 2009) (Figure 8A). Cet influx permet sur son passage l'activation des nombreux canaux ioniques voltages dépendants, qui vont s'ouvrir pour laisser passer les ions de part et d'autre de la membrane plasmique. Ces mouvements d'ions conduisent à la génération d'un nouveau potentiel d'action qui va à son tour se propager. Les ions impliqués dans le potentiel d'action cardiaque sont le calcium, le potassium et le sodium, d'où l'importance cruciale des canaux ioniques voltage-dépendants permettant leurs déplacements de part et d'autre de la membrane. Les propriétés électriques dans un cœur sont toutefois assez hétérogènes, c'est pourquoi différentes formes de potentiels d'actions sont identifiables selon les différentes régions du cœur (Figure 8A). A l'image du potentiel d'action qui reflète l'activité électrique de ses multiples canaux ioniques, l'enregistrement d'un ECG de surface permet de refléter l'addition des activités électriques des multiples potentiels d'action dans le cœur. Un potentiel d'action se décompose en cinq phases (Garcia-Elias & Benito, 2018; Huang, 2017; Nerbonne & Kass, 2005):

- Phase 0 : Dépolarisation initiale du potentiel d'action dans les cardiomyocytes. Cette phase est rapide, de grande amplitude, et liée à l'activation du canal sodique voltage dépendant $Na_v1.5$ à l'origine du courant entrant $I_{Na}$. Au niveau des cellules du nœud sinusal c'est un courant $I_{Ca}$ qui participe à la dépolarisation initiale générant le potentiel d'action (Bartos et al., 2015).

- Phase 1 : Repolarisation transitoire en lien avec l'inactivation des canaux sodiques $Na_v1.5$ et l'activation des canaux potassiques $K_v4.2/K_v4.3$ assurant un courant sortant transitoire $I_{to,f}$, et des canaux $K_v1.4$ pour un courant sortant $I_{to,s}$ (canaux $K_v1.4$).

- Phase 2 : Le plateau, résultant de la compétition des courants potassiques sortants $I_{to}$, $I_{Kr}$, $I_{Ks}$, et des courants calciques entrants $I_{Ca,L}$ liés à l'activation des canaux calciques $Ca_v1.2$.

- Phase 3 : Repolarisation de la membrane plasmique assurée par les courants potassiques sortants $I_{Kr}$ (canaux $K_v11.1$) et $I_{Ks}$ (canaux $K_v7.1$), les canaux calciques $Ca_v1.2$ étant inactivés.

- Phase 4 : Retour au potentiel de repos. Ce potentiel est maintenu par les canaux Kir2.1, Kir 2.2 et Kir2.3 à l'origine du courant sortant $I_{K1}$ dans les cellules non automatiques. Il faut noter que dans les cellules du nœud sinusal, du nœud auriculo-ventriculaire et du réseau de conduction de His-Purkinje, il n'y a pas de potentiel de repos. Ces cellules sont plutôt caractérisées en fin de potentiel d'action par une pente de dépolarisation diastolique due à l'activation du courant $I_f$ (porté par des ions $Na^+$) et des courants calciques, dans un premier temps de type T essentiellement portés par les canaux Cav3.1 et Cav3.3, puis de type L, portés en particulier par les canaux Cav1.3 (Bartos et al., 2015) (Figure 8B).

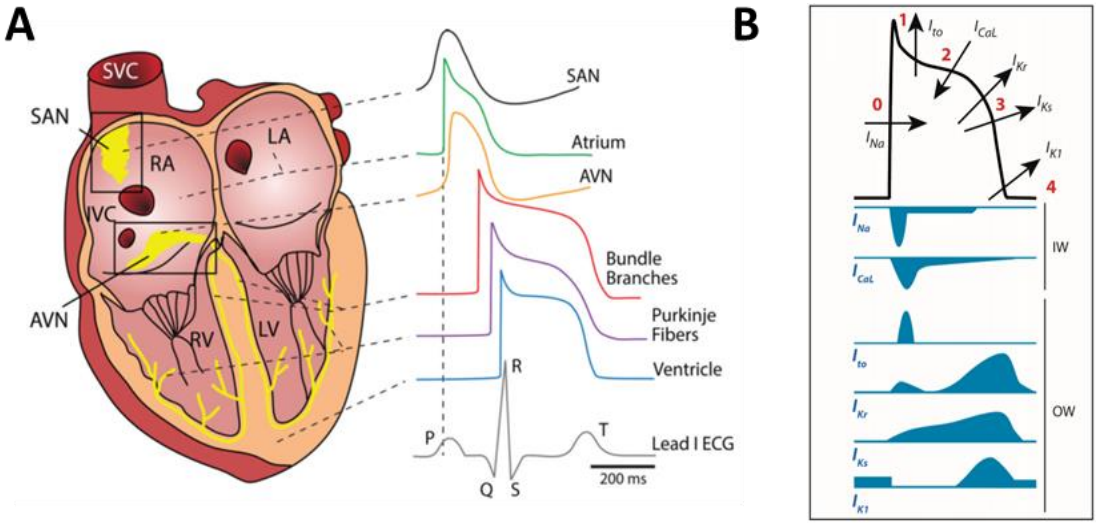


Figure 8. **Le potentiel d'action cardiaque : hétérogénéité électrique du coeur et canaux ioniques impliqués.**
(A) Les différents potentiels d'actions associés aux différentes régions du cœur. Schéma de Bartos et al., 2015. (B) Potentiel d'action ventriculaire et courants ioniques transmembranaires impliqués dans chacune de ses phases. Schéma de Garcia-Elias et al., 2018. (*AVN* : atrioventricular node ; *SAN* : sinoatrial node ; *IW* : inward current ; *OW* : outward current).

## 2. Les expressions de $Na_v1.5$ dans le cœur

### a. Localisation dans le myocarde

Les canaux $Na_v1.5$ ne sont pas distribués de manière homogène dans le myocarde. Ils présentent des expressions différentielles dans le système de conduction et au travers de la paroi du myocarde. La présence de $Na_v1.5$ est faible ou absente dans les nœuds sino-atrial et atrio-ventriculaire, mais abondante dans les faisceaux de His et les fibres de Purkinje. De plus, un gradient transmural de $Na_v1.5$ est observé dans la paroi des ventricules gauche et droit avec une plus faible expression dans le myocarde sous épicardique en comparaison avec le myocarde sous endocardique (Remme et al., 2009). Dans les cardiomyocytes, les canaux $Na_v1.5$ sont distribués à la membrane plasmique sur deux sites principaux : les disques intercalaires et les membranes latérales, dans deux complexes macromoléculaires distincts comme expliqué précédemment. $Na_v1.5$ semble toutefois être préférentiellement exprimé au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes par rapport à la membrane latérale ou le système des tubules T, car le disque intercalaire apparaît comme étant le siège de la conduction électrique du potentiel d'action de cellule en cellule (Maier et al., 2004; Rook et al., 2012).

### b. Rôle majeur de $Na_v1.5$ dans l'activité électrique cardiaque

Comme expliqué précédemment, le processus de couplage excitation-contraction à l'origine de la contraction cardiaque est provoqué par la dépolarisation membranaire engendrée par le potentiel d'action. La phase initiale du déclenchement de ce potentiel repose sur un courant entrant $I_{Na}$, causé par le passage d'ions $Na^+$ dans la cellule *via* les canaux sodiques $Na_v1.5$. Cette protéine a donc un rôle déterminant dans le bon fonctionnement de l'activité électrique du cœur.

$Na_v1.5$ est un canal sélectif sodique et voltage dépendant. Cela signifie qu'il ne peut laisser passer par son pore que des ions $Na^+$. Cependant ce canal n'est pas ouvert en permanence et ses propriétés d'ouverture dépendent comme son nom l'indique du potentiel de membrane, cette sensibilité au potentiel étant médiée par les segments transmembranaires S4 de la protéine. Au repos, le canal est à l'état fermé, et ne s'ouvre qu'en réponse à la dépolarisation locale de la membrane. Si localement un nombre suffisant de canaux s'ouvrent simultanément, le courant sodique engendré va faire diminuer le gradient

électrochimique de la cellule, dépolarisant le potentiel de membrane et initiant ainsi une boucle de rétro-activation positive des canaux environnants, suite à laquelle de plus en plus de canaux $Na_v1.5$ vont s'ouvrir. Cette boucle favorise la dépolarisation globale de la membrane plasmique et dirige la conduction du signal électrique au sein du tissu cardiaque (DeMarco & Clancy, 2016).

Pour revenir plus précisément sur les propriétés d'ouverture de $Na_v1.5$, la dépolarisation de la cellule va induire un mouvement du segment S4 vers le côté extracellulaire de la membrane plasmique. Ainsi, le canal s'active et le pore s'ouvre. L'inactivation quant à elle, assimilable à la fermeture du pore, commence simultanément à l'activation mais est plus lente. Les canaux $Na_v1.5$ vont donc être ouverts mais de manière transitoire et c'est pourquoi le courant $I_{Na}$, responsable de la dépolarisation au cours de la phase 0 du potentiel d'action des cardiomyocytes, est très rapide. L'inactivation rapide des canaux est tout d'abord initiée par le mouvement du segment S4 du domaine DIV. Dès lors, au niveau de la boucle interdomaines DIII-IV, les acides aminés du motif IFM (isoleucine, phénylalanine, méthionine) et des résidus glycine et proline voisins à ce motif vont refermer le pore par interactions avec de nombreux acides aminés présents dans les boucles intracytoplasmiques S4-S5 des domaines DIII et DIV. Enfin, une autre phase d'inactivation dite lente existe mais les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas encore bien déterminés (Amin et al., 2010). Au final plus de 99% des canaux $Na_v1.5$ sont inactivés à la fin de la phase 1 du potentiel d'action, les 1% restants participant au maintien d'un courant $I_{NaL}$ persistant durant toute la durée du potentiel d'action (Figure 9A). L'incidence de ce courant $I_{NaL}$ sur le potentiel d'action est relativement faible dans les cœurs normaux, mais exerce des effets fonctionnels significatifs sur la repolarisation des cardiomyocytes avec des effets potentiellement pro-arythmiques dans les cœurs avec une réserve de repolarisation réduite, comme c'est le cas dans certaines cardiomyopathies héréditaires associées à $Na_v1.5$ comme le syndrome du QT long, et dans certaines cardiomyopathies acquises comme l'insuffisance cardiaque (Yu et al., 2018). Les canaux inactivés, eux, ne pourront être réactivés qu'après être sortis de leur état d'inactivation, au cours de la phase 4 du potentiel d'action. Il a cependant été observé qu'une fraction de ces canaux $Na_v1.5$ pouvait être réactivée dès la phase 3, provoquant un courant sodique dépolarisant appelé courant de fenêtre et dont l'intensité est

inférieure à 1% de celui généré au cours de du pic de courant $I_{Na}$ généré lors de la phase 0 (Figure 9B) (Amin et al., 2010).

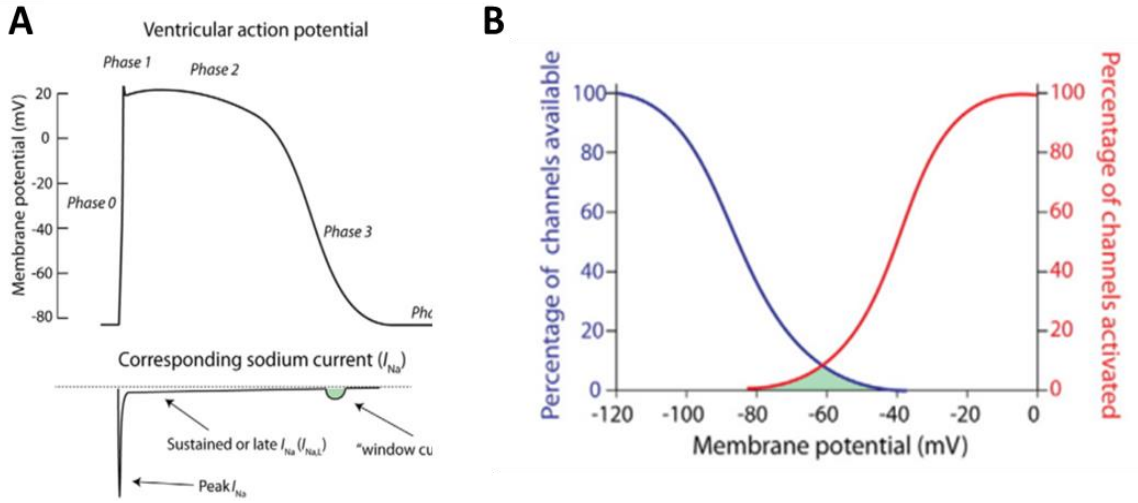


Figure 9. **$Na_v1.5$ et activité électrique dans le coeur en condition normale.**
(A) Potentiel d'action ventriculaire et courant $I_{Na}$ associé en fonction du temps. (B) Illustration du pourcentage de canaux disponibles (bleu) et activés (rouge) en fonction du potentiel de membrane. Le courant de fenêtre $I_{NaL}$ apparaît en vert. Schéma de Veerman et al., 2015

## 3. Pathologies cardiaques associées et modèles d'études

### a. Pathologies héréditaires

Depuis 1995, plusieurs centaines de mutations ponctuelles ont été répertoriées sur le gène *SCN5A* ou sur les gènes codant pour les protéines régulatrices de $Na_v1.5$. Elles sont associées à de nombreuses pathologies cardiaques qualifiées de cardiomyopathies héréditaires (Tfelt-Hansen et al., 2010). Les mutations de *SCN5A* plus particulièrement conduisent au dysfonctionnement du canal sodique $Na_v1.5$ notamment par perturbations de l'adressage à la membrane, des mécanismes de régulations post-traductionnelles de la protéine ou de la modulation des propriétés biophysiques du canal. Ces mutations provoquent des altérations de l'initiation ou de la conduction électrique du potentiel d'action, principalement par modifications des amplitudes et durées des courants $I_{Na}$ et $I_{NaL}$, conduisant à différents types d'arythmies létales (Han et al., 2018; Liu, Yang, & Dudley, 2016) (Figure 10). Classiquement distinguées en mutations gain-de-fonction ou perte-de-fonction, leurs caractérisations phénotypiques sont toutefois très complexes. En effet il peut être mis en évidence des phénotypes asymptomatiques comme des cas de mort cardiaque subite chez des individus porteurs des mêmes mutations. De plus, certaines mutations spécifiques de

*SCN5A* provoquent un phénotype individuel ou des phénotypes composés, suggérant une pathogenèse complexe associée à ces mutations (Han et al., 2018; Liu et al., 2016; Tfelt-Hansen et al., 2010). Il est même établi que la pénétrance et les phénotypes résultant des mutations $Na_v1.5$ varient avec l'âge, le sexe, la température corporelle, le rythme circadien et les régions du cœur (Liu et al., 2016).

Comme indiqué précédemment, les nombreuses mutations décrites sur *SCN5A* permettent de classer les différentes cardiomyopathies héréditaires associées en deux groupes : celles dues à un gain de fonction et celles dues à une perte de fonction de $Na_v1.5$. Les mutations gain-de-fonction de $Na_v1.5$ vont conduire à des pathologies comme le syndrome du QT long de type 3, la fibrillation atriale, la mort à la naissance et le syndrome de mort subite du nourrisson. D'un autre côté, les mutations conduisant à une perte de fonction de $Na_v1.5$ vont être à l'origine de pathologies comme les troubles progressifs de la conduction cardiaque aussi appelés maladie de Lenègre, le syndrome de Brugada, le syndrome du nœud sinusal, la fibrillation atriale et les cardiomyopathies dilatées (Han et al., 2018; Liu et al., 2016; Tfelt-Hansen et al., 2010). Toutefois, certaines mutations ont été décrites comme pouvant entraîner à la fois un syndrome de Brugada, attribué à une perte de fonction, et un syndrome du QT long de type 3, qui est provoqué par un gain de fonction du canal $Na_v1.5$. On parle alors de syndrome chevauchant (Tfelt-Hansen et al., 2010).

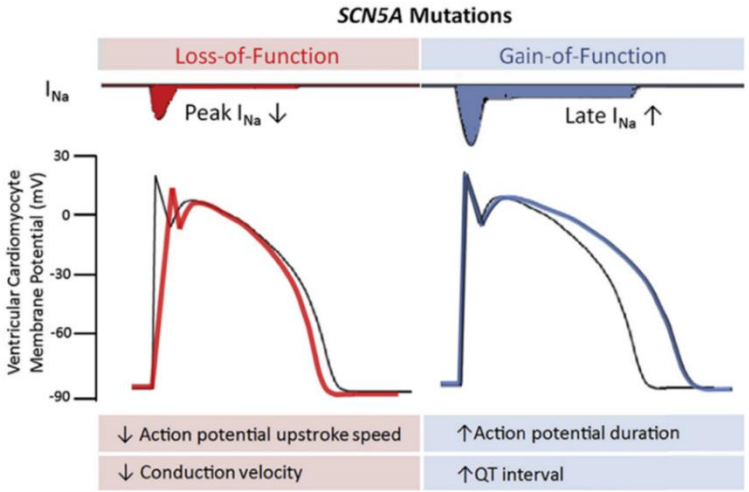


Figure 10. **Perturbations des courants $I_{Na}$ et $I_{NaL}$ provoqués par les mutations du gène *SCN5A*, et leurs répercussions sur le potentiel d'action.**
Les mutations perte-de-fonction sont représentées à gauche en rouge, tandis que les mutations gain-de-fonction sont représentées à droite en bleu. Schéma de Liu et al., 2016.

### b. Pathologies acquises

Depuis plus d'une quinzaine d'années, des études mettent en évidence des dysfonctions de $Na_v1.5$ associées à des pathologies acquises comme l'infarctus du myocarde (IDM) ou l'insuffisance cardiaque (Remme & Bezzina, 2010).

L'infarctus du myocarde est une nécrose du muscle cardiaque d'origine ischémique. Il résulte généralement de l'occlusion d'une artère coronaire suite à une rupture de plaque d'athérome ou suite à un phénomène de thrombose (Santamore, 1991). L'ischémie génère alors un stress oxydatif associé à une inflammation qui seront à l'origine des processus de cicatrisation des zones lésées du myocarde par remodelage de la matrice extracellulaire (Frantz, Bauersachs, & Ertl, 2009; Prabhu & Frangogiannis, 2016). Or les arythmies ventriculaires représentent 2 à 20% des complications observées lors de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde (Piccini, Berger, & Brown, 2008). Il est en effet décrit que ce stress oxydatif et les changements métaboliques associés provoquent une inactivation du courant sodique $I_{Na}$ se traduisant par une diminution de l'excitabilité cardiaque et un ralentissement de la conduction (Remme & Bezzina, 2010). Ces deux processus vont avoir des effets opposés, car la diminution de l'excitabilité du tissu infarcie peut protéger contre les arythmies ventriculaires alors que le ralentissement de la conduction dans le cœur est considéré comme pro-arythmique (Janse & Wit, 1989). Divers mécanismes sont envisageables pour expliquer ces diminutions du courant $I_{Na}$ associées aux arythmies observées chez les malades mais ils sont néanmoins peu décrits. Il a toutefois été suggéré récemment les implications d'un variant intronique de *SCN5A* dans la survenue des fibrillations ventriculaires post-infarctus (Jabbari et al., 2017), et du facteur de transcription FoxO1 dans la diminution d'expression du canal $Na_v1.5$ dans les cœurs infarciés (Cai et al., 2014). Ces observations concernant le courant sodique $I_{Na}$ laissent présager que le canal $Na_v1.5$ pourrait être fortement impliqué dans les complications arythmiques observées lors de la phase aiguë d'un infarctus.

L'insuffisance cardiaque quant à elle est définie comme l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin adéquat au fonctionnement de l'organisme, par la mise en place de différents remodelages structuraux progressifs du ventricule gauche tels que l'hypertrophie myocytaire, la fibrose interstitielle et la dilatation cavitaire (Konstam et al., 2011; Prabhu & Frangogiannis, 2016). Parallèlement à ces remodelages structuraux, des perturbations des courants ioniques cardiaques ont été décrits. Plusieurs études suggèrent notamment une réduction du courant

$I_{Na}$, dont plusieurs mécanismes moléculaires seraient responsables. Au niveau transcriptionnel, une baisse de l'expression de l'ARN messager sauvage codant pour $Na_v1.5$ a été montrée, avec l'apparition de formes tronquées aux fonctions encore inconnues (Noyes et al., 2017; Zhou et al., 2018). Au niveau protéique, des modifications post-traductionnelles ont été associées à des perturbations de l'adressage et de l'activité de $Na_v1.5$ à la membrane plasmique des cardiomyocytes (Casini et al., 2009; Luo et al., 2017; Marionneau & Abriel, 2015). Electriquement, ces modifications d'expression et d'activité de $Na_v1.5$ vont conduire respectivement à des phénomènes de réentrées ainsi qu'à des post dépolarisations tardives (Nattel et al., 2007). Mais il a également été décrit des niveaux élevés de calcium intracellulaire dans les myocytes altérés, pouvant également réduire le courant de sodium par une interaction directe des ions calcium avec le canal sodique (Casini et al., 2009). $Na_v1.5$ est donc impliqué dans l'arythmogenèse du cœur dans l'insuffisance cardiaque, mais les mécanismes conduisant à sa dysfonction semblent multiples (Remme & Bezzina, 2010).

Les implications de $Na_v1.5$ dans les troubles du rythme associés à l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque mettent en évidence un lien très probable entre $Na_v1.5$ et les processus de remodelages inflammatoires et structuraux.

### c. Modèles d'études de $Na_v1.5$ dans les pathologies cardiaques

Les descriptions des canaux ioniques voltage-dépendants ont majoritairement été réalisées à partir de systèmes d'expression hétérologue. Depuis le début des années 2000 des modèles de souris transgéniques pour le canal $Na_v1.5$ ont été créés afin de permettre de confirmer ou d'infirmer les observations des systèmes d'expression hétérologues. Ils constituent de bons outils pour mieux comprendre le fonctionnement du canal dans son environnement bien que certaines différences électrophysiologiques existent entre l'Homme et la souris (Boukens et al., 2014). Ils permettent notamment de créer facilement des modèles transgéniques d'invalidation ou de surexpression de protéines d'intérêt, ou de reproduire des mutations humaines. Ces différents modèles ont été résumés dans deux revues publiées par l'équipe de recherche dans laquelle je travaille (Charpentier, Bourgé, & Mérot, 2008; Derangeon et al., 2012).

Un modèle murin de cardiomyopathie dilatée présentant une mutation D1275N a été générée en 2011 (Watanabe et al., 2011). Deux modèles murins transgéniques du syndrome

du QT long ont été créés et sont étudiés à l'heure actuelle : une souris hétérozygote pour la délétion ΔKPQ 1505-1507 (Nuyens et al., 2001), et une autre exprimant le gène *SCN5A* humain avec la mutation N1325S à expression spécifique du cœur (Tian et al., 2004). Un autre modèle de souris, hétérozygotes pour la mutation *Scn5a*$^{1798insD/+}$, présente un syndrome chevauchant (Remme et al., 2006). En effet cette mutation correspond chez l'Homme à l'apparition d'un syndrome du QT long et un syndrome de Brugada (Bezzina et al., 1999). Cette unique mutation induit effectivement chez les souris les mêmes perturbations que celles décrites chez l'Homme (Remme et al., 2006).

Pour étudier le rôle de $Na_v1.5$, le moins représentatif de la réalité clinique mais le plus efficace reste l'utilisation d'un modèle d'invalidation ou de sur-expression du gène d'intérêt. Un modèle de souris invalidée pour le gène *Scn5a* a donc été élaboré par Papadatos en 2002 (Papadatos et al., 2002). Les souris à invalidation homozygote du gène n'étant pas viables, c'est la souris à invalidation hétérozygote *Scn5a*$^{+/-}$ qui est actuellement étudiée (Papadatos et al., 2002). Ces souris *Scn5a*$^{+/-}$ se sont avérées être un très bon modèle d'étude pour le syndrome de Brugada, mais également pour la maladie de Lenègre. La maladie de Lenègre, caractérisée par l'apparition chronique de blocs de conduction, induit un ralentissement de la conduction cardiaque observée sur un ECG par l'allongement du complexe QRS (Lenegre, 1964). Il a été observé chez les patients malades une augmentation des processus de fibrose, conduisant à une accumulation de collagène dans le cœur (Bozkaya et al., 2008). Il semblerait d'ailleurs que ce remodelage tissulaire soit en grande partie à l'origine de l'aggravation de la pathologie (Kawaguchi et al., 2013). Ces processus ont également été montrés chez la souris *Scn5a*$^{+/-}$, chez qui on observe avec l'âge l'apparition de troubles de la conduction associés au développement d'une fibrose ventriculaire importante (Leoni et al., 2010; Royer et al., 2005). La plus récente étude réalisée chez ces souris montre que ce remodelage tissulaire fibrotique est médiée par la voie de signalisation du TGFβ (Derangeon et al., 2017), renforçant ainsi l'hypothèse d'un lien potentiel entre le canal sodique $Na_v1.5$ et les processus de remodelages cardiaques.

La protéine $Na_v1.5$ a donc très majoritairement été décrite en tant que canal sodique, voltage-dépendant, exprimée à la membrane plasmique des cellules musculaires cardiaques. Mais ses implications potentielles dans les processus de remodelages structuraux et inflammatoires rendent aujourd'hui pertinent de s'intéresser à ce canal dans d'autres

situations. D'autres modes d'action peuvent effectivement être envisagés, comme un rôle médiateur des voies de signalisation de la matrice extracellulaire par exemple, mais en tout cas dans d'autres fonctions que celle d'assurer une activité électrique.

# II. Le canal sodique voltage dépendant $Na_v1.5$ : une protéine à explorer dans beaucoup d'autres contextes

## A. $Na_v1.5$ dans les autres cellules excitables

### *1. $Na_v1.5$ dans les neurones*

#### a. $Na_v1.5$ dans neurones centraux

Hartmann et son équipe font partie des premiers à avoir décrit l'expression du gène *SCN5A* dans les cellules neuronales (Hartmann et al., 1999). Leurs résultats montrent par hybridation *in situ* l'expression de *SCN5A* dans les voies synaptiques du système limbique. Cette dernière a notamment été mise en évidence dans le cortex piriforme qui régule l'excitabilité de l'amygdale, zone du cerveau impliquée dans des phénomènes importants d'épilepsie (Hartmann et al., 1999). Des mutations du gène *SCN5A* ayant été montrées chez des patients atteints d'épilepsie et du syndrome du QT long (Aurlien et al., 2009; Miyazaki et al., 2016; Pacia et al., 1994) ou du syndrome de Brugada (Parisi et al., 2013), il est aujourd'hui suggéré une implication de l'expression de $Na_v1.5$ dans la rythmicité de l'excitabilité neuronale.

Wang et ses collaborateurs ont étudié l'expression du gène *Scn5a* dans des cortex frontaux de rats (Wang et al., 2009, 2017). Ils y ont tout d'abord mis en évidence l'expression des isoformes adultes et néonatales des ARNm *Scn5a*, avec un ratio d'expression évolutif avec l'âge en faveur de la forme adulte à l'instar du cœur. Ils ont également décrit l'expression de la protéine $Na_v1.5$ dans les lobes frontaux de rats, exclusivement localisée dans la partie corticale, plus précisément dans les somas, axones et dendrites des neurones. Enfin, par patch-clamp sur coupes de tissus, ils ont pu observer que ces canaux $Na_v1.5$ étaient électriquement fonctionnels au sein des neurones, mais sans toutefois préciser le rôle physiologique de ces courants sodiques (Wang et al., 2017).

### b. $Na_v1.5$ dans les neurones périphériques

Depuis une quinzaine d'années maintenant, la présence de $Na_v1.5$ dans les neurones périphériques a été suggérée puis démontrée. Dans les neurones des ganglions des racines dorsales de rat et de souris en culture, une première étude en 2002 a montré par des analyses transcriptomiques et électrophysiologiques qu'une partie des courants sodiques enregistrés dans ces neurones était portée par le canal sodique $Na_v1.5$. Toutefois cette expression ne semblait être effective qu'au stade embryonnaire, disparaissant très rapidement au cours du développement (Renganathan, Dib-Hajj, & Waxman, 2002). Une autre étude en 2007 a montré que l'ARNm *Scn5a* est bel et bien exprimé au stade adulte chez le rat et la souris, mais qu'il s'agit majoritairement de l'isoforme $Na_v1.5a$ avec épissage de l'exon 18, et non la forme entière adulte (Kerr et al., 2007). Bien que rien n'ait encore été démontré concernant son rôle fonctionnel, il est suggéré une possible implication du courant sodique généré par $Na_v1.5$ dans le développement neuronal au niveau des ganglions des racines dorsales (Renganathan et al., 2002).

Au niveau des neurones afférents dans le ganglion vestibulaire, une petite partie des courants sodiques enregistrés seraient portés par le canal sodique $Na_v1.5$ d'après les travaux de Liu et ses collaborateurs en 2016 (Liu et al., 2016). En effet dans cette étude menée sur la souris, le rat et le chien, l'expression de $Na_v1.5$ a été démontrée dans ces neurones par des analyses transcriptomiques, immunohistochimiques, et par des enregistrements électrophysiologiques. Cette expression serait toutefois limitée encore une fois au stade néonatal et déclinerait très rapidement avec le développement, bien qu'il soit observé une discordance entre la baisse fonctionnelle et la baisse d'expression du canal. Son rôle est suggéré dans le développement neuronal également, sans exclure la possibilité d'une implication de $Na_v1.5$ autrement que par sa seule fonction électrique (Liu et al., 2016).

Les neurones olfactifs portent également un courant sodique. Frenz et ses collaborateurs ont montré en 2014 chez la souris que ce courant était porté par le canal sodique $Na_v1.5$, exprimé dans les boutons dendritiques des nerfs, très proches du lieu de transduction du signal odorant (Frenz et al., 2014). La plupart des canaux $Na_v1.5$ sont inactivés dans les neurones olfactifs, ayant un potentiel de repos de -70mV. Ce potentiel de membrane se situe dans la fenêtre de potentiel où un courant de fenêtre, faible mais suffisant, peut néanmoins permettre à ces canaux de s'activer et de déclencher une dépolarisation

spontanée du neurone. Ces dépolarisations spontanées, attribuées à $Na_v1.5$, auraient un rôle dans la transduction de faibles stimulations odorantes, hypothèse appuyée également par des travaux *in silico* menés par Dionne en 2014 (Dionne, 2016; Frenz et al., 2014).

Enfin, une expression fonctionnelle de $Na_v1.5$ a été détectée au niveau du cœur dans les neurones intracardiaques par Scornik et ses collaborateurs en 2006. En effet, certains phénomènes arrythmiques observés dans le syndrome du QT long et le syndrome de Brugada n'ont pas pu être entièrement expliqués par les gains et pertes de fonctions de $Na_v1.5$ au niveau du myocarde. L'hypothèse d'une implication du système nerveux autonome dans ces troubles avait auparavant été envisagée, mais la démonstration directe que des altérations de $Na_v1.5$ pouvant affecter le système nerveux autonome n'avait jamais été faite. Ils ont ainsi pu démontrer, sur des neurones intracardiaques de chiens par analyses transcriptomiques, immunohistologiques et électrophysiologiques, l'expression fonctionnelle de $Na_v1.5$ sur ces neurones à l'instar des cardiomyocytes (Scornik et al., 2006). Ces résultats ouvrent la porte à plus d'études du système nerveux autonome dans le cœur, comme ayant une influence modulatrice en conditions physiologiques certes, mais également en conditions pathologiques avec un rôle direct dans plusieurs syndromes congénitaux.

## *2. $Na_v1.5$ dans les muscles squelettiques*

Bien que le $Na_v1.4$ soit le canal sodique voltage-dépendant majoritairement exprimé en conditions physiologiques dans les cellules musculaires striées squelettiques (Loussouarn et al., 2016), il y a également été décrit l'expression du canal sodique $Na_v1.5$, et cette expression aurait un impact non négligeable en conditions pathologiques. En 2004, une étude menée sur des muscles squelettiques de rat dénervé a montré des expressions élevées des canaux sodique $Na_v1.4$ comme $Na_v1.5$. De plus, les fibres les plus sévèrement altérées montrent des décalages hyperpolarisants des courbes d'inactivation pour les courants sodiques associés (Filatov & Rich, 2004). Plus tard en 2010, une autre étude a été menée sur ces fibres musculaires squelettiques de rats mises en culture pendant 7 jours. Ce travail a permis de démontrer par analyses transcriptomiques, protéiques et élecrophysiologiques l'expression fonctionnelle de $Na_v1.5$ qui augmente avec le temps de mise en culture, et qui au $7^{ème}$ jour montre des propriétés d'inactivation décalée similaires à celles retrouvées par Filatov et ses collaborateurs (Filatov & Rich, 2004; Morel et al., 2010). En 2012, Sekiguchi et ses collaborateurs ont travaillé également sur des fibres musculaires dénervées de rat, et ont

montré une concordance entre l'augmentation de l'expression de $Na_v1.5$ avec le temps de dénervation et l'apparition de potentiels de fibrillation musculaire (Sekiguchi et al., 2012). L'ensemble de ces travaux suggère un rôle du canal sodique $Na_v1.5$ dans la perte d'excitabilité de la fibre musculaire squelettique. Enfin, en 2011, le muscle squelettique de rat a été étudié, non pas dans un contexte de dénervation, mais dans un contexte d'immobilisation. Rannou et ses collaborateurs ont décrit une baisse de l'expression de $Na_v1.5$ corrélée avec le temps d'immobilisation du muscle, suggérant ainsi que la possibilité pour le muscle de se raccourcir ou de s'allonger semblait nécessaire à la préservation des propriétés électrophysiologiques et mécaniques du muscle (Rannou et al., 2011).

### *3. $Na_v1.5$ dans les muscles lisses*

Contrairement aux cellules musculaires striées cardiaques, squelettiques et aux neurones, l'initiation électrique de la contraction des cellules musculaires lisses ne répond pas aux mêmes mécanismes électrophysiologiques. Les cellules musculaires lisses ont un potentiel de repos membranaire instable, pouvant générer sans stimuli des dépolarisations spontanées cycliques appelées ondes lentes, qui pourront ensuite atteindre le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action en cas de stimuli. De plus, l'initiation de ce potentiel d'action est médiée par le calcium, et non par le sodium (Mchale et al., 2006). Toutefois, il est fait aujourd'hui de nombreuses démonstrations de la présence fonctionnelle du canal sodique $Na_v1.5$ dans diverses cellules musculaires lisses de l'organisme.

Dans le tractus gastro-intestinal, il a été démontré pour la première fois en 2002 la présence du canal sodique $Na_v1.5$ par analyses transcriptomiques et électrophysiologiques sur des cellules musculaires lisses humaines de jéjunum. Bien qu'il ait été supposé un rôle du courant sodique associé à $Na_v1.5$ dans la contraction des cellules musculaires lisses, et donc dans la motilité intestinale, les fonctions physiologique ou pathologique de ce courant n'avaient pas encore pu être identifiées (Holm et al., 2002; Ou et al., 2002). Puis, en 2003, Strege et ses collaborateurs émettent la même hypothèse en montrant cette fois-ci l'expression de $Na_v1.5$ dans des cellules interstitielles de Cajal fraîchement isolées par les mêmes techniques d'analyses. Les cellules de Cajal sont des cellules «pacemaker» responsables des ondes électriques lentes à l'origine de la contraction du muscle lisse de l'intestin (Strege et al., 2003). Mais en 2006, Locke et ses collaborateurs établissent pour la première fois un lien entre les canalopathies cardiaques sodiques et les pathologies gastro-

intestinales. Ils ont en effet proposé à des patients, atteints du syndrome du QT long et porteurs d'une mutation du gène *SCN5A*, un questionnaire concernant d'éventuels troubles gastro-intestinaux. Or 65% de ces patients ont présentés divers symptômes gastro-intestinaux, dont 50% ont au moins rapporté des douleurs abdominales, concluant ainsi que le rôle des canalopathies sodiques dans les pathologies digestives méritait d'être plus profondément étudié (Locke et al., 2006). En 2009, Saiko et ses collaborateurs seront les premiers à identifier le gène *SCN5A* comme gène candidat dans la pathologie appelée syndrome de l'intestin irritable, dont l'origine génétique avait auparavant été suggérée mais jamais identifiée. En effet, ils ont décrit chez un patient atteint du syndrome de l'intestin irritable une mutation faux-sens G298S du gène *SCN5A*, qui une fois exprimée dans des cellules HEK montre une perte de densité de courant et une cinétique d'activation retardée du canal, signifiant une perte de fonction de $Na_v1.5$ (Saito et al., 2009). Une autre étude de dépistage génétique plus large a été menée par la suite. Beyder et son équipe en 2014 ont montré que sur 584 patients atteints du syndrome de l'intestin irritable, 13 d'entre eux exprimaient des mutations du gène *SCN5A*, et présentaient pour symptômes principaux des problèmes de constipation. L'étude électrophysiologique de ces mutations dans des cellules HEK a montré que 10 de ces mutations exprimaient des altérations fonctionnelles du canal $Na_v1.5$, majoritairement des pertes de fonction (Beyder et al., 2014). La corrélation faite entre la présence de symptômes de constipation et l'expression de pertes de fonction de $Na_v1.5$ suggère l'implication de $Na_v1.5$ dans la motilité intestinale. Il semblerait même que ce rôle soit plus précisément médié par le courant retardé $I_{NaL}$, courant également impliqué dans le syndrome du QT long. Il a en effet été montré que l'utilisation de ranolazine chez des patients atteints d'angine de poitrine stable, un inhibiteur spécifique des courants sodiques retardés $I_{NaL}$, avait pour effet secondaire de provoquer des constipations (Nash & Nash, 2008).

Un autre organe creux tapissé de cellules musculaires lisses exprimerait $Na_v1.5$. En effet il a été montré l'expression du transcrit *Scn5a* dans la couche musculaire lisse longitudinale d'utérus de rates non-gestantes. Cependant, les transcrits Scn2a1, Scn3a et Scn8a y sont également exprimés. Il semblerait néanmoins que les contractions rythmiques utérines soient plutôt activées par des canaux sensibles à la TTX (Seda et al., 2007).

De nombreuses études électrophysiologiques ont aussi démontré la présence de courants sodiques voltage-dépendants dans le muscle lisse vasculaire, notamment au niveau

de la veine porte (Mironneau et al., 1990) ou des artères coronaire (Quignard et al., 1997) et mésentérique (Berra-Romani, Blaustein, & Matteson, 2005). Cependant aujourd'hui peu d'études ont décrit la présence effective du canal sodique $Na_v1.5$ dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Dans l'artère fémorale de rat, sa présence a été démontrée par immunofluorescence dans le muscle lisse comme dans l'endothélium. Dans cette étude, les auteurs ont étudié la contraction *ex vivo* d'artères fémorales de rats pour observer les effets potentiels d'activateurs ou d'inhibiteurs du courant $I_{NaL}$ cardiaque. Ils ont ainsi pu montrer dans un premier temps que la vératridine, activateur du courant $I_{NaL}$, induisait la contraction des artères fémorales. Cette contraction est inhibée en absence de sodium dans le milieu, en présence d'inhibiteur de l'échangeur $Na^+/Ca^{2+}$, d'inhibiteur du courant $I_{NaL}$ ou de TTX. De plus il est montré que la contraction des artères fémorales induite par la vératridine est similaire en présence ou en absence de l'endothélium (Bocquet et al., 2010). Ces résultats suggèrent donc une implication du courant sodique $I_{NaL}$ porté par $Na_v1.5$ dans la contraction des artères fémorales, médiée par la voie de signalisation calcique impliquant les échangeurs membranaires $Na^+/Ca^{2+}$. L'absence de l'endothélium n'empêchant pas la contraction sous vératridine, il semblerait que la fonction de $Na_v1.5$ dans la contraction trouve son origine dans son expression sur les cellules musculaires lisses, et non par celle détectée sur les cellules endothéliales. Sans montrer une preuve directe de l'expression de $Na_v1.5$, la même démonstration a été réalisée sur des aortes de rats avec ou sans endothélium. La contraction par la vératridine des aortes est inhibée par la TTX mais également par la ranolazine, inhibiteur sélectif du courant cardiaque persistant $I_{NaL}$ (Virsolvy et al., 2015).

Enfin, il a également été montré l'implication de $Na_v1.5$ dans l'activité électrique des cellules musculaires lisses pulmonaires. Dans un premier temps au niveau vasculaire, il a été décrit en 2005 puis en 2011 dans des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires humaines mises en culture une expression de l'ARNm *SCN5A*. Cette expression semble néanmoins minime comparées aux autres isoformes de canaux sodiques retrouvées. De plus les courants sodiques enregistrés dans ces cellules sont vraisemblablement portés par des canaux sodiques sensibles à la TTX (Firth et al., 2011; Platoshyn et al., 2005). Jo et ses collaborateurs ont montré l'expression de l'ARNm *SCN5A* dans des cellules musculaires lisses isolées d'artère pulmonaire principale humaine, non mises en culture. Cependant le canal $Na_v1.5$ ne semble pas porter le courant sodique enregistré dans ces cellules car ce courant $I_{Na}$

est trop sensible à l'inhibition par la TTX (Jo et al., 2004). Mais un autre type de cellule musculaire lisse doit être pris en compte dans les poumons : les cellules musculaires lisses des voies aériennes. En 2004 des travaux menés sur des cellules musculaires lisses des bronches humaines en culture ont montré une expression faible de l'ARNm *SCN5A* par PCR, expression qui ne semble d'ailleurs pas fonctionnelle d'après les enregistrements électrophysiologiques des courants sodiques effectués, qui sont sensibles à la TTX (Jo et al., 2004). Mais en 2001, Bradley et son équipe ont étudié des cellules musculaires lisses de bronches de lapin, cette fois-ci fraîchement isolées et non mises en culture. Ils ont clairement pu mettre en évidence l'expression de l'ARNm *Scn5a* par PCR, tout en démontrant en parallèle un courant sodique dans ces cellules ayant des propriétés électrophysiologiques similaires au courant porté par le canal sodique humain $Na_v1.5$ exprimé dans des cellules HEK293 (Bradley et al., 2013). Bien qu'ils n'aient pas été en mesure de démontrer l'effet de ce courant sodique sur la contraction myogénique des voies respiratoires, l'hypothèse d'une implication de $Na_v1.5$ dans le remodelage pulmonaire ou dans les phénomènes de bronchospasmes est à envisager (Bradley et al., 2013).

## B. $Na_v1.5$ dans les cellules dites non-excitables

### *1. $Na_v1.5$ dans les fibroblastes*

Les fibroblastes cardiaques sont essentiellement connus pour leur rôle central dans le maintien de la matrice extracellulaire dans le cœur normal, tandis qu'en condition pathologique ils agissent comme des médiateurs des remodelages inflammatoire et fibrotique (Brown et al., 2005). En effet les fibroblastes en condition pathologique vont migrer et se différencier en myofibroblastes, qui vont synthétiser des protéines de la matrice extracellulaire de manière excessive conduisant à une fibrose myocardique (Swynghedauw, 1999). Bien que ces fibroblastes soient qualifiés de cellules non-excitables, il est depuis quelques années démontré qu'ils contribuent pourtant à l'activité électrophysiologique des cardiomyocytes en formant avec eux un important réseau de contact par couplage électrique (Gaudesius et al., 2003; Kohl et al., 2005; Miragoli, Gaudesius, & Rohr, 2006). En voulant étudier l'expression des divers canaux ioniques présents dans les fibroblastes cardiaques, Li et ses collaborateurs en 2009 ont été les premiers à montrer la présence du canal sodique $Na_v1.5$ dans ces cellules. Ils ont en effet démontré la présence de l'ARNm *SCN5A* par PCR ainsi

qu'un courant sodique ayant certaines propriétés similaires à celles observées dans les cardiomyocytes, courant présent dans au moins 61% des fibroblastes ventriculaires humains commerciaux en culture étudiés (Li et al., 2009). Suite à cela, une autre étude réalisée cette fois-ci sur des fibroblastes atriaux humains fraichement mis en culture a montré également une expression du messager codant pour $Na_v1.5$. Par cette nouvelle étude il est surtout démontré que l'expression de $Na_v1.5$, finalement relativement faible dans les fibroblastes, est associée à une absence de courants sodiques dans ces cellules. En revanche, au cours de leur différenciation en myofibroblastes, l'expression de l'ARNm *SCN5A* ainsi que les courants sodiques associés augmentent considérablement, suggérant ainsi que cette expression de $Na_v1.5$ dans les fibroblastes serait plutôt liée à la différenciation en myofibroblaste (Chatelier et al., 2012). Les observations de Li et ses collaborateurs, décrivant des courants sodiques dans 61% de leurs cellules commerciales, ayant notamment subi plusieurs passages, suggèrent finalement dans ces cellules la présence de nombreux myofibroblastes (Chatelier et al., 2012; Li et al., 2009). Cette expression, modulée lors de la différenciation de ces cellules en myofibroblastes, suggère que $Na_v1.5$ serait directement associé à la transition vers un phénotype fibrotique.

### *2. $Na_v1.5$ dans les cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales vasculaires forment une barrière de perméabilité entre le sang et le muscle lisse de la paroi vasculaire. Elles contribuent également aux processus de croissance et de réparation vasculaires et de contrôle du tonus par sécrétion de facteurs relaxants et contractiles (Gosling et al., 1998). Les cellules endothéliales n'ont jamais été décrites comme produisant des potentiels d'action et sont donc classées comme cellules non-excitables. Mais des courants ioniques sont pourtant enregistrés dans ces cellules, et notamment des courants sodiques voltage-dépendants. Dans des cellules endothéliales de veine saphène humaine isolées puis mises en culture, l'ARNm *SCN5A* a été détecté par PCR et associé à un courant sodique répondant aux mêmes caractéristiques électrophysiologiques que celui détecté dans le cœur (Gosling et al., 1998). Dans ces cellules en culture, le potentiel de repos avoisine les -30mV mais est plus proche de -70mV dans des cellules fraîchement isolées. Ces potentiels de membrane se situent à l'instar des neurones dans la fenêtre de potentiel où un courant de fenêtre peut provoquer l'activation de certains canaux $Na_v1.5$ disponibles et ainsi déclencher une dépolarisation, possiblement impliquée dans la

contraction de ces vaisseaux. Mais il a également été décrit l'expression de $Na_v1.5$ dans l'endothélium des artères fémorales de rats. Comme expliqué précédemment il semblerait que l'expression fonctionnelle de $Na_v1.5$ dans ces artères, induisant la contraction de ces dernières, soit plutôt portée par les canaux présents dans les cellules musculaires lisses, comme c'est également le cas dans les aortes de rats (Bocquet et al., 2010; Virsolvy et al., 2015). D'autres travaux restent encore à être menés pour comprendre le rôle éventuel de $Na_v1.5$ dans les cellules endothéliales.

### 3. $Na_v1.5$ dans les cellules épithéliales

Dans les cellules épithéliales, très peu de travaux ont été effectués concernant les courants sodiques voltage-dépendants. Seule une étude montre l'expression de l'ARNm *Scn5a* dans une lignée de cellules épithéliales gastriques de rat RGM-1 et la présence d'un courant sodique résistant à la TTX, suggérant la présence fonctionnelle du canal sodique $Na_v1.5$ dans ces cellules. L'inhibition du courant sodique ou la régulation à la baisse de l'expression de $Na_v1.5$ conduisent à la suppression de la prolifération de la lignée cellulaire RGM-1, montrant l'implication de $Na_v1.5$ dans la prolifération épithéliale. Son rôle éventuel dans la protection des muqueuses reste encore à être étudié (Wu et al., 2006).

### 4. $Na_v1.5$ dans les cellules gliales

Les cellules gliales sont localisées dans le système nerveux, entourant les neurones et participant au contrôle des homéostasies chimique et électrique de leur environnement. Parmi elles, les astrocytes sont des cellules étoilées qui assurent essentiellement des rôles de support et de protection, constituant ainsi une assise pour les neurones (Oberheim, Goldman, & Nedergaard, 2012).

Bien que de nombreuses études suggéraient déjà la présence de courants sodiques résistants à la TTX dans les astrocytes, Black et ses collaborateurs en 1998 sont les premiers à montrer l'expression de $Na_v1.5$ dans des astrocytes de moëlle épinière de rats, au niveau du transcrit et de la protéine *in vitro* mais également *in situ* (Black et al., 1998). Il a ensuite montré en 2010 que cette expression de $Na_v1.5$ dans les astrocytes chez l'Homme était dynamique : presque nulle en condition physiologique, elle augmentait en condition pathologique dans des contextes de sclérose en plaque, d'accident vasculaire cérébral ou de tumeur au cerveau. Leur hypothèse était que l'expression régulée de $Na_v1.5$ dans les astrocytes était compensatoire

dans le maintien de l'homéostasie ionique dans les zones lésées du système nerveux central (Black, Newcombe, & Waxman, 2010). Mais en 2014, la même équipe a montré dans un modèle *in vitro* d'astrocytes de rats que les mécanismes de prolifération et de migration de ces cellules en cas de lésion mécanique étaient atténués par une forte dose de TTX, par une inhibition d'expression de $Na_v1.5$ par un siRNA (Pappalardo et al., 2014), mais également par un inhibiteur des échangeurs $Na^+/Ca^{2+}$. De plus l'inhibition d'expression de $Na_v1.5$ (par le siRNA) ou de fonction (par la TTX) dans les astrocytes conduirait à une diminution du pic de calcium intracellulaire observé lors de leurs lésions mécaniques (Pappalardo et al., 2014). Ainsi le rôle de $Na_v1.5$ dans les astrocytes serait plutôt lié à la migration et la prolifération cellulaire, faisant intervenir la signalisation calcique par l'échangeur $Na^+/Ca^{2+}$.

Parallèlement les cellules de la microglie sont des cellules immunitaires résidentes du système nerveux central qui assurent la surveillance du cerveau et de la moelle épinière. Elles sont activées par lésions tissulaires et ont diverses fonctions comme la prolifération, la migration, la phagocytose et les sécrétions de cytokines et chimiokines (Black, Liu, & Waxman, 2009). Il a été montré une expression du canal sodique $Na_v1.5$ dans des cellules microgliales isolées de rats par immunofluorescence (Black et al., 2009). Cependant, il semble que dans ce type cellulaire, l'activité sodique soit exclusivement portée par une autre isoforme de canal sodique voltage-dépendant, $Na_v1.6$ (Black et al., 2009; Craner et al., 2005).

## *5. $Na_v1.5$ dans les cellules immunitaires*

Les macrophages sont des cellules à activité de phagocytose qui sont en première ligne de la défense de l'organisme contre les micro-organismes. Ces derniers agissent *via* des mécanismes de signalisation très rapides. C'est pourquoi il a été envisagé l'hypothèse de l'intervention d'une activité électrique dans ces cellules, médiée par un courant sodique (Waxman Carrithers et al., 2007). Il a effectivement été décrit dans une étude une expression de $Na_v1.5$ dans des macrophages dérivés de monocytes humains primaires par immunofluorescence, plus précisément au niveau des endosomes tardifs. De plus, il a été montré que l'inhibition du canal sodique $Na_v1.5$ par de fortes doses de TTX, ainsi que la répression de son expression par invalidation, inhibaient les processus de phagocytose dans ces macrophages activés par le LPS. Il a aussi été suggéré que $Na_v1.5$ jouait un rôle essentiel dans le processus d'acidification des endosomes (Waxman Carrithers et al., 2007). Cependant une autre étude, sans montrer directement l'expression de $Na_v1.5$ dans les macrophages, met

en lumière une fonction très intéressante de ces cellules qui pourrait impliquer ce canal. En effet, Hulsmans et ses collaborateurs en 2017 ont montré que les macrophages résidents du cœur avaient un rôle électrique. D'après leurs travaux, ces macrophages faciliteraient la conduction électrique à travers le nœud auriculo-ventriculaire, là où les cellules cardiomyocytaires conductrices du potentiel d'action s'entremêlent de manière importante avec des macrophages. De plus les macrophages expriment la connexine 43, la protéine majeure du couplage électrique cardiaque formant les jonctions communicantes. Lorsqu'ils sont couplés *via* des jonctions communicantes à des cardiomyocytes battant spontanément, les macrophages cardiaques ont également un potentiel de membrane de repos négatif et se dépolarisent en synchronie avec les cardiomyocytes (Hulsmans et al., 2017). L'expression de $Na_v1.5$ à la membrane plasmique de ces macrophages cardiaques résidents n'a pourtant pas été étudiée à ce jour, mais mérite de nouvelles investigations.

$Na_v1.5$ a été identifié dans un autre type cellulaire du système immunitaire. En effet, Lo et ses collaborateurs en 2012 ont étudié la sélection positive des lymphocytes T $CD4^+$, nécessaire à génération de la réponse immunitaire adaptative. Pour une sélection positive des lymphocytes dans le thymus, une entrée prolongée de calcium dans les thymocytes double positifs $CD4^+$ $CD8^+$ est nécessaire. Ils ont montré que ces thymocytes double positifs présélectionnés par le thymus exprimaient fortement l'ARNm *SCN5A*. De plus, ils décrivent le fait qu'une inhibition de $Na_v1.5$ par la TTX ou une répression de son expression par un ARN interférent conduit à une non sélection de thymocytes exprimant le CD4 (Lo, Donermeyer, & Allen, 2012). Ces résultats suggèrent un rôle important de $Na_v1.5$ dans la sélection positive des lymphocytes dans le thymus, qui serait médiée la voie de signalisation du calcium (Lo et al., 2012; Malissen, 2012; Milam et al., 2018).

## *6. $Na_v1.5$ dans les cellules tumorales*

Les cancers, qui sont la plupart du temps des maladies génétiques sporadiques, sont parmi les principales causes de décès dans le monde. Le terme « cancer » englobe un groupe de maladies se caractérisant par la multiplication et la propagation anarchiques de cellules anormales (Fondation contre le Cancer, 2016). Depuis une vingtaine d'année maintenant, de nombreuses études se sont intéressées aux canaux ioniques voltage-dépendants dans ce contexte. En effet les canaux ioniques, exprimés à la membrane plasmique, sont des protéines clés de l'homéostasie ionique, du potentiel membranaire, du volume cellulaire et de la

signalisation intracellulaire. De manière intéressante, les surexpression ou sous-expression de certains canaux ioniques dans les cellules cancéreuses ont été rapportées comparées aux cellules non-cancéreuses correspondantes (Roger et al., 2015), la protéine $Na_v1.5$ en faisant partie.

Le cancer du sein est la principale cause de décès par cancer chez les femmes à travers le monde. Les patients meurent principalement en raison de l'apparition et du développement des métastases qui dépendent en partie de la capacité des cellules cancéreuses à dégrader les matrices extracellulaires et à migrer (Driffort et al., 2014). Roger et son équipe sont les premiers à avoir identifié un courant sodique entrant, rapide, et inhibé par de fortes concentrations de TTX dans une lignée cellulaire humain de cancer du sein MDA MB 231. Ceci suggère l'expression fonctionnelle de l'isoforme $Na_v1.5$ du canal sodique voltage dépendant. Ils ont par ailleurs montré que l'inhibition du courant sodique par la TTX inhibait d'environ 30% l'invasion par ces cellules cancéreuses (Roger, Besson, & Le Guennec, 2003). Plus tard, en 2005, Fraser et ses collaborateurs ont finalement montré sur ces mêmes cellules mais également sur des biopsies humaines que ces courants sodiques étaient bel et bien portés par le canal sodique $Na_v1.5$, mais sous sa forme dite néonatale. Ils ont également montré que cette expression de $Na_v1.5$, absente ou presque dans des cellules saines, était augmentée avec l'acquisition d'un phénotype métastatique, notamment en amplifiant les pouvoirs de migration et d'endocytose de ces cellules cancéreuses. A l'issu de leurs travaux, les auteurs ont formulé diverses hypothèses pour expliquer l'augmentation d'expression de $Na_v1.5$ dans les cellules métastatiques, et ont par exemple suggéré l'induction de cette expression par des hormones stéroïdes comme les œstrogènes, ou par des facteurs de croissance, tout en n'excluant pas l'influence activatrice potentielle des cellules environnantes comme les fibroblastes (Fraser et al., 2005). Pour expliquer les mécanismes d'action du canal sodique $Na_v1.5$ sur la capacité d'invasion des cellules cancéreuses, Gillet et ses collaborateurs en 2009 ont aussi utilisé la lignée cellulaire MDA MB 231. Leurs travaux ont permis de montrer que l'action de $Na_v1.5$ dans ces cellules passait par une acidification autour de la membrane plasmique, conduisant à l'activation de cathepsines B et S qui sont des protéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (Gillet et al., 2009). Une autre étude est venue confirmer cette hypothèse, en montrant la colocalisation de $Na_v1.5$ à la membrane plasmique des cellules cancéreuses avec la cavéoline 1 et l'échangeur $Na^+/H^+$ appelé NHE1, qui après

activation par $Na_v1.5$ serait responsable de l'acidification précédemment observée (Brisson et al., 2013). $Na_v1.5$ devenant ainsi une cible thérapeutique intéressante pour empêcher le développement de métastases dans le cancer du sein, Driffort et ses collaborateurs ont démontré, grâce à leurs travaux menés sur des cellules MDA MB 231 injectées à des souris immunodéprimées que la répression totale de $Na_v1.5$ dans ces cellules par un ARNsh pouvait empêcher totalement la colonisation pulmonaire par ces cellules cancéreuses. De plus, ils ont également injecté à ces souris de la ranolazine, un inhibiteur du courant persistant $I_{NaL}$ porté par $Na_v1.5$. L'inhibition de ce courant persistant conduit à une diminution significative de la colonisation pulmonaire des cellules MDA MB 231 *in vivo*. Ces résultats montrent qu'il est possible d'inhiber la capacité métastatique des cellules cancéreuses du sein *in vivo*, notamment en inhibant l'activité électrique du canal sodique $Na_v1.5$.

Le cancer des ovaires est l'un des cancers également très fréquent chez les femmes. Il est intéressant de remarquer que les observations faites sur l'expression de $Na_v1.5$ dans des lignées de cellules cancéreuses humaines d'ovaires sont exactement les mêmes que celles réalisées dans les lignées de cellules cancéreuses du sein. Le niveau de $Na_v1.5$ dans les cellules saines est presque indétectable, tandis qu'une expression nette est observée dans les cellules cancéreuses. L'inhibition du courant sodique porté par $Na_v1.5$ par de fortes concentrations de TTX diminue de 50 à 60% le pouvoir de migration des cellules cancéreuses des ovaires. Il est également observé dans des biopsies une expression plus élevée de $Na_v1.5$ dans des cellules cancéreuses bien établies comparées aux cellules de tumeur ovariennes bénignes (Gao et al., 2010). Ces résultats confirment la corrélation entre le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses et le niveau d'expression fonctionnelle de $Na_v1.5$.

Le cancer de la prostate est le type de cancer le plus répandu chez les hommes (Shan et al., 2014). Des courants sodiques ont également été impliqués dans l'évolution agressive de ce dernier. L'expression du transcrit *SCN5A* codant pour $Na_v1.5$ a été observée dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses prostatiques (Suy et al., 2012). Cependant son implication semble être bien différente dans ces cellules, comparée à ce qui a été observé dans les cancers du sein et des ovaires. En effet en 2014 Shan et son équipe ont montré que le canal sodique $Na_v1.5$ était exprimé dans les tissus de prostate normaux et dans les tumeurs bénignes à un niveau significatif, et qu'en revanche ce niveau d'expression diminuait dans les cellules cancéreuses bien établies (Shan et al., 2014), suggérant que le potentiel métastatique

de ces cellules était plutôt médié par l'expression de l'isoforme $Na_v1.6$. Néanmoins, en 2009, une étude très intéressante a montré un risque plus important pour des patients atteints du syndrome de Brugada de développer un cancer de la prostate. Le syndrome de Brugada, souvent associée à une perte de fonction de $Na_v1.5$, est en effet une pathologie touchant majoritairement les hommes. Ces patients présentent des concentrations plasmatiques de testostérone plus élevées que des hommes sains (Haruta et al., 2009). L'étude montre par ailleurs que suite à une castration chimique dans le cadre du traitement du cancer de la prostate, les tracés ECG caractéristique du syndrome de Brugada de deux patients sont devenus normaux (Haruta et al., 2009).

L'hypothèse formulée précédemment par Fraser en 2005, proposant que l'augmentation de l'expression de $Na_v1.5$ dans les cellules métastatiques des cancers féminins était contrôlée par l'expression des œstrogènes semble donc pertinente, bien qu'il soit possible d'envisager une action directe de la testostérone sur l'expression des canaux sodiques $Na_v1.5$ également. De toute évidence, l'implication potentielle des hormones sexuelles dans le contrôle de l'expression de $Na_v1.5$ mérite de plus amples travaux, *a minima* dans le contexte tumoral. Cependant, l'expression de $Na_v1.5$ a été associée à la migration des cellules dans d'autres cancers non contrôlés par des facteurs hormonaux. Il a été observé l'inhibition de courants sodiques, par des concentrations fortes de TTX et par l'utilisation de siRNA dirigés contre *SCN5A*, dans différentes lignées de cellules humaines cancéreuses du côlon. Ces inhibitions des courants sodiques portés par $Na_v1.5$ ont été associées à la baisse du potentiel d'invasion de ces cellules cancéreuses. Il est de plus décrit une augmentation de l'expression de $Na_v1.5$ dans des biopsies humaines de patients atteints de cancer du côlon, tandis que le niveau d'expression de $Na_v1.5$ est presque indétectable dans les biopsies contrôles (House et al., 2010). Les cellules Jurkat, une lignée immortalisée de lymphocytes T CD4 humains et utilisées en recherche comme modèle notamment dans les études portant sur la leucémie, ont également été étudiées. Il a été décrit dans ces cellules la présence de l'ARNm *SCN5A* et d'un courant sodique, dont l'inhibition par de fortes concentrations de TTX est corrélée à une inhibition du pouvoir d'invasion des cellules Jurkat (Fraser et al., 2004). Enfin, le cancer non à petites cellules est un cancer des cellules épithéliales, représentant 80 à 85% de l'ensemble des cancers des poumons (American Cancer Society, 2016). Il a également été montré dans plusieurs lignées issues de cellules humaines de ce type de cancer

l'expression de canaux sodiques voltage-dépendants, notamment l'expression de $Na_v1.5$, qui semblent impliquée dans le processus métastatique de ces cellules (Roger et al., 2007). Il a cependant été montré plus tard que le courant sodique dans ce contexte était plutôt porté par le canal sodique $Na_v1.7$, et son expression a d'ailleurs été clairement confirmée dans des biopsies de cancers du poumons de patients humains (Campbell, Main, & Fitzgerald, 2013). Le rôle de $Na_v1.5$ dans l'agressivité des cancers semble donc pertinent, bien qu'il serait intéressant aujourd'hui de réaliser plus d'études *in vivo* tout en s'intéressant à l'importance du sexe et de l'influence hormonale sur l'expression et l'activité de $Na_v1.5$.

Le canal sodique $Na_v1.5$, par son expression fonctionnelle dans de nombreux types cellulaires excitables comme non-excitables, montre aujourd'hui de nouvelles fonctions très intéressantes, encore très mal connues et qui sont vouées à être rapidement explorées. Bien que son mode d'action soit toujours fortement lié à son activité électrique, il est mis en évidence de nos jours un vrai rôle de protéine médiatrice de voies de signalisation très diverses, notamment par interaction directe avec l'environnement et plus particulièrement avec la matrice extracellulaire. Les différentes fonctions démontrées ou potentielles à explorer sont résumées Table 1.

| Nav1.5 dans les cellules excitables | |
|---|---|
| Cardiomyocytes | Rythmicité électrique<br>Conduction électrique<br>Contraction |
| Neurones | Excitabilité neuronale<br>Développement neuronal |
| Cellules musculaires squelettiques | Contraction |
| Cellules musculaires lisses | Contraction |
| **Nav1.5 dans les cellules non-excitables** | |
| Fibroblastes | Différenciation en myofibroblastes |
| Cellules endothéliales | Non défini |
| Cellules épithéliales | Prolifération |
| Cellules gliales | Migration<br>Prolifération |
| Cellules immunitaires | Acidification des endosomes macrophagiques<br>Conduction électrique<br>Sélection positivie des LT $CD4^+$ |
| Cellules tumorales | Migration<br>Invasion |

Table 1. **$Na_v1.5$ et ses différentes fonctions à explorer dans les cellules excitables et non-excitables.**

Les poumons, riches de nombreux types cellulaires exprimant potentiellement $Na_v1.5$, sont les organes les plus proches du cœur et les plus connectés à sa fonction de pompe circulatoire. Pourtant, l'expression de $Na_v1.5$ dans les poumons et ses éventuelles implications en physiologie et en pathologies pulmonaires n'ont encore jamais été réellement explorées.

# III. Le système respiratoire : physiologie et physiopathologie

## A. Anatomie et fonction

### *1. Le système respiratoire*

Le système respiratoire est un ensemble de conduits permettant le passage de l'air, qui le filtre et le transporte du milieu extérieur jusqu'à l'intérieur du poumon où les échanges gazeux vont s'opérer entre l'environnement et le sang.

Le système respiratoire supérieur comprend de haut en bas : le nez et la bouche, le pharynx et le larynx. Ce système supérieur remplit plusieurs fonctions : le nez par exemple a

un rôle olfactif, le pharynx est un carrefour aéro-digestif, et le larynx est le siège de la phonation. Toutefois leur fonction principale reste la conduction de l'air en direction des poumons. L'entrée de l'air dans ces structures est ajustée à la température interne de l'organisme à 37°C, et une muqueuse ciliée tapissant l'ensemble des conduits aériens assure une filtration en évacuant vers l'extérieur les micro-organismes, poussières et débris.

Le système respiratoire inférieur comprend : la trachée, les bronches primaires, secondaires, tertiaires, les bronchioles et les sacs alvéolaires (Figure 11). Ce système inférieur, lui, est exclusivement dédié à la fonction respiratoire. Il est également entièrement tapissé d'un épithélium muqueux filtrant l'air et encerclé de cellules musculaires lisses permettant le contrôle des calibres des conduits respiratoires, afin de réguler les débits d'air entrant et sortant des poumons. Anatomiquement, le système respiratoire intérieur peut être divisé en deux ensembles : les conduits extra-pulmonaires (la trachée et les deux bronches primaires qui entrent dans les poumons) et les conduits intra-pulmonaires (les deux bronches primaires, les bronches secondaires, tertiaires, les bronchioles et les sacs alvéolaires).

Au niveau fonctionnel en revanche, on parle de :

- La zone de conduction, qui comprend tous les conduits aériens allant de la trachée jusqu'aux bronchioles ;
- La zone d'échange, qui comprend tous les sacs alvéolaires des poumons.

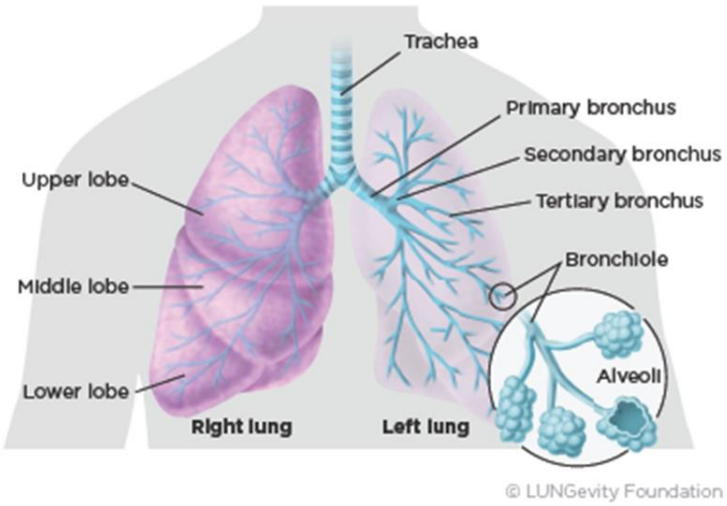


Figure 11. **Schéma de l'anatomie générale du système respiratoire inférieur humain.** Le poumon droit contient 3 lobes tandis que le poumon gauche en contient seulement 2. Schéma issu de la LUNGevity Foundation (https://lungevity.org).

## 2. La zone de conduction

La zone de conduction est constituée des ramifications du conduit aérien principal qui entrent dans les poumons. Les deux bronches primaires droite et gauche, issues de la trachée, entrent chacune dans un poumon. Elles se divisent ensuite en bronches secondaires à destination de chaque lobe pulmonaire. Puis ces dernières se divisent en bronches tertiaires, également appelée segmentaires, qui se répartissent dans toutes les régions pulmonaires (Figure 11). Ces conduits continuent de se diviser dans les divers segments pulmonaires pour aboutir chez l'Homme à des conduits de petits diamètres (<1mm) appelés bronchioles, qui sont les plus petites structures de la zone de conduction (Marieb et al., 2015). Les compositions des parois de ces différentes structures qui se divisent varient selon le diamètre, mais on y retrouve de manière générale les composantes suivantes, du centre vers la périphérie de la lumière bronchique : une couche de cellules épithéliales reposant sur une membrane basale, une couche de cellules musculaires lisses, et une adventice comprenant une matrice extracellulaire de collagène et d'élastine, des vaisseaux sanguins et des cellules immunitaires résidentes (Figure 12) (Rydell-Törmänen et al., 2013). Plus spécifiquement, des anneaux cartilagineux retrouvés dans la trachée sont remplacés progressivement par des plaques irrégulières de cartilage autour des bronches, puis se raréfient jusqu'à disparaître (Marieb et al., 2015). Concernant la répartition des muscles lisses, alors qu'on n'en retrouve qu'une fine paroi dans la paroi postérieure de la trachée, les bronches sont complètement entourées de couches de cellules musculaires lisses en forme d'hélice. L'orientation en hélice suggère une structure architecturale très efficace, qui améliore la capacité du muscle à induire la bronchoconstriction (Amrani & Panettieri, 2003). Ces modifications de structures témoignent d'une différence d'implication dans les fonctions conductrices de l'air. Plus la paroi est rigidifiée par le cartilage et moins elle participe à la régulation du flux d'air. En revanche les structures plus musculaires sont soumises à plus de mécanismes de régulation et sont très fortement impliquées dans l'adaptation du calibre des voies respiratoires, modulant ainsi leur résistance au passage de l'air. Cette modulation de la réactivité bronchique en fonction des besoins est l'une des fonctions essentielles du système de conduction respiratoire.

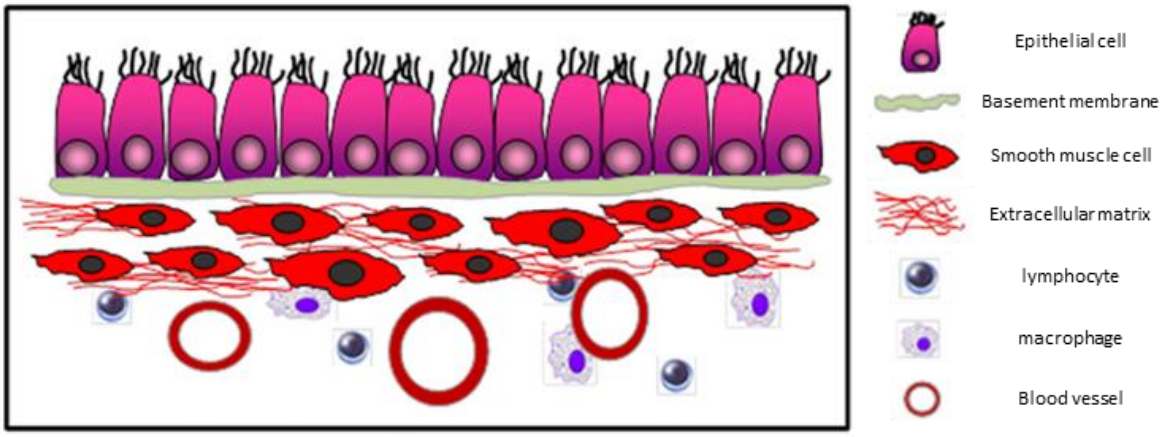


Figure 12. **Structure des voies respiratoires saines humaines.**
Représentation générale d'une bronche de la zone de conduction dans les poumons humaisn sains. Schéma adapté d'après Rydell-Törmänen et al., 2013.

## 3. La circulation pulmonaire

Les conduits respiratoires sont entourés de la circulation pulmonaire. Les artères pulmonaires, transportant le sang pauvre en $O_2$ sortant du ventricule droit, cheminent le long des bronches principales puis se ramifient parallèlement aux bronches à l'intérieur du poumon pour donner des artérioles proches des bronchioles juste avant la zone d'échange (Townsley, 2013). Les veines pulmonaires en sortie de la zone d'échange, transportant le sang néo-oxygéné vers le cœur gauche, présentent des ramifications similaires allant des veinules de petit diamètre jusqu'aux deux veines pulmonaires gauches et deux veines pulmonaires droites sortant des poumons le long des bronches principales. En revanche, à l'intérieur du poumon, les veines cheminent indépendamment des bronches contrairement aux artères : chez le rongeur les veines sont systématiquement isolées des autres structures, tandis que chez l'Homme les veines cheminent proches des artères et des bronches au niveau distal tandis qu'elles divergent complètement au niveau proximal (Townsley, 2013).

La structure des artères de la circulation pulmonaire n'est pas tout à fait identique à celle des artères de la circulation systémique. Dans les poumons ces artères ont une paroi vasculaire plus fine, avec moins de cellules musculaires lisses (Suresh & Shimoda, 2016). Néanmoins l'organisation globale est ressemblante, avec la présence de trois tuniques : l'*intima* (formée d'une monocouche de cellules endothéliales), la *media* (formée par les cellules musculaires lisses) et l'adventice (riche en fibres d'élastine, de collagènes et de fibroblastes). L'adventice est commune pour l'artère et la bronche associée. La *media* des artères de gros calibre contient plusieurs couches de cellules musculaires lisses, mais la

quantité relative de ces cellules diminue au fur et à mesure des ramifications artérielles, pour devenir quasiment nulle au niveau des artérioles (Townsley, 2013). Les veines sont également organisées en trois tuniques, mais comparées aux artères correspondantes elles présentent une *media* musculaire beaucoup plus fine et visible uniquement sur les veines de gros diamètre. L'adventice quant à elle est plus épaisse dans les veines que dans les artères pulmonaires (Townsley, 2013). Mais les veines pulmonaires présentent une spécificité importante comparée aux artères, et aussi comparée aux autres veines de l'organisme. Dans les poumons, les veines pulmonaires sont tapissées d'une couche de myocarde, issue d'un « débordement » du développement du myocarde de l'oreillette gauche en aval. Ces cellules ont une morphologie proche des cardiomyocytes retrouvés dans le cœur, et leur profil d'expression semble similaire à celui du muscle cardiaque auriculaire puisque ces cellules expriment des protéines de jonctions intercellulaires de type connexines et des canaux ioniques à activité dépendante du potentiel (Townsley, 2013). Chez l'Homme ces cellules cardiomyocytaires sont retrouvées dans les veines proximales de gros calibre tandis que chez le rongeur on les retrouve dans la paroi de toutes les veines pulmonaires (Mueller-Hoecker et al., 2008; Townsley, 2013). Ces cellules présentent une activité électrique dont le rôle en physiologie n'a pas été déterminé, mais qui en pathologie a été associé à des phénomènes de fibrillation atriale (Chang et al., 2016; Takahara et al., 2014). La présence de ce myocarde veineux pulmonaire témoigne d'une connexion vasculaire extrêmement importante entre le cœur et les poumons, proche de la zone de conduction respiratoire.

### *4. La zone d'échanges*

Les ramifications terminales des bronchioles de la zone de conduction se terminent dans la zone d'échange des poumons, proches des ramifications terminales des artérioles et veinules au niveau du réseau capillaire. Des conduits alvéolaires de très petit diamètre, constitués d'anneaux très fins d'élastine, de collagène et de muscle lisse se terminent par des grappes d'alvéoles pulmonaires, chacune de ces alvéoles étant le siège d'échanges gazeux avec les capillaires sanguins à proximité (Schittny, 2017). Dans cette zone d'échanges, l'$O_2$ passe des alvéoles au sang tandis que le $CO_2$ passe du sang aux alvéoles (Doyle, Nicholas, & Bersten, 1999). Ces échanges gazeux se produisent par diffusion simple au travers d'une membrane alvéolo-capillaire, composée de cellules épithéliales particulières appelées pneumocytes de type I (Figure 13). Des macrophages provenant de la circulation sanguine

peuvent également être retrouvés dans ces zones d'échanges puisque les cellules de l'immunité peuvent aussi traverser la membrane alvéolo-capillaire, ce qui a des conséquences importantes sur la diffusion de l'air en pathologie.

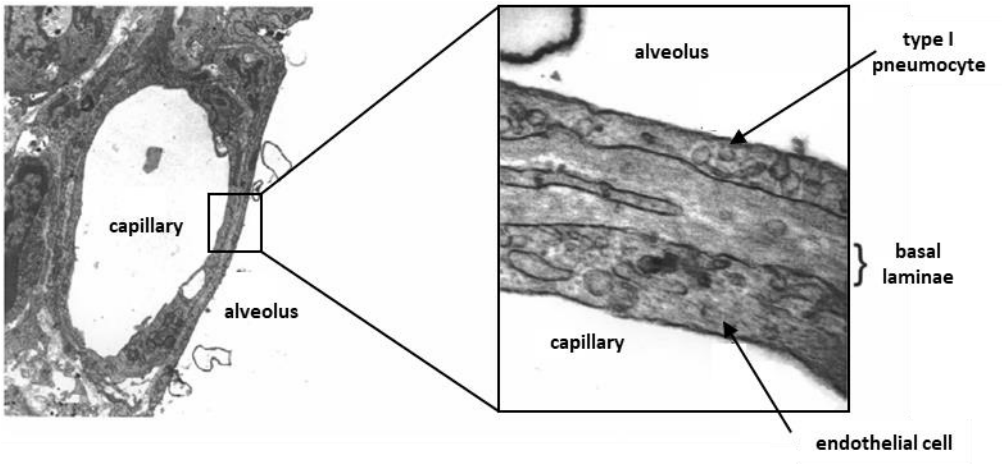


Figure 13. **Image de microscopie électronique d'une barrière alvéolo-capillaire.**
Image enregistrée à partir de poumons de cochons d'Inde. Image adaptée de Huang et al., 2001.

## *5. La régulation de la réactivité bronchique par les cellules musculaires lisses respiratoires*

### a. La contraction des cellules musculaires lisses

La réactivité bronchique traduit l'aptitude des voies aériennes de la zone de conduction de sujets sains à diminuer leur diamètre en réponse à de fortes stimulations physique, chimique ou pharmacologique. Le muscle lisse est l'un des principaux effecteurs de cette réactivité bronchique (Molimard, Lara, & Marthan, 1998). Contrairement au cardiomyocyte, dont la contraction dépend essentiellement de la genèse d'un potentiel d'action, la contraction du muscle lisse bronchique est contrôlée par des messagers extracellulaires. La contraction des cellules musculaires lisses est principalement commandée par l'innervation cholinergique (Roux et al., 1997; Roux et al., 1998). L'acétylcholine induit la contraction par le biais de récepteurs muscariniques à l'acétylcholine de type M3 présents à la membrane plasmique de ces cellules. On retrouve également sur cette dernière des récepteurs adrénergiques de type β2, fixant l'adrénaline et provoquant la relaxation des cellules musculaires lisses (Tan et al., 2014). Enfin, de nombreux médiateurs de l'inflammation

peuvent également réguler la contraction de ces cellules (Berger, Marthan, & Tunon de Lara, 2002; Roux et al., 1998).

L'induction de la contraction des cellules musculaires lisses, tout comme dans les cardiomyocytes, nécessite l'augmentation du niveau de calcium cytosolique bien que le mécanisme contractile soit différent. En effet, la présence importante d'ions $Ca^{2+}$ libres dans le cytosol conduit dans la cellule musculaire lisse respiratoire à la formation de complexes avec la protéine calmoduline (CaM). Le complexe $Ca^{2+}$/CaM ainsi formé vient activer la kinase de la chaine légère de myosine de 20kDa (MLC20) appelée MLCK. Cette kinase, en phosphorylant la MLC20 provoque son interaction avec l'actine, générant ainsi une contraction de la cellule. La relaxation quant à elle nécessite soit le retour à un niveau faible de $Ca^{2+}$ cytosolique en évacuant l'excédent de calcium par les divers canaux ioniques présents à la membrane plasmique et à la membrane du réticulum sarcoplasmique, soit par une inhibition directe de l'interaction actine-myosine. Pour cela, une phosphatase appelée MLCP intervient afin de déphosphoryler la MLC20, provoquant ainsi la fin de l'interaction actine-myosine et donc de la contraction (Figure 14) (Molimard et al., 1998; Somlyo & Somlyo, 1994).

Dans les cellules musculaires lisses, le couplage excitation-contraction mis en jeu est à deux composantes. Il existe dans ces cellules un couplage dit électromécanique, non majoritaire dans le phénomène de contraction, et un couplage pharmacomécanique prédominant.

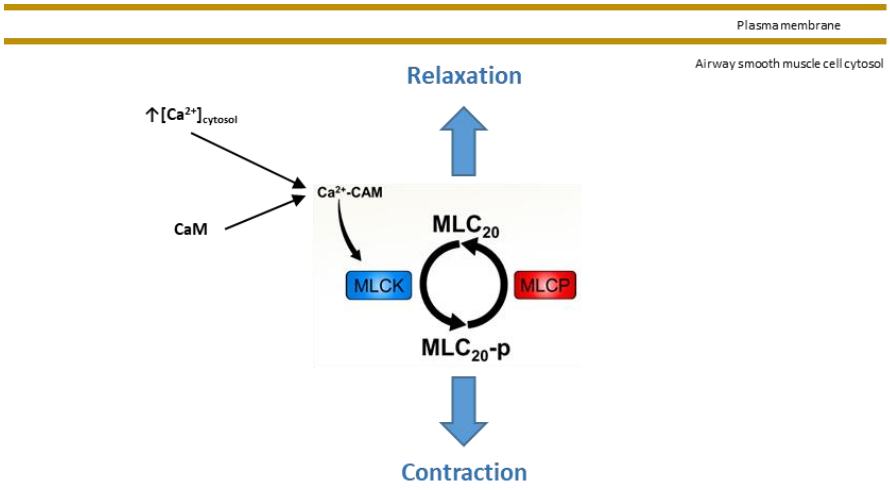


Figure 14. **Schéma illustrant le mécanisme de contraction de la cellule musculaire lisse respiratoire par augmentation du niveau de calcium cytosolique.**
Schéma adapté de Andréa-Grégoire et al., 2017.

### b. Le couplage électromécanique

Le couplage électromécanique repose sur les oscillations du potentiel de membrane de la cellule musculaire lisse au repos, entre -40mV et -70mV. Lorsque le potentiel de membrane augmente légèrement (dépolarisation), des canaux calciques voltage-dépendants s'activent et permettent le passage d'ions calcium à l'intérieur de la cellule provoquant une hausse du niveau de calcium cytosolique, avec ou sans déclenchement d'un potentiel d'action. Puis ces canaux calciques s'inactivent suite à l'hyperpolarisation de la membrane. Deux types de canaux ioniques interviennent dans la modulation du potentiel de membrane : des canaux chlore et potassiques, tous deux voltage-dépendants et également sensibles aux ions $Ca^{2+}$. L'ouverture des canaux chlore va conduire à une dépolarisation de la membrane et donc à l'excitabilité de la cellule, tandis que celle des canaux potassiques provoquent une hyperpolarisation aboutissant à une relaxation (Figure 15) (Somlyo & Somlyo, 1994).

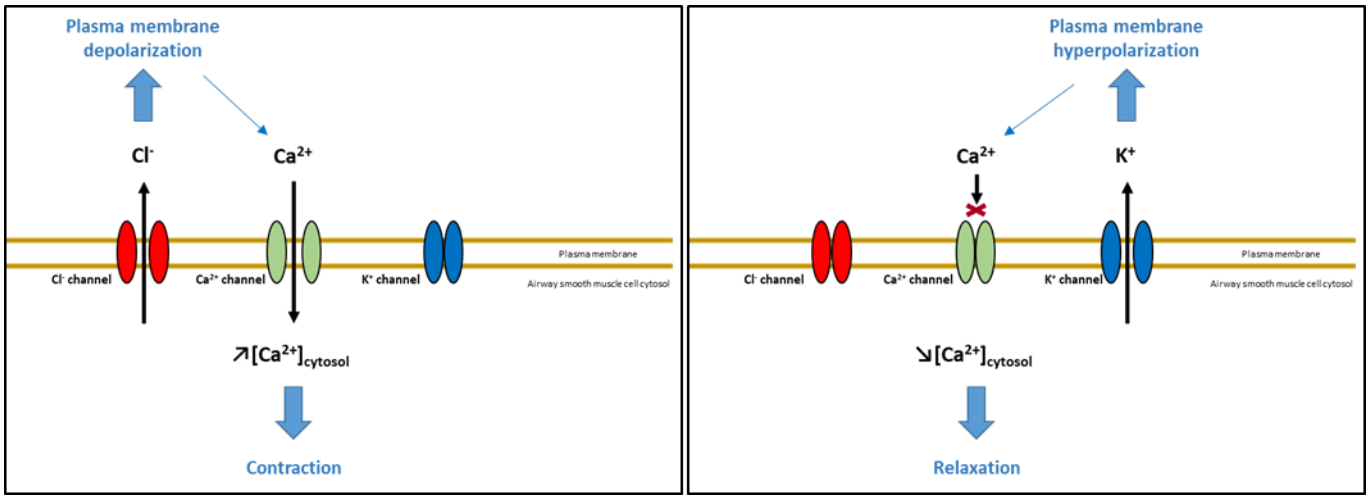


Figure 15. **Schéma illustrant les mécanismes électromécaniques conduisant à la contraction et à la relaxation de la cellule musculaire lisse respiratoire.**

### c. Le couplage pharmacomécanique

Le couplage pharmacomécanique quant à lui est médié par l'activation de récepteurs membranaires couplés à des petites protéines G. Le processus de contraction ou de relaxation induit par la fixation de divers agonistes sur ces récepteurs dépend du type de récepteur activé. Il y en a principalement trois types à la membrane plasmique de la cellule musculaire lisse respiratoire.

Le récepteur majoritairement impliqué dans la contraction est le récepteur muscarinique M3, activé par l'acétylcholine et couplé à la protéine Gq/11. Une fois activé, la

protéine Gq/11 recrute à son tour une phospholipase C β (PLCβ) qui va transformer le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate membranaire (PIP2) en inositol 1, 4, 5 trisphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). Ce couple de second messager va agir de deux façons. D'une part, l'IP3 généré va diffuser dans le cytosol jusqu'à venir se fixer sur le récepteur à l'IP3 (IP3R) exprimé à la membrane plasmique du réticulum sarcoplasmique (Figure 16) (Roux et al., 1998). Cette fixation conduit à la libération de $Ca^{2+}$ intra-réticulum dans le cytosol qui aura pour rôle de :

- Activer les récepteurs à la ryanodine RYR, présents à la membrane du réticulum sarcoplasmique et participants aussi à la libération du $Ca^{2+}$ du réticulum ;
- Activer les canaux chlore à la membrane plasmique, permettant la dépolarisation de cette membrane et l'activation des canaux calciques voltage-dépendants participant à l'entrée d'ions $Ca^{2+}$ du milieu extérieur vers le cytosol.

D'autre part, le DAG formé active une protéine kinase C, qui en phosphorylant diverses cibles va avoir pour rôle de :

- Inactiver la MLCP, inhibitrice de la myosine, pour favoriser l'interaction actine-myosine ;
- Inactiver les protéines calponine et caldesmone, inhibitrices de l'actine ;
- Activer aussi les canaux chlore à la membrane plasmique, favorisant ainsi l'augmentation de $Ca^{2+}$ cytosolique disponible.

Enfin, le récepteur M3 couplé à la protéine Gq/11 n'agit pas exclusivement par l'activation de la cascade PLCβ. Il active aussi une protéine RhoA, qui va à son tour activer une protéine Rho kinase (ROCK), qui aura elle aussi pour rôle d'inactiver la MLCP en la phosphorylant (Sakai et al., 2017). L'activation du récepteur muscarinique M3 a donc pour conséquence une initiation et un maintien de la contraction de la cellule musculaire lisse.

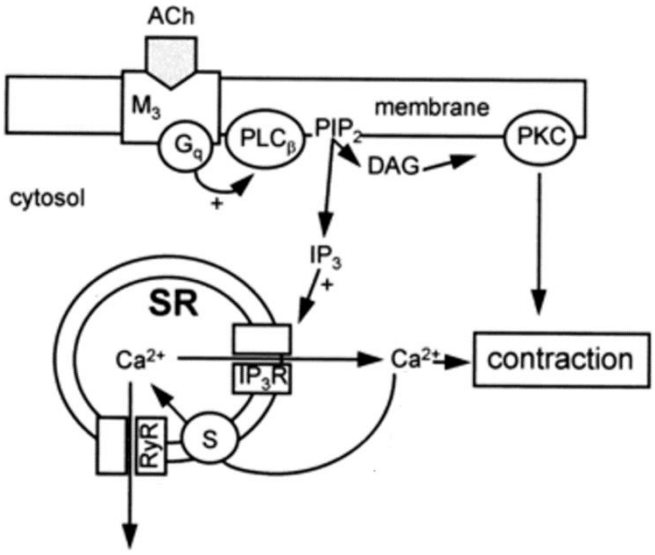


Figure 16. **Illustration du mécanisme pharmacomécanique de contraction de la cellule musculaire lisse respiratoire par l'activation du récepteur muscarinique $M_3$.**
Schéma issu de Roux et al., 1998.

Deux autres récepteurs couplés aux protéines G sont exprimés à la membrane plasmique de la cellule musculaire lisse. Ces deux récepteurs sont le récepteur muscarinique M2, activé aussi par l'acétylcholine, et le récepteur adrénergique β2 activé par l'adrénaline. Le récepteur M2 est couplé à une petite protéine Gi tandis que le récepteur β2 est couplé à une protéine Gs. Le récepteur β2 une fois activés par son ligand induit l'activation de l'adénylate cyclase (AC). L'AC activée va alors générer à partir de l'ATP intracytosolique un second messager appelé AMP cyclique (AMPc) qui va activer les protéines kinase A (PKA) et C (PKG). La PKG aura pour rôle essentiel d'inhiber la PKC activée lors de la contraction. La PKA quant à elle va préférentiellement agir en phosphorylant la MLCK pour induire son inactivation. L'activation du récepteur β2 conduit donc à la relaxation de la cellule tandis qu'à l'inverse l'activation du récepteur M2 conduit à l'inhibition de cette voie de l'AC, favorisant ainsi la contraction. (Roux et al., 1998; Savineau & Marthan, 1997) (Figure 17).

Pour conclure, les mécanismes de contraction et de relaxation de la cellule musculaire lisse sont aussi multiples que complexes, et à ce jour beaucoup restent encore à être complètement élucidés. De plus, il faut noter une connexion intéressante entre le couplage pharmacomécanique et les canaux ioniques exprimés à la membrane plasmique, qui participent activement à la réactivité bronchique tout en ayant des propriétés de voltage-dépendance. Cette réactivité bronchique est essentielle à la physiologie respiratoire, et toute

altération de ces diverses voies de signalisation conduit à des pathologies respiratoires très fréquentes.

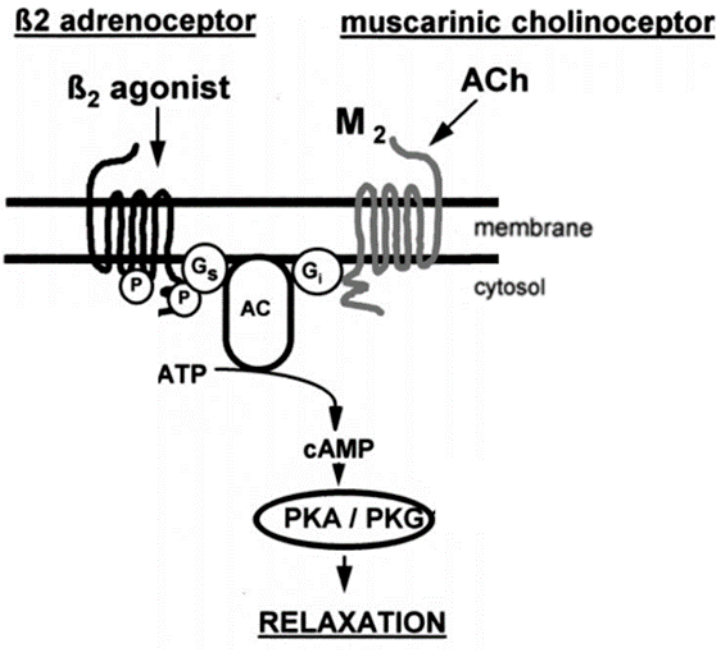


Figure 17. **Illustration du mécanisme pharmacomécanique de relaxation de la cellule musculaire lisse respiratoire par l'activation du récepteur muscarinique M2 et adrénergique β2.**
Schéma issu de Roux et al., 1998.

## B. Les pathologies de la respiration

Les deux principales pathologies de la respiration sont l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Ce sont des maladies très répandues dans le monde, qui sont en augmentation et ont un impact énorme sur la vie des patients (Barnes, 2017). Les deux maladies sont caractérisées par une inflammation chronique dans les poumons, mais la nature de l'inflammation diffère entre les maladies, ce qui explique le nombre élevé de phénotypes cliniques (Barnes, 2017).

### *1. L'asthme*

L'asthme est devenu la maladie chronique la plus répandue dans les pays développés et touche plus de 10% des adultes. De plus, bien qu'il existe maintenant des médicaments efficaces contre l'asthme, il reste mal contrôlé avec des symptômes qui se manifestent de manière fréquente et des exacerbations qui peuvent être particulièrement graves. La crise d'asthme est caractérisée par des difficultés à inspirer et surtout à expirer l'air contenu dans

les poumons. L'asthme est en fait dû à une sensibilité exagérée des bronches à plusieurs facteurs : exposition à un allergène, à la pollution, à la prise de certains médicaments ou aliments. (Asthme et Allergies association, 2017; Inserm, 2015a). Tous ces éléments témoignent en fait d'un rétrécissement des bronches associé à une hyperréactivité de ces dernières. Le rétrécissement des bronches, et donc l'augmentation de leur résistance à l'écoulement de l'air, est tout d'abord fonctionnel. En effet la composante principale de cette pathologie est la contraction excessive du muscle lisse des voies respiratoires, c'est pourquoi le traitement préférentiel pour lutter contre la crise d'asthme est l'inhalation d'agonistes-β2 adrénergiques. On note que la circulation sanguine est aussi impliquée puisqu'une congestion vasculaire peut également participer aux symptômes (Barnes, 2017). Mais la diminution du calibre des bronches est également morphologique, avec une muscularisation des bronches, une augmentation de la fibrose péri-bronchique et un encombrement de la lumière bronchique par une production excessive de mucus (Barnes, 2017; Fehrenbach, Wagner, & Wegmann, 2017; Rydell-Törmänen et al., 2013) (Figure 18).

## *2. La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)*

La BPCO est devenue une épidémie mondiale, qui augmente à mesure que les populations vieillissent et survivent aux causes de décès antérieures (Barnes, 2017). La BPCO est une maladie chronique inflammatoire, le plus souvent associée à d'autres maladies. Dans les pays développés, le principal facteur de risque de la BPCO est la consommation de tabac. Cette maladie se caractérise par un rétrécissement progressif et une obstruction permanente des voies aériennes et des poumons, entrainant une gêne respiratoire. Contrairement à l'asthme, l'inflammation pour la BPCO est principalement localisée dans les voies aériennes périphériques et le parenchyme pulmonaire, mais elle est également associée à une inflammation systémique. Contrairement à l'asthme, les principales causes d'obstruction des voies respiratoires sont le rétrécissement de ces dernières dû à la muscularisation des voies respiratoires et à la fibrose, puis à la déstructuration des voies respiratoires périphériques due à la perte d'élasticité du parenchyme pulmonaire qui sont irréversibles (Figure 18). L'hypersécrétion de mucus peut également contribuer à l'obstruction des voies respiratoires car le mucus occupe la lumière des voies aériennes et a tendance à être retenu en raison d'un dysfonctionnement ciliaire (Barnes, 2017; Inserm, 2015b). Mais il existe tout de même une forme d'hyperréactivité des petites voies respiratoires qui est réversible (Barnes, 2017).

De nombreuses cellules et médiateurs inflammatoires ont été impliqués l'asthme et la BPCO et plusieurs traitements actuels ciblent cette inflammation ou ses composants. Dans l'asthme, l'inflammation répond généralement à de faibles doses de corticostéroïdes en traitement de fond. Cependant, certains patients sont résistants ou relativement résistants aux effets anti-inflammatoires des corticostéroïdes. La plupart des patients atteints de BPCO sont en effet résistants aux corticostéroïdes. Des traitements alternatifs sont nécessaires pour le contrôle de l'asthme, et c'est pourquoi il est essentiel de comprendre l'ensemble des mécanismes qui entrent en jeu dans la régulation réactivité bronchique pour identifier éventuellement de nouvelles cibles pharmacologiques.

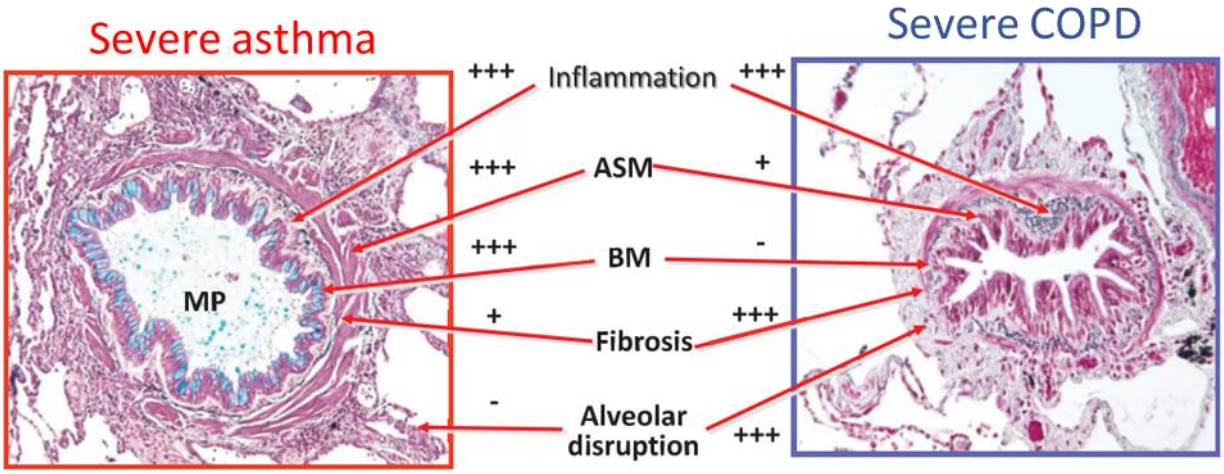


Figure 18. **Images d'histologie illustrant la comparaison entre les remodelages des voies respiratoires observées dans l'asthme et dans la BPCO.**
Schéma issu de Barnes et al., 2017. *ASM* : cellule musculaire lisse ; *BM* : membrane basale ; *COPD* : bronchopneumopathie chronique obstructive ; *MP* : bouchons de mucus.

## IV. Associations entre les pathologies respiratoires et les pathologies des troubles du rythme cardiaque.

Dès 1976, des observations cliniques ont conduit à suggérer un lien potentiel entre les pathologies respiratoires comme l'asthme et le développement de troubles du rythme cardiaque (Grossman, 1976). Par la suite des études ont démontré que l'utilisation de bronchodilatateurs β-agonistes à trop forte dose dans le traitement de l'asthme pouvait contribuer à la survenue d'événements potentiellement mortels tels que des arythmies cardiaques et l'arrêt cardiaque chez les patients souffrant parallèlement de pathologies cardiaques ou à risques cardiaques (Emerman, Crafford, & Vrobel, 1986; Suissa et al., 1996;

Tandon, 1980). Il a par exemple été observé chez des patients traités au fenoterol, un bronchodilatateur β2-mimétique, un élargissement de l'intervalle QT sur leurs enregistrements ECG (Newhouse et al., 1996). Puis de manière intéressante, Rosero et ses collaborateurs en 1999 ont mis en lien la pathologie de l'asthme, définie comme une pathologie respiratoire impliquant une hyperréactivité des voies respiratoires à composante génétique complexe, et le syndrome du QT long. Ils ont ainsi pu montrer que l'incidence de l'asthme chez les patients augmentait avec la durée de l'intervalle QT, confirmant que la comorbidité de l'asthme chez les patients souffrant du syndrome du QT long était associée à un risque accru d'événements cardiaques. Ils ont cependant montré que l'utilisation de traitements β-bloquants chez ces patients diminuait le risque de voir apparaitre ces évènements cardiaques, suggérant ainsi un rôle possible de la modulation des récepteurs β adrénergiques dans cette l'association asthme/syndrome du QT long (Rosero et al., 1999; Thottathil et al., 2008). Il a tout de même été montré que sans présenter de risques cardiaques majeurs, les patients asthmatiques en général manifestaient plus d'évènements arythmiques tels que tachycardie et contractions ventriculaires prématurées que les patients non asthmatiques, tout en confirmant que l'utilisation de traitements β-agonistes accentuait ce risque (Warnier et al., 2012). Il a plus tard aussi été démontré que les patients souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive, pathologie conduisant aussi à une réduction des volumes respiratoires, avaient deux à trois fois plus de risque d'arythmies et de mort subite cardiaque (Sievi et al., 2014; Terzano et al., 2014). Il a été proposé pour ces patients à risque d'administrer les bronchodilatateurs β-agonistes avec précautions concernant les doses et sous monitoring ECG. L'autre possibilité est d'utiliser un autre type de traitement bronchodilatateur comme le bromure d'ipratropium, qui est un anticholinergique mais qui n'a pas la même rapidité d'action en cas de crise d'asthme exacerbé (Collins et al., 2012). Cependant il a aussi été montré dans une cohorte de patients asthmatiques que l'utilisation de ce bronchodilatateur anticholinergique augmentait le risque d'arythmies (Adimadhyam et al., 2014). De plus Sievi et son équipe ont étudié une population de patients souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive, tous traités avec des anticholinergiques. Ils ont décrit qu'un tiers d'entre eux présentaient une repolarisation cardiaque altérée, les exposant à un risque accru d'arythmies ventriculaires et de mort subite (Sievi et al., 2014).

# V. Objectifs du travail de thèse

L'ensemble de ces éléments de littérature démontre une réelle association entre les pathologies respiratoires, provoquant une contraction inadaptée des voies respiratoires, et les troubles arythmiques cardiaques. Mais à ce jour, cette connexion fonctionnelle reste inexpliquée et tous les mécanismes sous-jacents restent à être déterminés. Le cœur et les poumons sont des organes particulièrement connectés, physiquement comme fonctionnellement. Mais les poumons sont des organes complexes de par leur rôle d'interface entre l'intérieur de l'organisme et le milieu extérieur, tout en faisant intervenir de nombreux types cellulaires. L'implication indéniable de $Na_v1.5$ dans les troubles du rythme cardiaque, son expression dans de multiples types cellulaires et ses mécanismes fonctionnels associés encore inconnus nous ont conduit à émettre l'hypothèse de son implication dans cette association inter-organes. C'est pourquoi l'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier l'expression de $Na_v1.5$ dans les poumons, puis d'étudier son éventuel rôle dans la respiration afin de comprendre son implication potentielle dans la connexion fonctionnelle entre les poumons et le cœur.

# MATERIELS ET METHODES

## I. Matériels biologiques

### A. Souris

Les expérimentations animales décrites dans ce manuscrit ont été réalisées à l'Unité Thérapeutique Expérimentale (UTE), structure agréée par le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation et située à l'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes (IRS-UN). Toutes nos procédures expérimentales sur les animaux sont approuvées par des saisines validées par le Ministère de l'Enseignement supérieur de la Recherche et de l'Innovation ainsi que par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale (CEEA) des Pays de la Loire.

L'élevage initial de souris transgéniques qui nous a été fourni, présentant une invalidation hétérozygote du gène *Scn5a* (*Scn5a*$^{+/-}$), a été généré à l'Université de Cambridge (England) sur le fond génétique 129/Sv. Les souris 129/Sv *Scn5a*$^{+/-}$ ont ensuite été dérivées sur le fond génétique C57BL/6J et élevées à l'UTE de l'IRS-UN. Un bout de queue a été prélevé à l'âge de trois semaines afin de réaliser les génotypages par Polymerase Chain Reaction (PCR) selon le procotole précédemment décrit par Papadatos et ses collaboarteurs en 2002 (Papadatos et al., 2002). Tous les animaux ont été hébergés dans des salles à température contrôlée (22°C) avec des cycles jour/nuit de 12 heures, l'eau et l'alimentation étant fournies *ad libitum*.

Une attention particulière a été portée sur l'état des animaux utilisés au cours de ces travaux. Chaque anomalie observée sur une souris a conduit à son exclusion de l'étude. Les souris ayant fait l'objet de la première partie de mes résultats de thèse, notamment ceux publiés dans l'article « New role of the "cardiac" sodium channel $Na_v1.5$ in lungs: localization and functional involvements in mouse » étaient exclusivement des souris femelles âgées de 14 à 16 semaines. Les résultats de l'étude comparative entre mâles et femelles ont été obtenus avec des souris mâles du même âge.

## B. Modèle d'asthme allergique par exposition aux acariens

Des souris femelles âgées de 9 semaines ont été sensibilisées par exposition cutanée auriculaire à quatre reprises séparées d'une semaine d'intervalle, avec des extraits allergéniques standardisés sous forme de poudre d'acariens domestiques (Code : 200 000 319 – Stallergenes ; solubilisés dans du DMSO 70%). Sept jours après la dernière sensibilisation, les souris ont été exposées aux poudres d'acariens en subissant une provocation nasale par inhalation des poudres d'acariens diluées dans du PBS, à deux reprises séparées d'une semaine d'intervalle. Les conditions contrôles ont été mise en place par la sensibilisation des souris par le seul DMSO 70%, puis par la provocation nasale par l'inhalation du PBS seul. Les souris, alors âgées de 14 semaines, ont été analysées 24h après la dernière provocation nasale. Le protocole de mise en place de ce modèle d'asthme allergique est résumé dans la Figure 19.

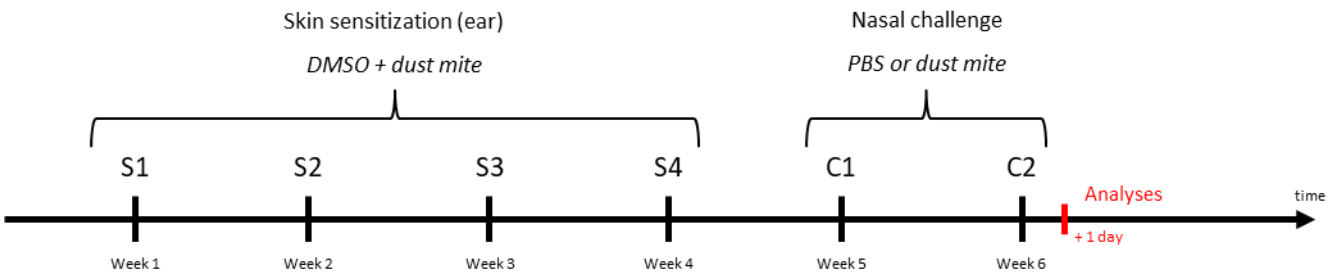


Figure 19. **Chronologie du protocole de la mise en place du modèle d'asthme allergique HDM chez les souris.**
Le protocole démarre à l'étape S1 sur des souris femelles âgées de 9 semaines. L'analyse fonctionnelle est réalisée le lendemain de la dernière provocation nasale C2 sur des souris femelles âgées de 14 semaines. (C : challenge; HDM : Host Dust Mite; S : sensitization).

## C. Prélèvements pour préparations d'organes

Après euthanasie par élongation cervicale, le thorax a été ouvert afin de prélever rapidement le cœur et les poumons droit et gauche. Les prélèvements de cœur ont été disséqués pour séparer les oreillettes, le ventricule droit, et le ventricule gauche avec le septum. Puis les échantillons de cœur et les poumons droits, destinés aux analyses par PCR et Western Blot, ont été immédiatement congelés en azote liquide afin de préserver au mieux les ARNm et les protéines. Les prélèvements de poumons gauche, destinés aux colorations histologiques et à l'immunohistochimie, ont quant à eux été immédiatement plongés dans

15mL d'une solution de formaline 10% (Sigma-Aldrich) puis laissés incubés pendant minimum 72h à 4°C afin de fixer les structures.

### D. Préparations de cellules

Des prélèvements de trachées et bronches principales droite et gauche ont été réalisés pour isoler les cellules musculaires lisses de voies aériennes. Après euthanasie par élongation cervicale, le thorax a été ouvert afin de prélever rapidement le bloc trachée/poumons. Les vaisseaux, l'innervation et le tissu conjonctif de ce bloc ont été enlevés manuellement. Puis la trachée et les bronches principales droite et gauche ont été coupées en anneaux fins puis digérés pendant 2h à 37°C sous agitation par 1mg/mL de collagénase de type II (Worthington Biochemical). Les cellules ainsi dissociées ont ensuite été mises à proliférer dans un milieu DMEM (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal, 100 unités/mL de pénicilline et 100mg/mL de streptomycine, le tout dans un incubateur à 37°C et à 5% de $CO_2$. Les cultures primaires P0 ont fait l'objet d'un seul repiquage, et les cultures secondaires P1 obtenues ont été utilisées pour des analyses de PCR, de Western Blot et d'immunocytochimie.

Des prélèvements de rate ont été effectués pour réaliser les préparations de cellules nécessaires à l'étude des lymphocytes T. Après euthanasie par élongation cervicale, l'abdomen a été ouvert afin de prélever rapidement la rate. Ces prélèvements ont été plongés dans un milieu RPMI (Gibco) puis broyés avec un Potter de Tenbroeck. Les cellules des prélèvements de rate ont ensuite été filtrées à l'aide d'un tamis cellulaire de 40µm de porosité, puis les globules rouges ont été éliminés par un tampon de lyse RBC au 1X (eBioscience). Une fois cette lyse effectuée, les cellules ont été re-suspendues dans un tampon PBS contenant 5% de SVF et 1% EDTA, en vue d'être analysées par cytométrie de flux et immunocytochimie.

## II. Techniques de biologie moléculaire et de biochimie

### A. RT-PCR

Les ARN totaux des échantillons biologiques ont été extraits à froid selon la méthode du Trizol (Invitrogen) (Chomczynski, 1987) associée à une lyse mécanique au polytron pour les échantillons de tissus. La qualité et la quantité des ARNs totaux ont été évaluées

respectivement par un dépôt sur gel d'agarose contenant du bromure d'Ethydium et par mesure de spectrophotométrie au Nanodrop (ThermoScientific). Après un traitement à la DNAse I (Roche) et une purification par précipitation alcoolique, 1µg des ARN totaux traités a été reverse transcrit pour constituer des ADNs complémentaires (ADNc) pour chaque extrait à l'aide d'un kit d'hexamères nucléotidiques aléatoires (Random primers, Invitrogen) et d'une réverse transcriptase (MMLV, Invitrogen). Ces ADNc synthétisés ont servi de matrice aux amplifications. Les PCR ont été réalisées avec une Taq DNA Polymerase (Invitrogen) dans un thermocycleur PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Les résultats obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'Ethydium ont été enregistrés avec le ChemiDoc MP imager (BioRad) et analysés avec le logiciel Image Lab 5.2.1 (Biorad). Chaque couple d'amorces utilisé a été préalablement vérifié *in silico* par PrimerBlast (NCBI), puis validé *in vitro* par la réalisation d'une rampe d'efficacité d'amplification à l'aide de dilutions en cascade de banques d'ADNc exprimant les ARN messagers cibles. Les séquences d'amorces utilisées sont les suivantes : *Scn5a* amorce sens: 5'- GAAGAAGCTGGGCTCCAAGA-3'; *Scn5a* amorce antisens: 5'- CATCGAAGGCCTGCTTGGTC-3' (produit d'amplification *Scn5a*: 101pb) et Gapdh amorce sens: 5'-ACTGGCGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCT-3'; Gapdh amorce antisens: 5'-CTCCTTGGAGGCCATGTAGGCCATGAGGTC-3' (produit d'amplification Gapdh: 711pb). Les conditions de thermocycleur suivantes ont été utilisées : pour *Scn5a* 95°C-5 min, 40 cycles (95°C-15 sec, 60°C-1 min), 4°C-conservation; pour Gapdh 96°C-3 min, 30 cycles (94°C-45 sec, 65°C-30 sec, 68°C-2 min), 68°C-2 min, 4°C-conservation.

Concernant la réalisation des qPCR avec la technologie RT² Profiler Array de Qiagen, les préparations ont été effectuées différemment. Les ARN totaux des échantillons ont été isolés avec le kit RNeasy Plus Universal Midi (Qiagen) et traités avec le gDNA Eliminator (Qiagen). 400ng d'ARNs totaux traités ont été reverse transcrits avec le kit RT² First Strand (Qiagen). La référence de plaque de qPCR utilisée a été la suivante : PAMM-121ZD-12- RT² Profiler PCR Array Mouse Wound Healing (Qiagen). Les voies de signalisation et les gènes analysés sur cette plaque sont résumés dans la Table 2. A partir des ADNC synthétisés, le RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen) a été utilisé pour réaliser les qPCR dans un thermocycleur ABI 7900 HT (Applied Biosystems). Les signaux fluorescents émis au cours des amplifications des gènes d'intérêt ont été normalisés sur la moyenne des signaux émis par les amplifications de cinq gènes de ménage à expression ubiquitaire appelés « housekeeping

genes » (HKG) : β Actine (Actb); β2 Microglobuline (B2m); Glycéraldehyde 3-phosphate déshydrogénase (Gapdh); β Glucuronidase (Gusb) et Heat Shock Protein 90α B1 (Hsp90ab1). Pour la quantification relative des différents niveaux d'expression des ARNm chez les souris WT et *Scn5a*$^{+/-}$, les cycles seuil (Ct) enregistrés ont été analysés par la méthode comparative ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{gène} - Ct_{HKG}$) et le « fold change ».

| Extracellular Matrix Structural Constituents | Extracellular Matrix Remodeling Enzymes | Cell Adhesion Molecules | Cytoskeleton Regulators | Inflammatory Cytokines & Chemokines | Growth Factors | Signal Transduction |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Col14a1 | Ctsg | Cdh1 | Acta2 | Ccl12 | Angpt1 | Ctnnb1 |
| Col1a1 | Ctsk | Itga1 | Actc1 | Ccl7 | Csf2 | Egfr |
| Col1a2 | Ctsl | Itga2 | Rac1 | Cd40lg | Csf3 | Il6st |
| Col3a1 | F13a1 | Itga3 | Rhoa | Cxcl1 | Ctgf | Mapk1 |
| Col4a1 | F3 | Itga4 | Tagln | Cxcl11 | Egf | Mapk3 |
| Col4a3 | Fga | Itga5 | | Cxcl3 | Fgf10 | Pten |
| Col5a1 | Mmp1a | Itga6 | | Cxcl5 | Fgf2 | Ptgs2 |
| Col5a2 | Mmp2 | Itgav | | Ifng | Fgf7 | Stat3 |
| Col5a3 | Mmp7 | Itgb1 | | Il10 | Hbegf | Tgfb1 |
| Vtn | Mmp9 | Itgb3 | | Il1b | Hgf | Tgfbr3 |
| | Plat | Itgb5 | | Il2 | Igf1 | Wisp1 |
| | Plau | Itgb6 | | Il4 | Mif | Wnt5a |
| | Plaur | | | Il6 | Pdgfa | |
| | Plg | | | | Tgfa | |
| | Serpine1 | | | | Tnf | |
| | Timp1 | | | | Vegfa | |

Table 2. **Gènes étudiés sur les plaques de qPCR Qiagen Mouse Woung Healing RT² Profiler Array PAMM-121Z.**

## B. Western Blot

Les protéines ont été extraites des échantillons biologiques à froid par une lyse mécanique de l'échantillon dans le broyeur TissueLyser II (Quiagen) complétée par une lyse chimique dans un tampon contenant : 100mM NaCl; 50mM Tris-HCl; 1mM EGTA; 1% Triton X-100; 1mM Na3VO4; 50mM NaF; 1mM fluorure de phénylméthylsulfonyle (Roche Applied Science) et un mélange d'inhibiteurs de protéases (1:100; Sigma-Aldrich) (pH 7,4). Pour déterminer la concentration des homogénats de protéines obtenus, une courbe d'étalonnage a été réalisée sur la base de dilutions d'une protéine de référence, l'Albumine de Sérum Bovin (BSA). Le kit BCA Protein Assay (Pierce) a permis de réaliser un dosage colorimétrique de cette gamme. Dans ce kit la coloration est induite par l'acide bicinchoninique, un réactif colorigène qui forme un précipité pourpre (mesurable par spectophotométrie) lorsqu'il fixe

spécifiquement les ions cuivre $Cu^{1+}$ issus de la réduction du $Cu^{2+}$ par les protéines en milieu alcalin. Les résultats du dosage ont été lus au spectrophotomètre Victor™X3 (PerkinElmer).

Ensuite, 40µg des extractions protéiques ont été dilués dans 1µL de NuPAGE Sample Reducing Agent 10X (Invitrogen), 2.5µl de NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen) puis ont subi une dénaturation thermique à 99°C pendant 5 min. Puis les extraits ont été chargés dans un gel d'acrylamide dénaturant pré-coulé Mini-PROTEAN® TGX Stain-free (Biorad) contenant du Sodium Docecyl Sulfate (SDS). Les migrations qui ont été effectuées dans un tampon de migration TGS 1X (Tris – Glycine – SDS), sous un voltage de 80V. Une fois la migration terminée, la qualité de la migration a été contrôlée grâce à la technologie « Stain free » contenue dans les gels pré-coulés. Ils contiennent un composé tri-halogéné, qui une fois activé par une exposition aux ultra-violets va se lier de façon covalente aux résidus tryptophanes des protéines contenues dans le gel, induisant une émission de fluorescence proportionnelle à la quantité de protéines. L'exposition aux UV et l'acquisition des images ont été réalisées avec le ChemiDoc MP System (Biorad). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose par un « Trans-Blot Turbo System » (Biorad). La qualité du transfert est contrôlée encore une fois par la technologie « Stain-free ». Les membranes ont été bloquées avec du lait à 5% puis incubées avec des anticorps primaires dirigés contre les protéines cibles. Les anticorps primaires ont été les suivants : anticorps de lapin anti- $Na_v1.5$ (14421 - Cell Signaling Technology) ; anticorps de souris anti-Rac1 (610650 – BD Biosciences) ; anticorps de souris anti-LOX (sc-373995 – Santa Cruz Biotechnology) ; anticorps de souris anti-β-actine (A5316 – Sigma) ; anticorps de chèvre anti-CTGF (sc-14393 - Santa Cruz Biotechnology) ; anticorps de lapin anti-TGFβ (3711 - Cell Signaling Technology) et anticorps de souris anti-MMP2 (sc-13595 - Santa Cruz Biotechnology). Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires appropriés, tous couplés à une enzyme « Horseradish Peroxydase » : anticorps de chèvre anti-IgG de lapin (sc-2054 – Santa Cruz Biotechnology) ; anticorps de chèvre anti-IgG de souris (sc-2055 - Santa Cruz Biotechnology) et anticorps de lapin anti-IgG de chèvre (sc-2922 - Santa Cruz Biotechnology). La détection des protéines marquées sur la membrane a été effectuée par apport du substrat à la peroxydase avec le kit « Clarity Western ECL Substrate » (Biorad). La révélation des protéines a été lue par le « ChemiDoc MP System » (Biorad), et quantifiée avec le logiciel Image Lab Software (Biorad). La quantification relative

des protéines cibles a été effectuée par normalisation avec le signal du « Stain free » à la membrane, ou avec le signal émis pour la protéine ubiquitaire β-actine.

## C. Colorations histologiques

Les échantillons fixés de poumons gauches de souris ont été déshydratés par des solutions d'alcool à degrés croissants dans un automate d'inclusion STP120 (Microm Microtech) puis enrobés en paraffine. Des coupes de poumons de 7µm d'épaisseur ont été collectées sur des lames à l'aide d'un microtome Microm HM355S (ThermoScientific). Les préparations sur lames ont ensuite été déparaffinées puis réhydratées en passant respectivement dans du Tissu-Clear (Sakura Finetek), des bains d'éthanol à des degrés décroissants (100°; 95°; 80°) et dans de l'eau milliQ. Les coupes réhydratées ont été colorées soit avec de l'hématoxyline pendant 20 sec puis avec de l'éosine pendant 10 sec, soit avec du rouge Picrosirius pendant 1h. Toutes ces lames colorées ont ensuite été rincées dans de l'eau milliQ, puis déshydratées dans des bains d'alcool à degrés croissants (80° ; 95° ; 100°) et dans du Tissu-Clear. Enfin, le montage entre lame et lamelles des coupes de poumons a été effectué avec une résine « DPX Mountant for Histology » (Sigma-Aldrich). Les images de ces coupes de poumons colorées ont été obtenues avec un microscope optique classique Nikon Eclipse E-600 couplé au logiciel NIS-Elements BR v4.10 (Nikon), et analysées avec le logiciel ImageJ (NIH Software). Les analyses des colorations à l'hématoxyline et éosine ont permis de mettre en évidence la présence de cellules immunitaires dans le tissu pulmonaire, tandis que les colorations au rouge Picrosirius ont montré les collagènes : toutes les isoformes en lumière blanche, et les isoformes de collagènes I et III en lumière polarisée.

## D. Immunofluorescences

Les échantillons fixés de poumons gauches de souris ont été enrobés en OCT (Sakura Finetek) puis rapidement congelés en azote liquide avant d'être sectionnés en coupes de 5µm d'épaisseur avec un cryostat CM1950 (Leica) puis disposées sur lames. Les cultures P1 de cellules musculaires lisses de voies aériennes ont proliféré sur des lamelles en verre placées au fond des boîtes de culture. Selon les anticorps utilisés, les antigènes ont été démasqués sur les échantillons. Pour les coupes de poumons, le démasquage a été réalisé par incubation dans un tampon citrate contenant 10mM de citrate de sodium et 0,05% de Tween20 (pH 6) à 99°C pendant 30min. Pour les cellules le démasquage a été obtenu par une incubation brève des

cellules dans une solution contenant 1% de sodium dodecyl sulfate (SDS) (pH 7,4). Les échantillons ont été perméabilisés avec du Triton X-100 puis bloqués avec de la BSA (Sigma-Aldrich). Les anticorps primaires incubés ensuite ont été les suivants : anticorps de lapin anti-$Na_v1.5$ (14421 - Cell Signaling Technology), anticorps de lapin anti-SM22α (ab14106 – Abcam), anticorps de lapin anti-MHC3 (sc20641 - Santa Cruz Biotechnology), anticorps de lapin anti-TnI (sc15368 - Santa Cruz Biotechnology) et anticorps de lapin anti-Cx43 (C 6219 - Sigma-Aldrich). Puis les échantillons ont été incubés avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin Alexa Fluor 647 (A21245 – Invitrogen). Les noyaux ont été colorés avec du Hoechst (Sigma-Aldrich). Enfin, toutes les préparations ont été montées entre lames et lamelles avec du milieu de montage « ProLong Gold Antifade Mountant » (Life Technologies). Les images ont été obtenues avec un microscope confocal Nikon A1 RSi (Nikon) et analysées avec le logiciel ImageJ (NIH Software).

Les marquages imunofluorescents obtenus sur les lymphocytes T issus de préparations de rate de souris ont été réalisés au cours du protocole de cytométrie en flux (cf. paragraphe suivant). Une partie des cellules issues de ce protocole a été re-suspendue dans le milieu de montage « ProLong Gold Antifade Mountant » (Life Technologies), puis montées entre lames et lamelles. Les images ont aussi été obtenues avec un microscope confocal Nikon A1 RSi (Nikon) et analysées avec le logiciel ImageJ (NIH Software).

## E. Cytométrie en flux

Les cellules préparées à partir de prélèvement de rate ont été incubées dans un premier temps avec des anticorps primaires couplés à des fluorochromes dans le but d'identifier les lymphocytes T $CD3^+$ et $CD4^+$. Ces anticorps sont les suivants : anticorps de hamster anti-CD3 couplés FITC (11-0031-85 - eBioscience) et anticorps de rat anti-CD4 couplés BV421 (100 438 – BioLegend). Puis les cellules ont été traitées avec une solution de fixation et de perméabilisation (00-5123-43 – eBioscience) avant d'être incubées avec un anticorps primaire de lapin anti-$Na_v1.5$ (14421- Cell Signaling Technology). Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin Alexa Fluor 647 (A21245 – Invitrogen). Une fois les marquages terminés, une partie des cellules a été analysée par cytométrie en flux avec un Fortessa X20 (BD Biosciences) couplé à un logiciel d'analyse BD

FACSDiva (Biosciences), tandis que l'autre partie des cellules a été observée au microscope (cf. paragraphe précédent).

# III. Procédures d'investigations fonctionnelles *ex vivo* et *in vivo*

## A. Contractilité *ex vivo* de trachées isolées

Après euthanasie par élongation cervicale, le thorax a été ouvert afin de prélever rapidement le bloc trachée/poumons. Les vaisseaux, l'innervation et le tissu conjonctif de ce bloc ont été enlevés manuellement. Puis la trachée a été séparée des bronches et des poumons pour être montée entre deux broches métalliques en forme de L dont l'une était reliée à un transducteur de déplacement et à un micromètre. La trachée ainsi fixée est immergée dans une cuve à organe isolé contenant une solution de Krebs-Henseleit (118mM NaCl; 4.7mM KCl; 1,2mM $KH_2PO_4$; 1,2mM $MgSO_4$; 11mM glucose; 25mM $NaHCO_3$ and 2mM $CaCl_2$) à 37°C (pH 7,4). L'entrée d'air est ajustée dans chaque cuve pour obtenir un flux léger d'$O_2$/$CO_2$ et le micromètre est délicatement ajusté pour obtenir une tension passive de 300mg. Puis la trachée est laissée à s'équilibrer pendant minimum 30min avant les stimulations expérimentales. Suite à cette équilibration, la trachée est provoquée à deux reprises avec une solution à haute teneur en potassium concentrée à 90mM de KCl, servant de stimulation contrôle. Les contractions trachéales provoquées par stimulation cholinergique sont ensuite enregistrées en réponse à plusieurs ajouts de méthacholine (Sigma-Aldrich) de manière cumulative de $10^{-8}$ à $10^{-4}$M de méthacholine, avant puis suite à des incubations de 15min d'ajmaline (0,2mM et 0,8mM) ou de kétamine (1mM and 2mM). Les valeurs de contractions mesurées après les différentes stimulations ont été enregistrées avec le logiciel LabChart (AdInstruments) puis exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs contrôles enregistrées par stimulations au KCl 90mM.

## B. Pléthysmographie corporelle totale barométrique

La réactivité des voies respiratoires a été mesurée chez des souris vigiles et non contraintes en utilisant une chambre de pléthysmographie corporelle totale barométrique (EMKA) (Figure 20A). Après 5min d'habituation dans les chambres, les courbes de pression respiratoire des souris ont été enregistrées en réponse à des inhalations de 1 min de doses

croissantes de méthacholine (Sigma-Aldrich) à des concentrations de 0, 5, 10, 20 puis 40 mg/ml diluées dans du NaCl 0,9%. Après leur amplification, les signaux ont été enregistrés et analysés à l'aide du logiciel Iox 2.4 (Emka Technologies). Les variations des volumes expiratoire et inspiratoire interprétées à partir des variations de pression dans la chambre ont permis de calculer un index fonctionnel appelé la Penh, qui reflète la fonction respiratoire : Penh = (Te / Tr - 1) x PEF / PIF (où Te est le temps d'expiration, Tr est le temps de relaxation, PEF est le débit expiratoire maximal et PIF est le débit inspiratoire maximal). Les moyennes des valeurs de Penh mesurées après chaque stimulation à la méthacholine ont été calculées puis les résultats ont été rapportés à la Penh de base de chaque animal: Penh/Penh(0) pour chaque dose de méthacholine (Figure 20B).

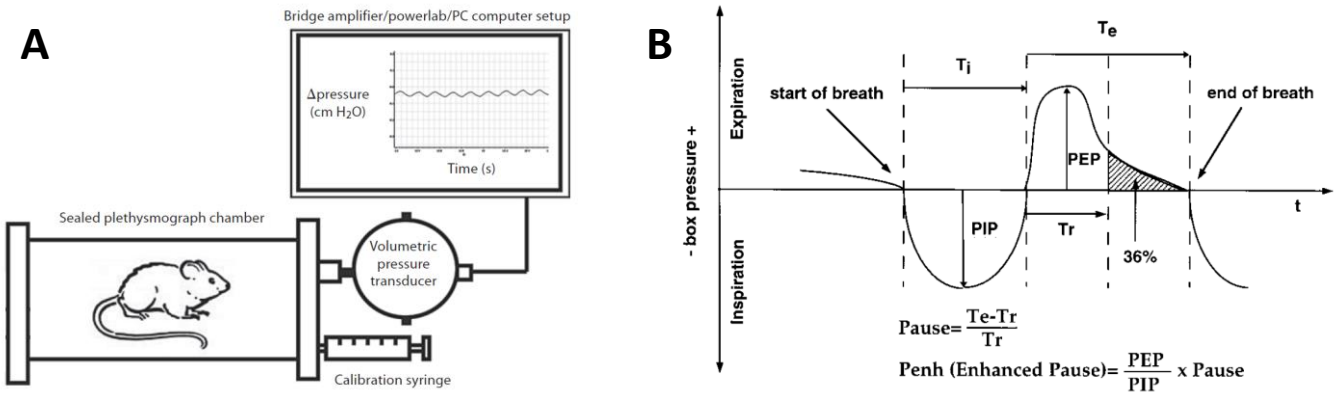


Figure 20. **Pléthysmographie corporelle totale barométrique chez la souris *in vivo*.**
Ce protocole est réalisé sur des souris âgées de 14 semaines. (A) Schéma illustrant l'appareillage de pléthysmographe barométrique utilisé pour mesurer la réactivité pulmonaire *in vivo*. Schéma modifié d'après Milton et al., 2011 (B) Représentation schématique d'un cycle respiratoire observé par variations de pression, et des différents paramètres mesurés sur un cycle pour obtenir la valeur de Penh. Schéma de Hamelmann et al., 1997. (PEP : Peak Expiratory Pressure, pression positive maximale enregistrée dans la chambre pendant une respiration ; PIP : Peak Inspiratory Pressure, pression négative maximale enregistrée dans la chambre pendant une respiration; Te : expiratory Time; Ti : inspiratory Time; Tr : relaxation Time, durée de la diminution de la pression jusqu'à 36% de la pression totale de la boîte pendant l'expiration).

## C. Technique des oscillations respiratoires forcées

La résistance dynamique des voies respiratoires a été mesurée en utilisant la technique des oscillations respiratoires forcées. Les souris ont été anesthésiées (kétamine 80mg/kg + xylazine 16mg/kg, ip), paralysées (3mg/kg de bromure de rocuronium, ip), trachéotomisées puis immédiatement reliées à un système de ventilation contrôlé par ordinateur Flexivent (SCIREQ), à une fréquence respiratoire imposée mécaniquement de 150

respirations/min (Figure 21A). Toute la procédure est exécutée à température corporelle contrôlée par une lampe chauffante. Des provocations par inhalation de doses croissantes de méthacholine à des concentrations de 0, 10, 15, 20 et 40 mg/ml ont été réalisées *via* un nébuliseur Aeroneb (Aerogen). Les contrôles des volumes et des flux inspiratoires, imposés par la ventilation mécanique, associés à la fréquence respiratoire unique ont permis d'enregistrer la valeur de résistance (Rrs) du système respiratoire à chaque dose de méthacholine inhalée pour chaque souris. Après chaque stimulation, les résultats ont été exprimés par la valeur moyenne des Rrs calculée par dose de méthacholine (Figure 21B et Figure 21C).

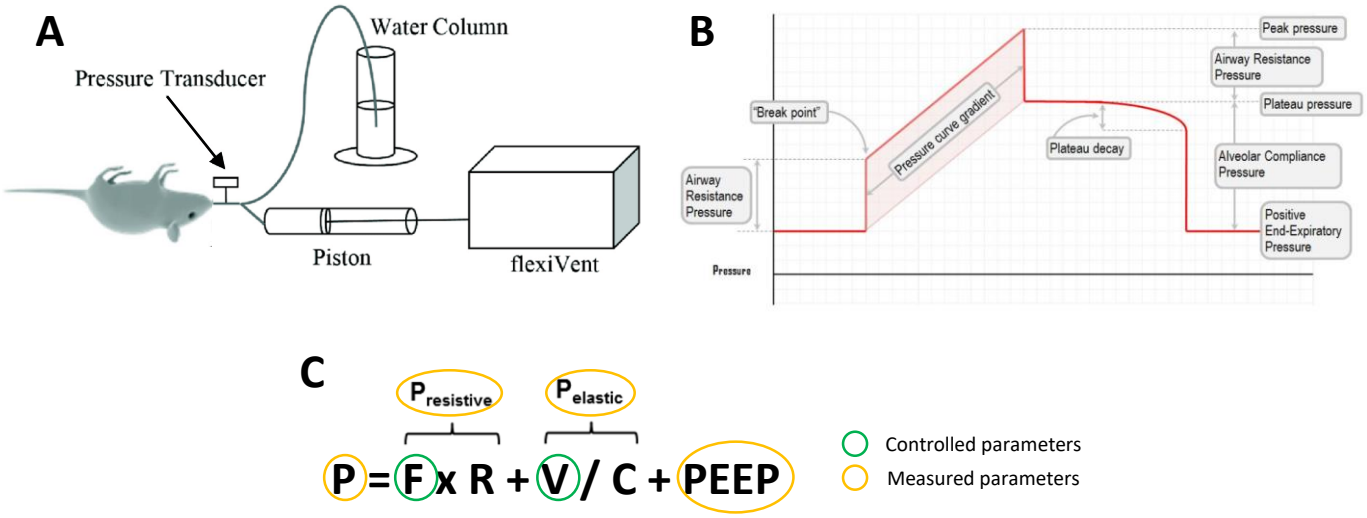


Figure 21. **Technique des oscillations forcées flexiVent à une fréquence respiratoire imposée chez la souris *in vivo*.**
Ce protocole est réalisé sur des souris anesthésiées âgées de 14 semaines. (A) Schéma illustrant l'appareillage de flexiVent utilisé pour mesurer la résistance des voies respiratoires *in vivo*. Schéma modifié d'après Mori et al., 2017 (B) Représentation schématique d'un cycle de respiration artificielle observé par variations de pression, Schéma de Tobins et al., 1994. (C) Paramètres considérés sur un cycle respiratoire pour obtenir les valeurs de résistance et de compliance des voies aériennes, d'après l'équation du mouvements des gaz inspirés. (C : alveolar Compliance; F : inspiratory Flow; P : peak Pressure ; PEEP : Positive End-Expiratory Pressure; Pelastic : alveolar compliance Pressure; Presistive : airway resistance Presure; R : airway Resistance; V : Volume).

## D. Electrocardiographie

Pour réaliser l'enregistrement de l'électrocardiographie (ECG), les souris ont été anesthésiées par injection d'étomidate (25mg/kg, ip). La température corporelle a été maintenue à 37°C à l'aide d'un tapis chauffant (Harvard Apparatus). L'ECG sur 6 dérivations a été enregistré par des électrodes sous-cutanées 25G, sur un ordinateur associé à un

convertisseur analogique-numérique IOX 1.585 (Emka Technologies) pour la surveillance au cours de l'acquisition (Figure 22A). La mesure des intervalles a été réalisée ultérieurement avec le logiciel ECG Auto v3.2.0.2 5emka Technologies). Seule la dérivation DI a été prise en compte dans ces travaux (Figure 22B).

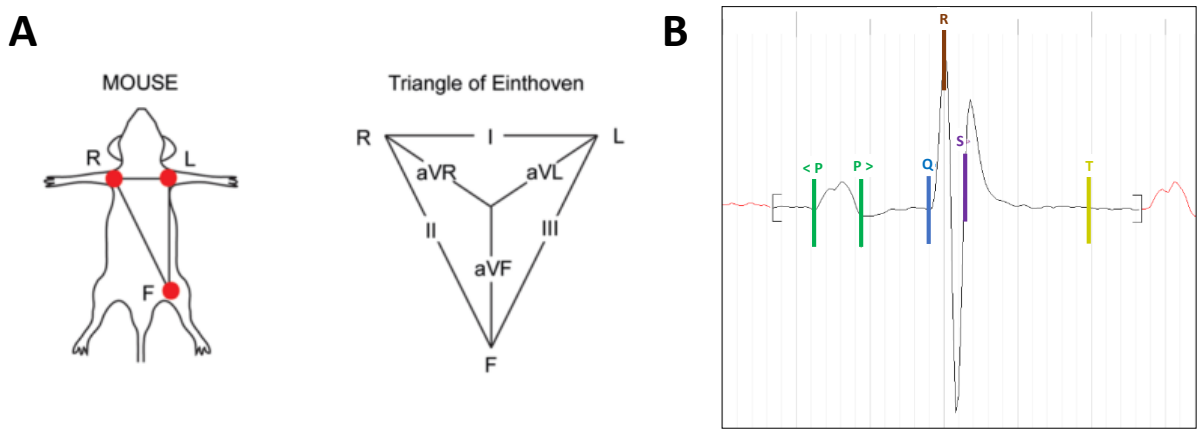


Figure 22. **Représentations des plans d'incidence mesurés par électrocardiographie.**
(A) Schéma illustrant le placement des électrodes pour enregistrer l'ECG d'une souris âgée de 14 semaines sur 6 dérivations selon le triangle d'Einthoven. Illustrations de Boukens et al., 2014. (B) Tracé ECG normal de souris en dérivation DI, les différents intervalles électriques cardiaques étant annotés P, Q, R, S et T. (F : Foot electrode; L: Left electrode; R : Right electrode).

## E. Echocardiographie

Sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (4% pour l'induction ; 2,5% pour le maintien) et à température corporelle contrôlée à l'aide d'un tapis chauffant (Harvard Apparatus), une échocardiographie en deux dimensions (2-D) est réalisée sur les animaux avec un échographe Vivid 7 (GE Healthcare) associé à une sonde linéaire 7,5MHz (modèle M12L). Pour observer les paramètres structuraux tels que le diamètre du ventricule gauche et les épaisseurs de parois libre du ventricule gauche, des mesures ont été réalisées en fin de diastole à partir d'images à incidence parasternale en « grand axe » sur un mode d'enregistrement « temps-mouvement » (Figure 23A). La fonction systolique a été évaluée par les mesures des fractions d'éjection obtenues également à partir des acquisitions « temps-mouvement » réalisées en « grand axe » (Figure 23A). Pour la fonction diastolique, la vitesse du sang passant la valve mitrale est mesurée au cours du temps en Doppler pulsé avec des images à incidence apicale des 4 cavités du myocarde. A partir des flux mitraux enregistrés, le temps de relaxation isovolumétrique, le rapport des ondes E sur A et le temps de décélération de l'onde E ont été

mesurés (Figure 23B). Au cours de chaque acquisition, un électrocardiogramme sommaire a été enregistré par l'échographe permettant de mesurer la fréquence cardiaque au moment des mesures et de s'affranchir de tout biais d'évaluation.

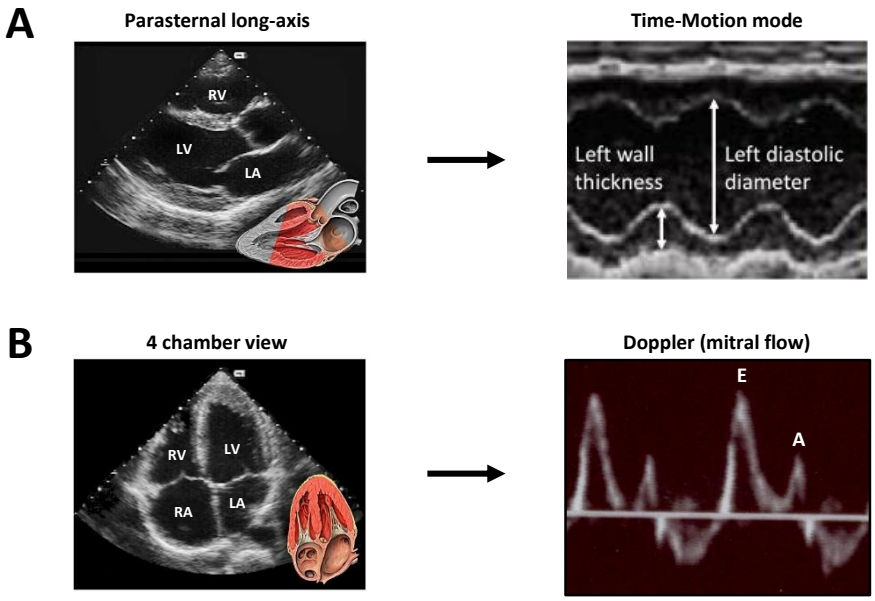


Figure 23. **Représentations des plans d'incidence observés par échocardiographie.** (A) Illustration du plan d'incidence « grand axe » du coeur pour les enregistrements « temps-mouvement ». (B) Illustration du plan d'incidence « 4 cavités » du cœur pour les enregistrements du flux mitral en mode doppler. Illustrations de Patrick J. Lynch, et C. Carl Jaffe, Creative Commons Attribution 2.5 License 2006. (*LA*: Left Atrium; *LV*: Left Ventricle; *RA*: Right Atrium; *RV*: Right Ventricle).

## IV. Tests de biostatistiques

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism6. Les différences statistiques ont été déterminées par des tests non-paramétriques de Mann Whitney ou des tests d'ANOVA deux voies avec post-test de Bonferroni selon les cas. Toutes les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été jugées significatives.

# RESULTATS

## I. Article : New role of the "cardiac" sodium channel $Na_V1.5$ in lungs: localization and functional involvements in mouse.

Pour éviter toute confusion dans l'ordre des figures de ce mémoire, les renvois aux figures de l'article dans les résultats et discussions seront tous précédés de la lettre « A » (exemple : « Fig.1 » de l'article sera cité dans ce mémoire « Figure A1 »).

**New role of the "cardiac" sodium channel $Na_V1.5$ in lungs: localization and functional involvement in mouse.**

*Andrea Fonteneau[1], Benoit Jagu[1], Agnès Carcouët[1], Agnès Hivonnait[1], Marie-Aude Cheminant[1], Thierry Le Tourneau[1,2], Flavien Charpentier[1,2], Gilles Toumaniantz[1,3,*].*

***1. l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France***

***2. CHU Nantes, Nantes, France***

***3. Department of Physiology, Université des Sciences et Techniques de Nantes, France***

****. Corresponding author***

***E-mail: gilles.toumaniantz@inserm.fr***

**Short title:** Sodium channel $Na_V1.5$ in mouse lungs.

## ABSTRACT

The voltage-gated sodium channel $Na_V1.5$ encoded by the *Scn5a* gene is highly expressed in cardiomyocytes and plays a key role in cardiac excitability. However recent studies also demonstrate expression and electrophysiological activity of $Na_V1.5$ in human and rabbit lungs, more precisely isolated airways and vascular smooth muscle cells. These observations suggested a functional role for this channel in this tissue. The aim of this study was to describe $Na_V1.5$ expression in lungs and to evaluate its involvement in lung function using a heterozygous knock-out $Scn5a^{+/-}$ mouse model. We observed that mouse isolated and cultured airway smooth muscle cells only showed a slight expression of $Na_V1.5$. In contrast, an immuno-histological approach highlighted a major expression of $Na_V1.5$ at the plasma membrane of large cells lining the pulmonary vein walls, identified as having a cardiomyocyte-like striated muscle cell phenotype. Interestingly, functional *ex vivo* and *in vivo* assessments demonstrated a new role for $Na_V1.5$ in the respiratory tract, with a 25%-decrease of the isolated trachea contraction and a 50%-decrease of the respiratory system reactivity of $Scn5a^{+/-}$ mice compared to WT mice when exposed to increasing doses of methacholine. This loss of function was also observed after ajmaline and ketamine expositions before methacholine induction, both described as $Na_V1.5$ electrical activity blockers. This study conducted on transgenic mice out of pathological context showed that this functional effect of $Na_V1.5$ in lungs does not seem to be related to structural or inflammatory remodeling. These findings support a role of $Na_V1.5$ in mice respiratory function, which would be interesting to study in lung diseases, like in the case of asthma emergence, which has been recently correlated with the appearance of heart diseases.


**Key-words:** $Na_V1.5$ / Lungs / Trachea / Mice / Airways reactivity.

## INTRODUCTION

The voltage-gated sodium channel $Na_V1.5$ studies have mainly focused on its electrical role in cardiac muscle cells. $Na_V1.5$ plays a crucial role in the initiation and propagation of the action potential such as neurons, skeletal muscle cells and cardiomyocytes [1]. In case of mutations in the Scn5a gene, encoding the $Na_V1.5$ protein, electrical conduction and resulting cardiac contraction can be altered. These mutations are associated with hereditary pathologies called cardiac sodium channelopathies [2]. In the past decade, multiple studies demonstrated expression of this channel in other non-excitable cell types and organs. $Na_V1.5$ expression has been found in cardiac fibroblasts [3], vascular endothelial cells [4,5], smooth muscle cells (SMCs)

of the intestine and vessels [6–10] and also cancer cells [11-13]. The possible contractile role of $Na_V1.5$ in these cell types is studied, as well as its potential involvement in the remodeling of the extracellular matrix.

$Na_V1.5$ has also been found to be weakly expressed in SMCs isolated from human pulmonary arteries in culture [6,9] and in freshly isolated bronchial SMCs from rabbits [14] but not in human cultured bronchial SMCs [15]. To date, no data are available regarding $Na_V1.5$ expression and function in mouse lungs, although it is a widely used specie in studies on asthma or pulmonary pathologies. To date, numerous ion channels and transporters have been described in lungs, not only in SMCs from airways and blood vessels [16], but also in airway epithelial cells [17]. Preservation of an appropriate level of hydration, pH, and viscosity for the airway surface liquid requires the function of different types of ion channels and transporters. Since their functional alterations often lead to lung pathologies, ion channels may represent excellent therapeutic targets [17,18].

The lung is responsible for vital gas exchanges and transfers from the air to the bloodstream to maintain the body function in physiological conditions. Many respiratory diseases prevent this organ from working properly. Three main types of lung diseases exist. The first type affects large and smaller airways causing their narrowing or their blockage. These airway diseases include asthma, chronic obstructive pulmonary disease and bronchiectasis [19–21]. The second type is the lung tissue disease that affects composition and thickness of lung parenchyma surrounding airways, leading to restrictive syndrome such as pulmonary fibrosis and sarcoidosis [22,23]. The third type is lung circulation disease, like pulmonary hypertension, caused by clotting, scarring or inflammation of the blood vessels [24]. In fact, many lung diseases combine phenotypic traits of these three types of diseases.

Therefore, the aim of our work is 1) to perform a complete description of *Scn5a* gene and $Na_V1.5$ protein expression in mouse respiratory system under physiological conditions, and 2) to evaluate the potential implications of $Na_V1.5$ expression on the pulmonary function using a transgenic mouse model with a heterozygous knock-out of the *Scn5a* gene.

## MATERIALS AND METHODS

### *Mice.*

All experimental procedures with animals were approved by the French Ministry of Higher Education and Research and by the local ethics committee (*Comité d'Ethique en Experimentation Animale des Pays de Loire*). Initially provided $Scn5a^{+/-}$ knock-out mice were

generated at the University of Cambridge (Cambridge, England) on 129/Sv genetic background. 129/Sv Scn5a$^{+/-}$ mice were then derivated onto C57Bl/6J genetic background and bred in the animal facility of Nantes University Health Research Institute (*Unité de Thérapeutique Expérimentale*) (Nantes, France). Mice were genotyped by Polymerase Chain Reaction (PCR) as previously described [25]. All experiments were performed on 14-16 weeks old female C57Bl/6J Wild-Type (WT) and Scn5a$^{+/-}$ littermates. Homozygous knockout Scn5a$^{-/-}$ is lethal [25].

### *Lung Tissues.*

After euthanasia by cervical dislocation, the mouse lungs were quickly removed. Right lung was snap-frozen in liquid nitrogen for molecular experiments. For histological and immunofluorescence analysis, left lung was rinsed in saline solution and fixed by immersion in 10% Neutral Buffered Formalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States).

### *Airway Smooth Muscle Cell Cultures.*

Immediately after euthanasia, mouse primary airway smooth muscle cells were isolated from the trachea and primary bronchi. Connective tissue, vasculature, and innervations were manually removed and the muscular layer was further digested 2h with 1mg/mL collagenase II (Worthington Biochemical, Lakewood, United States) at 37°C under agitation. Cells were grown in DMEM (Gibco, Invitrogen ThermoFisher Scientific, Waltham, United States) containing 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C and in a 95%/5% air/$CO_2$ atmosphere. Medium was changed every 72 hours. All experiments on cultured Airway Smooth Muscle Cells (cASMC) were performed after 1 passage.

### *RT-PCR*

Total RNA were isolated from samples using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, United States) and treated with DNA-free DNA Removal Kit (Invitrogen). First-strands cDNA were synthesized from 1 µg of total RNA samples using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Non-quantitative PCR were performed with Taq DNA Polymerase, using the PCR GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, United States). Electrophoresis data were collected with ChemiDoc MP imager (BioRad, Marnes la Coquette, France) and analyzed with Image Lab 5.2.1 Software (Biorad). The specific primers used were as follows: Scn5a forward primer: 5'- GAAGAAGCTGGGCTCCAAGA-3'; Scn5a reverse primer: 5'-CATCGAAGGCCTGCTTGGTC-3' (Scn5a amplification product: 101pb) and Gapdh forward primer: 5'-ACTGGCGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCT-3'; Gapdh reverse primer: 5'-CTCCTTGGAGGCCATGTAGGCCATGAGGTC-3' (Gapdh amplification product: 711 bp). The following thermal cycler conditions were used: for Scn5a 95°-5 min, 40 cycles (95°-15 sec, 60°-1

115 min), 4°-hold; for Gapdh 96°-3 min, 30 cycles (94°-45 sec, 65°-30 sec, 68°-2 min), 68°-2 min, 4°-
116 hold.

117 ***QIAGEN Mouse Wound Healing RT2 Profiler Array***

118 Total RNA were isolated from samples using RNeasy Plus Universal Midi kit (Qiagen,
119 Hilden, Germany) and treated with gDNA Eliminator (Qiagen). First-strands cDNA were
120 synthesized from 400 ng of total RNA samples using $RT^2$ First Strand Kit (Qiagen). PAMM-
121 121ZD-12- $RT^2$ Profiler™ PCR Array Mouse Wound Healing was used and pathways and genes
122 analyzed are summarized in Table 1. Quantitative PCR (qPCR) were performed with $RT^2$ SYBR
123 Green qPCR Mastermix (Qiagen), using the ABI 7900 HT thermocycler (Applied Biosystems,
124 Foster City, United States). The fluorescence signals were normalized to average of five
125 ubiquitously expressed housekeeping gene (HKG): β Actin (Actb); β2 Microglobulin (B2m);
126 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh); β Glucuronidase (Gusb) and Heat Shock
127 Protein 90α B1 (Hsp90ab1). The comparative threshold cycle (Ct) relative quantification ΔCt
128 method ($\Delta Ct = Ct_{gene} - Ct_{HKG}$) and fold change were used to compare the amounts of mRNA in WT
129 and $Scn5a^{+/-}$ mice.

| Extracellular Matrix Structural Components | Extracellular Matrix Remodeling Enzymes | Cell Adhesion Molecules | Cytoskeleton Regulators | Inflammatory Cytokines & Chemokines | Growth Factors | Signal Transduction |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Col14a1 | Ctsg | Cdh1 | Acta2 | Ccl12 | Angpt1 | Ctnnb1 |
| Col1a1 | Ctsk | Itga1 | Actc1 | Ccl7 | Csf2 | Egfr |
| Col1a2 | Ctsl | Itga2 | Rac1 | Cd40lg | Csf3 | Il6st |
| Col3a1 | F13a1 | Itga3 | Rhoa | Cxcl1 | Ctgf | Mapk1 |
| Col4a1 | F3 | Itga4 | Tagln | Cxcl11 | Egf | Mapk3 |
| Col4a3 | Fga | Itga5 | | Cxcl3 | Fgf10 | Pten |
| Col5a1 | Mmp1a | Itga6 | | Cxcl5 | Fgf2 | Ptgs2 |
| Col5a2 | Mmp2 | Itgav | | Ifng | Fgf7 | Stat3 |
| Col5a3 | Mmp7 | Itgb1 | | Il10 | Hbegf | Tgfb1 |
| Vtn | Mmp9 | Itgb3 | | Il1b | Hgf | Tgfbr3 |
| | Plat | Itgb5 | | Il2 | Igf1 | Wisp1 |
| | Plau | Itgb6 | | Il4 | Mif | Wnt5a |
| | Plaur | | | Il6 | Pdgfa | |
| | Plg | | | | Tgfa | |
| | Serpine1 | | | | Tnf | |
| | Timp1 | | | | Vegfa | |

130 **Table 1. Qiagen Mouse Woung Healing $RT^2$ Profiler Array and genes PAMM-121Z.**

### *Western Blot*

Total proteins were isolated from samples in ice-cold lysis buffer containing: 100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 1 mM EGTA; 1% Triton X-100; 1 mM $Na_3VO_4$; 50 mM NaF; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Roche Applied Science, Meylan, France) and protease inhibitor mixture (1:100; Sigma-Aldrich) (pH 7.4). Total homogenate protein concentrations were determined using the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, United States). Samples were prepared with 40 µg of total protein, 1 µL of NuPAGE Sample Reducing Agent 10X (Invitrogen), 2.5 µl of NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen) and heated at 99°C during 5 min. Samples were subjected to electrophoresis on 4-15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-FreeTM Precast Gels (Biorad) and transferred on Trans-Blot Turbo Nitrocellulose Transfer Packs (Biorad). Membranes were blocked (using 5% non-fat milk) and incubated with primary antibodies targeting $Na_v1.5$ (14421) from Cell Signaling Technology (Leiden, The Netherlands). Next, membranes were incubated with the appropriate secondary horseradish peroxidase antibody (sc-2054) from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Incubations were followed by chemiluminescent detection using Clarity Western ECL Substrate (Biorad) and ChemiDoc MP System (Biorad). Quantifications were performed with Image Lab Software (Biorad) and normalized to 45 kDa Stain free blot signal.

### *Histology*

For tissue staining, fixed samples were embedded in paraffin and transverse sectioned at 7-µm intervals. Slices were deparaffinised and hydrated in Tissue-Clear (Sakura Finetek, Villeneuve-d'Ascq, France), solvents with decreasing alcoholic concentrations and finally deionized water. Hematoxylin staining was performed during 20 sec and eosin staining was performed during 10 sec. Next the tissue sections were rinsed in deionized water and dehydrated in increasing alcoholic solutions and Tissue-Clear. Sections were mounted in DPX Mountant for Histology (Sigma-Aldrich) and images were obtained with a classic light microscope Nikon Eclipse E-600 with NIS-Elements BR v4.10 Software (Nikon, Tokyo, Japan) and examined with Image J Software (NIH software, Bethesda, United States). For immunofluorescence, fixed samples were embedded in OCT compound (Sakura Finetek), snap-frozen in liquid nitrogen and sectioned at 5-µm intervals with cryostat LEICA CM1950 (Leica, Wetzlar, Germany).

### *Immunofluorescence*

Depending on the primary antibodies used, antigens were retrieved on lung slices when it was necessary by boiling for 30 min in citrate buffer containing 10 mM sodium citrate and 0.05% Tween20 (pH 6). For cASMC, antigen retrievals were realized by a brief 5-min

pretreatment with 1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (pH 7.4). Lung slices and cASMC were permeabilized with Triton X-100 and blocked with Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich). Primary antibodies used were the rabbit anti-$Na_V1.5$ (14421) from Cell Signaling Technology, rabbit anti-SM22α (ab14106) from Abcam (Paris, France), rabbit anti-MHC3 (sc20641) from Santa Cruz Biotechnology and rabbit anti-Cx43 (C 6219) from Sigma-Aldrich. Then samples were incubated with the Alexa Fluor 647 conjugated goat anti-rabbit IgG, (A21245) from Invitrogen as secondary antibody. Nuclei were stained with Hoechst solution (Sigma-Aldrich). All samples were mounted in ProLong Gold Antifade Mountant (Life Technologies, Carlsbad, United States). Images were obtained with a confocal microscope Nikon A1 RSi (Nikon) and examined with Image J Software.

### *Isolated-trachea Contractility*

The mouse trachea was dissected immediately after euthanasia by cervical dislocation. Connective tissue, vasculature, and innervations were removed. The trachea was then threaded onto two L-shaped metal prongs connected to a force-displacement transducer and a micrometer. Threaded trachea was immersed in an isolated organ bath containing Krebs-Henseleit Buffer (118 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 1.2 mM $KH_2PO_4$; 1.2 mM $MgSO_4$; 11 mM glucose; 25 mM $NaHCO_3$ and 2 mM $CaCl_2$) at 37°C (pH 7.4). The air inlet was adjusted in each bath to obtain a light stream of $O_2/CO_2$ and the micrometer was slowly adjusted to obtain a passive tension of 300 mg. The trachea was allowed to equilibrate for at least 30 min before experimental challenges. Following equilibration, the trachea was challenged twice with a high potassium solution of 90 mM KCl as control. Tracheal contraction evoked by cholinergic stimulation was recorded in response to multiple additions of methacholine in a cumulative dose fashion from $10^{-8}$ to $10^{-4}$ M methacholine, before and following 15 min pre-incubation with ajmaline (0.2 mM and 0.8 mM) or ketamine (1 mM and 2 mM). The contraction values measured after stimulation were recorded with LabChart Software (AdInstruments, Sydney, Australia) and then expressed as percentage of the control values.

### *Whole-body Plethysmography*

Airway responsiveness was measured in conscious and unrestrained mice using barometric whole-body plethysmography chamber (EMKA Technologies, Paris, France). After 5 min habituation in chambers, mice respiratory pressure curves were recorded in response to inhaled methacholine (Sigma-Aldrich) at concentrations of 0, 5, 10, 20 and 40 mg/mL for 1 min. Airway responsiveness was expressed in enhanced pause (Penh) units, a calculated value which reflects the respiratory function: Penh = (Te/Tr - 1) x PEF/PIF (where Te is the expiration time, Tr is the relaxation time, PEF is the peak expiratory flow and PIF is the peak inspiratory flow).

The Penh values, measured after each methacholine stimulation, were averaged and expressed as the fold-increase relative to the baseline values.

### *Forced Oscillation Technique.*

Dynamic airway resistance was measured using the Forced Oscillation Technique (FOT). Mice were anesthetized (ketamine 80 mg/kg + xylazine 16 mg/kg; i.p), paralyzed (3 mg/kg rocuronium bromide; i.p), tracheotomized and attached to a computer-controlled piston ventilator FlexiVent system (SCIREQ, Montreal, Canada) in order to be immediately mechanically ventilated (150 breaths/min). Methacholine challenges at concentrations of 0, 10, 15, 20 and 40 mg/mL were delivered by channeling inspiratory flow from the ventilator *via* a nebulizer aerosol system Aeroneb (Aerogen, Galway, Ireland). Single frequency forced oscillation perturbation allowed to obtain Resistance (Rrs) of the respiratory system. After each methacholine stimulation, mean of the recorded values was calculated.

### *Statistics*

Data were expressed as mean ± Standard Error of the Mean (SEM). All statistical analyses were made with Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, United States). Statistically significant differences were determined with either Mann–Whitney rank sum test or between mean values using two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test when appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

## RESULTS

### *C57Bl6 Scn5a$^{+/-}$ mice only showed a Cardiac conduction slowing.*

Because we used Scn5a$^{+/-}$ mice to explore the effects of a decrease of $Na_V1.5$ expression on respiratory function, we first had to exclude cardiac contractile dysfunction as the cause of putative changes in pulmonary function or structure induced by $Na_V1.5$ knockdown. Scn5a$^{+/-}$ mice exhibited a major decrease of cardiac $Na_V1.5$ expression (WT=2.07±0.26 and Scn5a$^{+/-}$ =0.57±0.05 relative to Stain free ratio) (Fig S1A). ECG recording highlighted a decreased velocity of cardiac conduction in Scn5a$^{+/-}$ mice compared to WT mice, with significant increases of the PR interval (WT=40.8±0.4 ms and Scn5a$^{+/-}$=46.1±0.7 ms) and the QRS interval (WT=11.1±0.3 ms and Scn5a$^{+/-}$=12.8±0.2 ms) (Fig S1B). Heart/body weight ratio (WT=5.21±0.12 and Scn5a$^{+/-}$ =5.08±0.07) and lungs/heart weight ratio (WT=1.42±0.04 and Scn5a$^{+/-}$=1.45±0.03) were not altered in Scn5a$^{+/-}$ mice (Fig S1C). Heart structural and functional evaluations by echocardiography showed no left ventricular remodeling and no systolic or diastolic dysfunction (Fig S1D).

### *$Na_v1.5$ is mostly expressed at the plasma membrane of the vein wall striated muscle cells in mouse lungs.*

Based on previous studies demonstrating that $Na_v1.5$ is expressed in human and rabbit lung isolated or cultured cells using RT-PCR and patch-clamp sodium current recordings [6,9,14], it was necessary before further analysis to confirm that the *Scn5a* gene was also expressed in mouse lung with a total organ approach. RT-PCR electrophoresis realized on total organ RNA preparations showed amplifications of the *Scn5a* gene in lungs and in the hearts (Fig 1A). Based on these results, $Na_v1.5$ protein expression was also confirmed for the first time by western blot analysis on mouse lung lysates as compared to heart lysates (Fig 1B). This protein detection allowed us to perform the same immuno-detection on lung frozen sections in order to locate this $Na_v1.5$ expression fully detected on total lysates. Immuno-histological analysis revealed a surprising location for $Na_v1.5$: the major expression of $Na_v1.5$ was not detected on airway smooth muscle cell layers as expected, but rather on large cells lining the pulmonary vein walls. In a relevant way the $Na_v1.5$ labelling was located at the plasma membrane of these venous cells (Fig 1C). To identify these large cells, we realized other immuno-fluorescence staining studies and showed that cells expressing $Na_v1.5$ (Fig 1D) also expressed type 3 Myosin Heavy Chain (MHC 3), the motor protein of muscle thick filaments (Fig 1E) and connexin 43 (Cx43), the most common gap junction protein in cardiac ventricles (Fig 1F). Zoom images show that Cx43 labelling on pulmonary vein striated muscle cells is clustered on the two sides of the plasma membrane which are junctional with neighboring cells.

**Fig 1. $Na_v1.5$ expression in mouse lungs.** (A) RT-PCR electrophoresis showing *Scn5a* mRNA expression (n=3/condition). (B) Western blot results for $Na_v1.5$ protein expression in total heart and lung lysates (n=3/condition). (C) Immunofluorescent staining of lung frozen sections labelled for $Na_v1.5$ on airways and pulmonary veins (n=3/condition). Focus on immunofluorescence detection for (D) $Na_v1.5$, (E) MHC3 and (F) Cx43 proteins in pulmonary vein wall on serial sections. Optical zooms are shown on the right images for each targeted protein (n=3/condition). Cx43: Connexin 43; kDa: kiloDalton; MHC3: type 3 myosin heavy chain; bp: base pair.

### *$Na_v1.5$ is slightly expressed in mouse cASMC, but not at the plasma membrane.*

Because we could not highlight $Na_v1.5$ expression in lung airways on lung immunohistological analysis, we used an isolated and cultured cell approach to confirm the potential Scn5a gene expression in mouse respiratory tract muscular cells. RT-PCR electrophoresis realized on mouse cASMC indicated an amplification of the Scn5a gene, which

was also observed in lung RNA preparations (Fig 2A). Then $Na_V1.5$ protein expression was also detected by western blot analysis on cASMC lysates and compared to lung preparations (Fig 2B). An immuno-detection was also realized on fixed cASMC to locate the $Na_V1.5$ expression on the cellular structure. Immunofluorescence analysis confirmed $Na_V1.5$ expression for all Smooth Muscle Protein 22-Alpha (SM22) labeled cells, but rather diffused in the cytoplasm and not concentrated at the plasma membrane in contrast to the $Na_V1.5$ expression observed in the pulmonary vein striated muscle cells (Fig 2C).

**Fig 2 : $Na_V1.5$ expression in cultured Airway Smooth Muscle Cells (cASMC) isolated from WT mice trachea and primary bronchi.** (A) RT-PCR electrophoresis showing control Gapdh and Scn5a mRNA expression encoding for $Na_V1.5$ from lung and cASMC preparations (n=5/condition). (B) Western blot detection for $Na_V1.5$ protein expression in total lung and cASMC lysates relative to Stain free protein control (n=2/condition). (C) Immunofluorescence staining on cASMC for $Na_V1.5$ and control SM22 (n=3/condition). cASMC: cultured Airway Smooth Muscle Cells; kDa: kiloDalton; L: Ladder; NRT: No Reverse Transcription; bp: base pair; RT: Reverse Transcription; SM22: Smooth Muscle-specific protein 22.

### *$Na_V1.5$ in lungs is needed for methacholine-induced airway constriction.*

To highlight the potential role of $Na_V1.5$ in the respiratory system, we used a $Scn5a^{+/-}$ mouse model to see the functional impact of a significant decrease of $Na_V1.5$ expression in lungs. Western blot analysis showed that $Na_V1.5$ expression was divided by half in $Scn5a^{+/-}$ mouse lungs (1.05±0.20 relative to Stain free ratio) compared to WT mouse lungs (2.16±0.27)) (Fig 3A). This 50% decrease of protein expression was also locally confirmed at the plasma membrane of the pulmonary veins striated muscle cells by immunofluorescence labelling (Fig 3B). Because we could not manually isolate the secondary bronchi from the mice, *ex vivo* assessments of airways reactivity were made on isolated tracheas incubated with increasing doses of methacholine. Results showed a significant decrease of the trachea contraction in $Scn5a^{+/-}$ mice compared to WT mice when exposed to increasing doses of methacholine (for $10^{-4}$M methacholine: WT=306.9±37.7 and $Scn5a^{+/-}$=222.6±13.6% of KCl control contraction) (Fig 3C). We also observed a larger decrease of this methacholine-induced contraction when tracheas were pre-incubated with increasing doses of Ajmaline, described as a high affinity $Na_V1.5$ channel inhibitor (for $10^{-4}$M methacholine: WT + ajmaline 0.2 mM=166.1±13.9 and WT + ajmaline 0.8 mM=16±9.9% of KCl control contraction) (Fig 3C). When inhibited with Ajmaline, trachea contractions were similar for WT compared to $Scn5a^{+/-}$ condition (for $10^{-4}$M methacholine: $Scn5a^{+/-}$ + Ajmaline 0.2 mM= 130±19.7 and $Scn5a^{+/-}$ + Ajmaline 0.8 mM=19.±2.4% of KCl control contraction) (Fig 3C). After *ex vivo* contraction assessments, *in vivo* respiratory tests were realized by whole-body plethysmography under increasing doses of methacholine. Results also

described a significant decrease of airway reactivity after methacholine inhalation for Scn5a$^{+/-}$ mice compared to WT (for 40 mg/mL methacholine: WT= 5.91±0.82 and Scn5a$^{+/-}$=3.13±0.58 Penh/Penh base) (Fig 3D). Before *in vivo* assessments of respiratory function with forced oscillation technique (FlexiVent) under fixed anesthesia, *ex vivo* tests of airway reactivity were made on mice isolated tracheas incubated with increasing doses of methacholine to assess the potential inhibitory effect of ketamine, described as an inhibitor of $Na_V1.5$ sodium current and used in the anesthesia mix for FlexiVent. Results showed a significant decrease of the trachea contraction in WT mice under methacholine when pre-incubated with increasing doses of Ketamine (for $10^{-4}$M methacholine: WT=272.07±47.14; WT + Ketamine 1 mM=121.73±26.32 and WT + Ketamine 2 mM=17.27±16.33% of KCl control contraction) (Fig 3E). Trachea contractions were significantly similar for WT compared to Scn5a$^{+/-}$ conditions only when inhibited by Ketamine (for $10^{-4}$M methacholine: Scn5a$^{+/-}$= 195.49±16.44; Scn5a$^{+/-}$ + Ketamine 1 mM=88.76±9.24 and Scn5a$^{+/-}$ + Ketamine 2 mM=7.81±6.20% of KCl control contraction) (Fig 3E). After *ex vivo* contraction assessments, *in vivo* respiratory tests were realized under increasing doses of inhaled methacholine but under Ketamine/xylazine anesthesia with Flexivent system. As expected results showed very low contraction of the airways after methacholine inhalation for WT mice. The results were the same for Scn5a$^{+/-}$ conditions with no difference of contraction force compared to WT (for 40 mg/mL methacholine: WT= 1.46±0.24 and Scn5a$^{+/-}$=1.35±0.12 $cmH_2O.s/mL$) (Fig 3F).

**Fig 3. $Na_V1.5$ is involved in respiratory function.** (A) Western blot detection and quantification of the $Na_V1.5$ protein in total WT and Scn5a$^{+/-}$ mice lung lysates relative to Stain free protein controls (n=5/condition). (B) Focus on the pulmonary vein wall $Na_V1.5$ immunofluorescence staining in WT and Scn5a$^{+/-}$ mice lung frozen sections (n=3/condition). (C) Ex vivo contraction of WT and Scn5a$^{+/-}$ mice isolated tracheas exposed to increasing doses of methacholine bronchoconstrictor, before and after Ajmaline antiarrhythmic pre-incubation. (D) Whole-body plethysmography assessment testing respiratory system reactivity exposed to increasing doses of inhaled methacholine bronchoconstrictor on WT and Scn5a$^{+/-}$ mice. (E) Ex vivo contractions of WT and Scn5a$^{+/-}$ mice isolated tracheas exposed to increasing doses of methacholine bronchoconstrictor, before and after Ketamine pre-incubation. (F) Airway resistance measurements on tracheotomized female WT and Scn5a$^{+/-}$ mice exposed to increasing doses of inhaled methacholine bronchoconstrictor with forced oscillation under ketamine/xylazine anesthesia. Data are presented as mean ±SEM.*p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001 versus WT.

### *The functional effect of $Na_v1.5$ knockdown or inhibition in lungs is not associated to lung fibrosis or inflammation.*

Modifications of airway reactivity are often associated to adaptive lung structural and inflammatory remodeling. First, transcriptomic analyses on mice lung RNA preparations were performed in order to identify potential remodeling markers in $Scn5a^{+/-}$ mice. Analyses were made on 84 "wound healing" genes identified in various signaling pathways involved in adaptive tissue remodeling process (Table 1). Results for relative quantification ΔCt method showed significant increases of RhoA (WT=0.79±0.05 and $Scn5a^{+/-}$=1.08±0.09), Il1b (WT=5.38±0.18 and $Scn5a^{+/-}$=6.5±0.35), Col5a3 (WT=9.07±0.06 and $Scn5a^{+/-}$=9.48±0.15), Ptsg2 (WT=5.29±0.13 and $Scn5a^{+/-}$=5.94±0.14), Tgfbr3 (WT=5.19±0.08 and $Scn5a^{+/-}$=5.97±0.18) (Fig 4A), Plaur (WT=4.02±0.08 and $Scn5a^{+/-}$=4.58±0.08) and Itga2 (WT=5.04±0.06 and $Scn5a^{+/-}$=5.3±0.06) (Fig S2) gene expressions all associated with low ΔCt fold changes (less than 1.5). These remodeling gene expression modulations remain modest, and therefore do not explain the significant functional effect observed on $Scn5a^{+/-}$ mice airways. This was confirmed by histological analysis, which showed no difference in lung structure or inflammatory cell recruitment between WT and $Scn5a^{+/-}$ mice, around airways and also pulmonary veins where $Na_v1.5$ channels are mostly expressed.

**Fig 4. $Na_v1.5$ voltage-gated sodium channel absence of effect on lung structural and inflammatory remodelings.** (A) Real-time RT-PCR relative quantifications of total WT and $Scn5a^{+/-}$ mice lung preparations, realized with Qiagen™ Mouse Wound Healing RT2 Profiler™ Array (n=5/conditions). (B) Hematoxylin and eosin staining for inflammation detection around airways and pulmonary veins on WT and $Scn5a^{+/-}$ mice lung paraffin sections (n=5/condition). Data are presented as mean ±SEM. aw: airway; ECM: Extacellular matrix; FC: Fold change; v: vein. *p<0.05 versus WT.

## DISCUSSION

In this study, we fully characterized for the first time the $Na_v1.5$ sodium channel in mouse lungs. We described the expression, the localization and the functional implications of this channel, usually associated with cardiac muscle.

In RT-PCR experiments, Scn5a mRNA encoding for $Na_v1.5$ was readily found in all samples of mouse lungs tested. Furthermore this expression, which has been confirmed at the protein level, is not negligible when compared to the heart (Fig 1A & 1B). However, other authors already investigated functional voltage-gated $Na^{(+)}$ channels in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells [6,9] or in rabbit bronchial smooth muscle cells [14].

Thus, their contributions to the regulation of pulmonary functions and their potential roles in the pathogenesis of pulmonary diseases were discussed.

Once this pulmonary expression was highlighted, we had to identify the potential expression site(s) for this channel. Previous studies reported at least a smooth muscle expression based on freshly vascular and airways dissociated cells [9].

In this study, $Na_v1.5$ expression in adult mouse lung was investigated by immunohistochemistry. Surprisingly, endothelial and smooth muscle cells do not appear to be the major expression sites, although a weak signal slightly higher than background noise was observable in these two sites. In contrast, another unexpected structure clearly emerged as the major expression site in mouse lungs. Indeed, large cells lining the pulmonary veins were clearly observed as positive for $Na_v1.5$ immunofluorescence signal. In order to validate these observations, histological studies were performed on sections from $Scn5a^{+/-}$ mice model to confirm a significant decrease of $Na_v1.5$ labelling. This depletion model, previously validated by western blot analysis, showed an important decline for $Na_v1.5$ signal previously mentioned. These results provide more relevance to our previous observations (Fig 3A & 3B).

Then, we tried to define the nature of these $Na_v1.5$-positive cells lining the pulmonary veins. Zoom observations for $Na_v1.5$ labellings showed its clear localization to the plasma membrane, which corresponds to its ion channel function (Fig 2D). Secondly in our study, all $Na_v1.5$-positive cells in pulmonary vein walls also showed immunofluorescent signal for type 3 MHC labelling. Myosin is a major contractile protein, which converts chemical energy into mechanical energy through the hydrolysis of ATP. Myosin heavy chains (MHC) are encoded by the MYH gene family, and different isoforms have been described from striated, smooth, and non-muscle cells. Most of MHC isoforms are detected in skeletal and cardiac muscle [26] including MHC3. Only $Na_v1.5$-positive cells lining pulmonary veins were labelled. These results suggest that these cells are striated muscle type and not smooth muscle type. Thirdly, results showed that $Na_v1.5$ expression in mouse lungs was associated with the expression of Cx43 protein, also usually described as implicated in cardiac electrical conduction. Three main connexins are expressed in cardiomyocytes: Cx43, Cx40, and Cx45 [27]. Gap junctions are clustered channels consisting of two hemi-channels, each formed by 6 connexin proteins, which electrically connect the cytoplasm of adjacent Cardiomyocytes [28]. In heart Cx43 is mainly expressed in atrial and ventricular cardiomyocytes [29]. Moreover, cardiomyocytes have been described in pulmonary veins in rodents and humans [30]. In humans they were related to atrial arrhythmias, including atrial fibrillation [31]. To investigate histological similarities and differences in pulmonary vein cardiomyocyte localization and distribution, Mueller-Hoecker and

collaborators [30] performed comparative studies on humans, rats and mice. Results on mice and rats revealed that cardiomyocytes regularly extend from the hilus along venous vessels into the lung tissue surrounding individual intrapulmonary veins of varying diameters (70-250 µm). These pulmonary vein cardiomyocytes showed the ultrastructure of a normal working myocardium with intact intercalated discs and tightly packed contractile filaments. In humans, extrapericardiac cardiomyocytes were only found in one third of the veins and showed an incomplete sleeve at the lung hilus. Folmsbee and collaborators suggested in several studies that these cells could contribute to asthma by regulating pulmonary vein inflammation [32,33]. More recently the same authors have described that targeting the function of cardiac cells in the pulmonary veins and/or heart may allow for novel and potentially efficacious therapies for asthma, particularly in challenging cases of steroid-resistant asthma [34]. Taken together, the abundant expression of $Na_V1.5$, MHC3 and Cx43 in pulmonary veins found in our study strongly suggests that these cells are electrically well coupled and present a cardiomyocyte phenotype.

Another obvious question is how $Na^+$ currents influence the contractile behavior of airway smooth muscle or any other nearly smooth muscles. Based on the weak $Na_V1.5$ fluorescent signal observed by immunohistochemistry on pulmonary smooth muscle cells and the previously cited works [6,9,14], we wanted to perform a characterization on freshly dissociated airway smooth muscle cells (bronchi and trachea). The low number of cells obtained from a mouse strained us to put them in culture and to characterize them quickly after their first passage to prevent any modification potentially induced by the culture process. In RT-PCR and western blotting experiments, mRNA and the encoding $Na_V1.5$ protein were found in cASMC, which have been controlled as also positive for the smooth muscle marker SM22 (Fig 2). These observations were in perfect agreement with the studies previously cited. However, the careful observations of images obtained by immunocytochemistry showed that the $Na_V1.5$ was predominant in the cytoplasm and not limited at the plasma membrane. The culture process may be the cause of this situation. In fact several studies have described a tendency for isolated cells to express $Na^+$ currents more prominently in cultured cells than in freshly dispersed cells, suggesting their participations in cell proliferation or migration [9,35].

To the best of our knowledge, our study is the first to use functional approaches based on whole tissue or whole animal to highlight $Na_V1.5$ role in the lung physiology. Based on immunohistochemical and molecular results obtained from cASMC, we began the functional characterization by *ex vivo* assessment of the airway reactivity performed on mouse isolated airways. Tracheas have been tested to reflect pulmonary airway activity because we could not isolate easily and manually the secondary bronchi from the mice. To highlight the potential role of $Na_V1.5$ in respiratory system, we used a $Scn5a^{+/-}$ mice model to see the functional effect of a

significant decrease of the $Na_v1.5$ expression. Results showed a significant decrease of the trachea contraction in transgenic mice compared to WT when exposed to increasing doses of methacholine (Fig 3C). The specificity of this functional alteration was confirmed when tracheas were pre-incubated with increasing doses of class I anti-arrhythmic Ajmaline treatment, described as a high affinity $Na_v1.5$ channel inhibitor. Ajmaline is clinically used to unmask latent type I ECG in Brugada syndrome (BrS) patients by changing the shape and threshold of cardiac action potentials [36,37]. This functional loss, recorded on $Scn5a^{+/-}$ mice tracheas by *ex vivo* contraction assessments, was also observed for the first time *in vivo* by whole-body plethysmography on unanesthetized and unrestrained mice (Fig 3D). To confirm these first two results, another *in vivo* functional test could be performed with forced oscillation technique (FlexiVent) on anesthetized mice. Before the implementation of this protocol, new *ex vivo* tests of airway reactivity were realized on mice isolated tracheas to assess the potential inhibitory effect of Ketamine, describing as $Na_v1.5$ sodium current inhibitor and used in the anesthesia mix for FlexiVent [38–40]. After pre-incubation with Ketamine, results showed a very low trachea contraction after methacholine exposition for WT condition. An overall literature review showed that all other anesthetic cocktails used for animal experimentation also have effects on voltage-gated sodium currents (Isoflurane - [41]; Buprenorphine - [42]; Etomidate - [43]; Lidocaine – [44]; Profofol - [45]). These observations demonstrated that it is impossible to use this type of protocol under deep anesthesia and analgesia in $Na_v1.5$ functional investigation on mice lungs.

Finally in order to explain pulmonary function mechanisms linked to $Na_v1.5$, a global transcriptomic approach was conducted as an initial step. The study of numerous transcripts encoding for cell signaling transducers, cytoskeletal, inflammation or extracellular matrix regulators showed no modification or only extremely modest variations in their expression profile for $Scn5a^{+/-}$ mouse lungs. No molecular regulatory pathway seems to stand out. In the same way, the hypothesis of a structural remodeling is not retained based on the results obtained by histological hematoxylin and eosin staining. No evidence of fibrosis, inflammatory cell recruitment or major structural reorganization was detected. These hypotheses of investigation were nevertheless relevant in view of the bibliographic elements described for $Na_v1.5$ at the remodeling level [46], such as the inflammatory status in view of the pulmonary vein cardiomyocyte expression of this channel [32–34].

The present study had a number of limitations. First, data were derived from adult mouse without any pulmonary disease, which does not reflect the clinical reality. Electrical remodelings in the myocardium lining the pulmonary veins under pathological conditions may allow for novel and potentially efficient therapies for asthma, particularly in challenging cases of

steroid-resistant asthma [34]. Secondly, further investigations are needed to elucidate the molecular mechanisms contributing to the functionality response demonstrated in this study. Nevertheless, this integrated work remains the first fully characterizing the $Na_V1.5$ sodium channel in mouse lungs to study pulmonary pathologies and their associated alterations.

## *Acknowledgments*

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement No HEALTH-F2-2009-241526, EUTrigTreat. It was also supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (grant No ANR-12-BSV1-0013-01) and the Genavie foundation. The authors wish to thank the IBiSA core facility Therassay and MicroPICell for their assistance for functional and microscopic explorations. They also wish to thank Gregory Bouchaud, Florian Dilasser, Martin Klein and Vincent Sauzeau for their transmission of knowledge, which allowed acquisition of essential protocols to fulfill this project.

## *Author Contributions*

Design of experiments: AF BJ GT. Experimental execution: AF BJ AC AH MAC. Data analysis: AF AC GT. Contribution to the writing of the manuscript: AF TLT FC GT.

## *References*

1. Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. J Mol Cell Cardiol. Academic Press; 2010;48: 2–11. doi:10.1016/J.YJMCC.2009.08.025

2. Zaklyazminskaya E, Dzemeshkevich S. Biochimica et Biophysica Acta The role of mutations in the SCN5A gene in cardiomyopathies. BBA - Mol Cell Res. Elsevier B.V.; 2016; doi:10.1016/j.bbamcr.2016.02.014

3. Chatelier A, Mercier A, Tremblier B, Thériault O, Moubarak M, Benamer N, et al. A distinct de novo expression of Nav1.5 sodium channels in human atrial fibroblasts differentiated into myofibroblasts. J Physiol. 2012;590: 4307–4319. doi:10.1113/jphysiol.2012.233593

4. Gosling M, Harley SL, Turner RJ, Carey N, Powell JT. Human saphenous vein endothelial cells express a tetrodotoxin-resistant, voltage-gated sodium current. J Biol Chem. 1998;273: 21084–90. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694861

5. Andrikopoulos P, Baba A, Matsuda T, Djamgoz MBA, Yaqoob MM, Eccles SA. Ca 2+ Influx

through Reverse Mode Na + /Ca 2+ Exchange Is Critical for Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 1/2 Activation and Angiogenic Functions of Human Endothelial Ce. J Biol Chem. 2011;286: 37919–37931. doi:10.1074/jbc.M111.251777

6. Platoshyn O, Remillard C V, Fantozzi I, Sison T, Yuan JX. Identification of functional voltage-gated Na+ channels in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. Pflugers Arch. 2005;451: 380–387. doi:10.1007/s00424-005-1478-3

7. Strege PR, Mazzone A, Kraichely RE, Sha L, Holm AN, Ou Y, et al. Species dependent expression of intestinal smooth muscle mechanosensitive sodium channels. Neurogastroenterol Motil. 2007;19: 135–143. doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00844.x

8. Fort A, Cordaillat M, Thollon C, Salazar G, Mechaly I, Villeneuve N, et al. New insights in the contribution of voltage-gated Nav channels to rat aorta contraction. PLoS One. 2009;4. doi:10.1371/journal.pone.0007360

9. Firth AL, Remillard C V, Platoshyn O, Fantozzi I, Ko EA, Yuan JX-J. Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. Pulm Circ. 2011;1: 48–71. doi:10.4103/2045-8932.78103

10. Verstraelen TE, ter Bekke RMA, Volders PGA, Masclee AAM, Kruimel JW. The role of the SCN5A-encoded channelopathy in irritable bowel syndrome and other gastrointestinal disorders. Neurogastroenterol Motil. 2015;27: 906–913. doi:10.1111/nmo.12569

11. Onganer PU, Djamgoz MBA. Small-cell lung cancer (human): Potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na+ channel expression in vitro. J Membr Biol. 2005;204: 67–75. doi:10.1007/s00232-005-0747-6

12. House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, et al. Voltage-gated Na+ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. Cancer Res. 2010;70: 6957–6967. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1169

13. Onkal R, Djamgoz MBA. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: Clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. Eur J Pharmacol. Elsevier B.V.; 2009;625: 206–219. doi:10.1016/j.ejphar.2009.08.040

14. Bradley E, Webb TI, Hollywood MA, Sergeant GP, McHale NG, Thornbury KD. The cardiac sodium current Nav1.5 is functionally expressed in rabbit bronchial smooth muscle cells. AJP

Cell Physiol. 2013;305: C427–C435. doi:10.1152/ajpcell.00034.2013

15. Jo T, Nagata T, Iida H, Imuta H, Iwasawa K, Ma J, et al. Voltage-gated sodium channel expressed in cultured human smooth muscle cells: Involvement of SCN9A. FEBS Lett. 2004;567: 339–343. doi:10.1016/j.febslet.2004.04.092

16. Hirota S, Helli P, Janssen LJ. Ionic mechanisms and Ca2+ handling in airway smooth muscle. Eur Respir J. 2007;30: 114–133. doi:10.1183/09031936.00147706

17. Bartoszewski R, Matalon S, Collawn JF. Ion channels of the lung and their role in disease pathogenesis. Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol. 2017; ajplung.00285.2017. doi:10.1152/ajplung.00285.2017

18. Peteranderl C, Sznajder JI, Herold S, Lecuona E. Inflammatory responses regulating alveolar ion transport during pulmonary infections. Front Immunol. 2017;8: 1–8. doi:10.3389/fimmu.2017.00446

19. Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. Cell Tissue Res. Cell and Tissue Research; 2017;367: 551–569. doi:10.1007/s00441-016-2566-8

20. Van de Moortele T, Goerke U, Wendt CH, Coletti F. Airway morphology and inspiratory flow features in the early stages of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Clin Biomech. Elsevier; 2017; 0–1. doi:10.1016/j.clinbiomech.2017.11.005

21. Khoo J, Venning V, Wong C, Jayaram L. Bronchiectasis in the Last Five Years: New Developments. J Clin Med. 2016;5: 115. doi:10.3390/jcm5120115

22. Haak AJ, Tan Q, Tschumperlin DJ. Matrix biomechanics and dynamics in pulmonary fibrosis. Matrix Biol. International Society of Matrix Biology; 2017; doi:10.1016/j.matbio.2017.12.004

23. Ramachandraiah V, Aronow W, Chandy D. Pulmonary sarcoidosis: an update. Postgrad Med. 2017;129: 149–158. doi:10.1080/00325481.2017.1251818

24. Azarbar S, Dupuis J. Lung capillary injury and repair in left heart disease: a new target for therapy? Clin Sci (Lond). 2014;127: 65–76. doi:10.1042/CS20130296

25. Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, et al. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene Scn5a. Proc Natl Acad Sci. 2002;99: 6210–6215. doi:10.1073/pnas.082121299

26. Weiss A, Leinwand L. the Mammalian Myosin Heavy Chain Gene Family. Annu Rev Cell Dev

559 Biol. 1996;12: 417–439. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.417

560 27. Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin
561 expression in diseased myocardium. Cardiovasc Res. 2008;80: 9–19. doi:10.1093/cvr/cvn133

562 28. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma Membrane Channels
563 Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. Physiol Rev. 2003;83: 1359–1400.
564 doi:10.1152/physrev.00007.2003

565 29. Desplantez T. Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembling: Involvement of connexins epitopes
566 in formation of hemichannels and Gap junction channels. BMC Cell Biol. BMC Cell Biology;
567 2017;18: 1–13. doi:10.1186/s12860-016-0118-4

568 30. Mueller-Hoecker J, Beitinger F, Fernandez B, Bahlmann O, Assmann G, Troidl C, et al. Of
569 rodents and humans: A light microscopic and ultrastructural study on cardiomyocytes in
570 pulmonary veins. Int J Med Sci. 2008;5: 152–158.

571 31. Xiao Y, Cai X, Atkinson A, Logantha SJ, Boyett M, Dobrzynski H. Expression of connexin 43, ion
572 channels and Ca2+-handling proteins in rat pulmonary vein cardiomyocytes. Exp Ther Med.
573 2016;12: 3233–3241. doi:10.3892/etm.2016.3766

574 32. Folmsbee SS, Morales-nebreda L, Hengel J Van, Tyberghein K, Roy F Van, Budinger GRS, et al.
575 The cardiac protein alphaT-catenin contributes to chemical-induced asthma. AJP Lung Cell
576 Mol Physiol. 2015; 253–258. doi:10.1152/ajplung.00331.2014

577 33. Folmsbee SS, Budinger GRS, Bryce PJ, Gottardi CJ. The cardiomyocyte protein a T-catenin
578 contributes to asthma through regulating pulmonary vein inflammation. J Allergy Clin
579 Immunol. Elsevier Ltd; 2016;138: 123–129.e2. doi:10.1016/j.jaci.2015.11.037

580 34. Folmsbee SS, Gottardi CJ. Cardiomyocytes of the Heart and Pulmonary Veins : Novel
581 Contributors to Asthma ? Am J Respir Cell Mol Biol. 2017; 1–24.

582 35. Quignard JF, Ryckwaert F, Albat B, Nargeot J, Richard S. A novel tetrodotoxin-sensitive Na+
583 current in cultured human coronary myocytes. Circ Res. American Heart Association, Inc.;
584 1997;80: 377–82. doi:10.1161/01.RES.0000435853.85322.AF

585 36. Vohra J, Hospital RM. Diagnosis and Management of Brugada Syndrome. Hear Lung Circ.
586 2011; doi:10.1016/j.hlc.2011.07.014

587 37. Therasse D, Sacher F, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Kyndt F, et al. Value of the sodium-

588 channel blocker challenge in Brugada syndrome. Int J Cardiol. Elsevier B.V.; 2017;245: 178–
589 180. doi:10.1016/j.ijcard.2017.05.099

590 38. Hara Y, Chugun a, Nakaya H, Kondo H. Tonic block of the sodium and calcium currents by
591 ketamine in isolated guinea pig ventricular myocytes. J Vet Med Sci. 1998;60: 479–83.
592 doi:10.1292/jvms.60.479

593 39. Luo AT, Cao ZZ, Xiang Y, Zhang S, Qian CP, Fu C, et al. Ketamine attenuates the Na + -
594 dependent Ca 2+ overload in rabbit ventricular myocytes in vitro by inhibiting late Na + and L-
595 type Ca 2+ currents. Acta Pharmacol Sin. Nature Publishing Group; 2015;36: 1327–1336.
596 doi:10.1038/aps.2015.75

597 40. Wagner LE, Gingrich KJ, Kulli JC, Yang J. Ketamine Blockade of Voltage-gated Sodium
598 ChannelsEvidence for a Shared Receptor Site with Local Anesthetics. J Am Soc Anesthesiol.
599 2001;95: 1406–1413.

600 41. Ouyang W, Ph D, Hemmings HC. Isoform-selective Effects of Isoflurane on Voltage-gated Na+
601 Channels. Anesthesiology. 2007; 91–98.

602 42. Leffler A, Frank G, Kistner K, Ph D, Niedermirtl F, Koppert W, et al. Local Anesthetic-like
603 Inhibition of Voltage-gated Na+ Channels by the Partial μ-opioid Receptor Agonist
604 Buprenorphine. Anesthesiology. 2012;

605 43. Zhang Y, He J, Liu X, Zhang Y, Wang Y, Yu T. Assessment of the effect of etomidate on voltage-
606 gated sodium channels and action potentials in rat primary sensory cortex pyramidal neurons.
607 Eur J Pharmacol. Elsevier; 2014;736: 55–62. doi:10.1016/j.ejphar.2014.04.036

608 44. Wang Y, Mi J, Lu K, Lu Y, Wang K. Comparison of Gating Properties and Use-Dependent Block
609 of Nav1.5 and Nav1.7 Channels by Anti-Arrhythmics Mexiletine and Lidocaine. PLoS One.
610 2015;10: e0128653. doi:10.1371/journal.pone.0128653

611 45. Stoetzer C, Reuter S, Doll T, Foadi N, Wegner F, Leffler A. Inhibition of the cardiac Na+ channel
612 α-subunit Nav1.5 by propofol and dexmedetomidine. Naunyn Schmiedebergs Arch
613 Pharmacol. 2016;389: 315–325. doi:10.1007/s00210-015-1195-1

614 46. Derangeon M, Montnach J, Cerpa CO, Jagu B, Patin J, Toumaniantz G, et al. Transforming
615 growth factor β receptor inhibition prevents ventricular fibrosis in a mouse model of
616 progressive cardiac conduction disease. Cardiovasc Res. 2017;113: 464–474.
617 doi:10.1093/cvr/cvx026

618

# Supplementary Informations

## MATERIALS AND METHODS

### *Electrocardiography*

Mice were anesthetized for electrocardiography (ECG) recording with etomidate (25mg/kg i.p.). Body temperature was maintained at 37°C with a heating pad (Harvard Apparatus, Holliston, United States). Six-lead ECG were recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter IOX 1.585 (EMKA Technologies) for monitoring and later analyzed with ECG Auto v3.2.0.2 (EMKA Technologies). Only leads I ECGs were analyzed.

### *Cardiac function by echocardiography*

Two-dimensional (2-D) echocardiography was performed on mice using a Vivid 7 Dimension ultrasonography (GE Healthcare, Chicago, United States) with a 14-MHz transducer. Body temperature was maintained at 37°C with a heating pad (Harvard Apparatus) and ECG was monitored during acquisitions. Anesthetic induction was achieved at 4% isoflurane (Abbott Laboratories, Chicaco, USA) and anesthesia was maintained at 2.5% for recording. In order to observe a possible structural remodeling, left ventricular diameter and free wall thickness were measured from long-axis images obtained by M-mode echocardiography. Systolic function was further assessed by calculation of the ejection fractions. Transmitral flow measurements of ventricular filling velocity were obtained using pulsed Doppler, with an apical four-chamber orientation. Doppler–derived mitral deceleration time, isovolumic relaxation time, the early diastolic (E), the late diastolic (A) and the E/A ratio were obtained to assess diastolic dysfunction. To avoid bias in the analysis, experiments were performed and analyzed by investigators blinded to the genotype.

## RESULTS

**S1 Fig. $Na_V1.5$ voltage-gated sodium channel effects on heart function.** (A) Western blot detection and quantification for $Na_V1.5$ protein in total WT and $Scn5a^{+/-}$ mice heart left ventricle lysates relative to Stain free protein controls (n=5/condition). (B) Effects of $Na_V1.5$ expression on RR interval and QRS complex duration of WT and $Scn5a^{+/-}$ mice submitted to ECG lead I recordings (n=10/condition). (C) Heart and lung weights relative to body weight ratio of WT and $Scn5a^{+/-}$ mice (n=20-22/condition). (D) Representative M-mode echocardiographic images of WT and $Scn5a^{+/-}$ mice left ventricles for structural (LV diastolic diameter and LV wall thickness),

649 systolic function (Ejection fraction) and diastolic function (E/A ratio, deceleration time and
650 Isovolumic relaxation time) parameters (n=6-8/condition). Data are presented as mean ±SEM.
651 E/A: transmitral E (early) to A (late) propagation velocity; LV: Left Ventricle. ***p<0,001 ;
652 ****p<0,0001 versus WT.

653 **S2 Fig. $Na_V1.5$ voltage-gated sodium channel absence of effect on lung structural**
654 **remodelings.** Real-time RT-PCR relative quantifications of total WT and $Scn5a^{+/-}$ mice lung
655 preparations, realized with Qiagen™ Mouse Wound Healing RT2 Profiler™ Array
656 (n=5/conditions). Data are presented as mean ± SEM. FC: Fold change. ***p<0.001 ;
657 ****p<0.0001 versus WT.

658

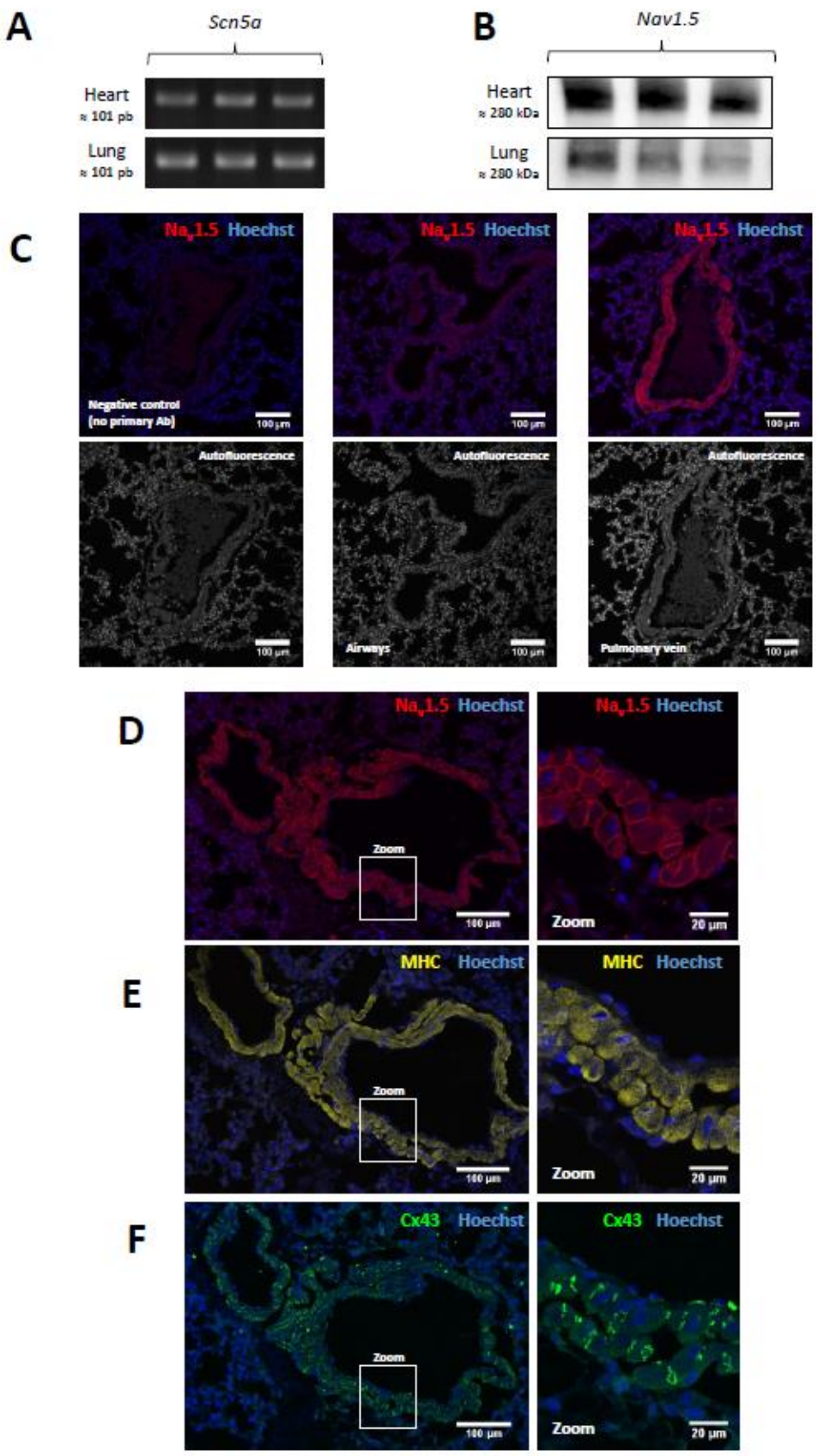


**Fig 1. Nav1.5 voltage-gated sodium channel expression in mice lungs.**

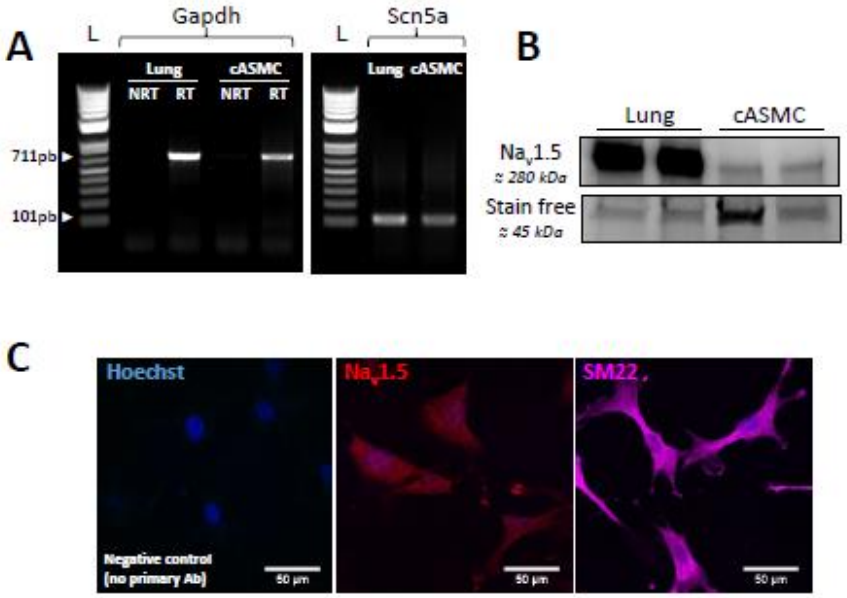


**Fig 2 : Nav1.5 voltage-gated sodium channel expression in mice cultured Airway Smooth Muscle Cells (cASMC) isolated from WT mice trachea and primary bronchi.**

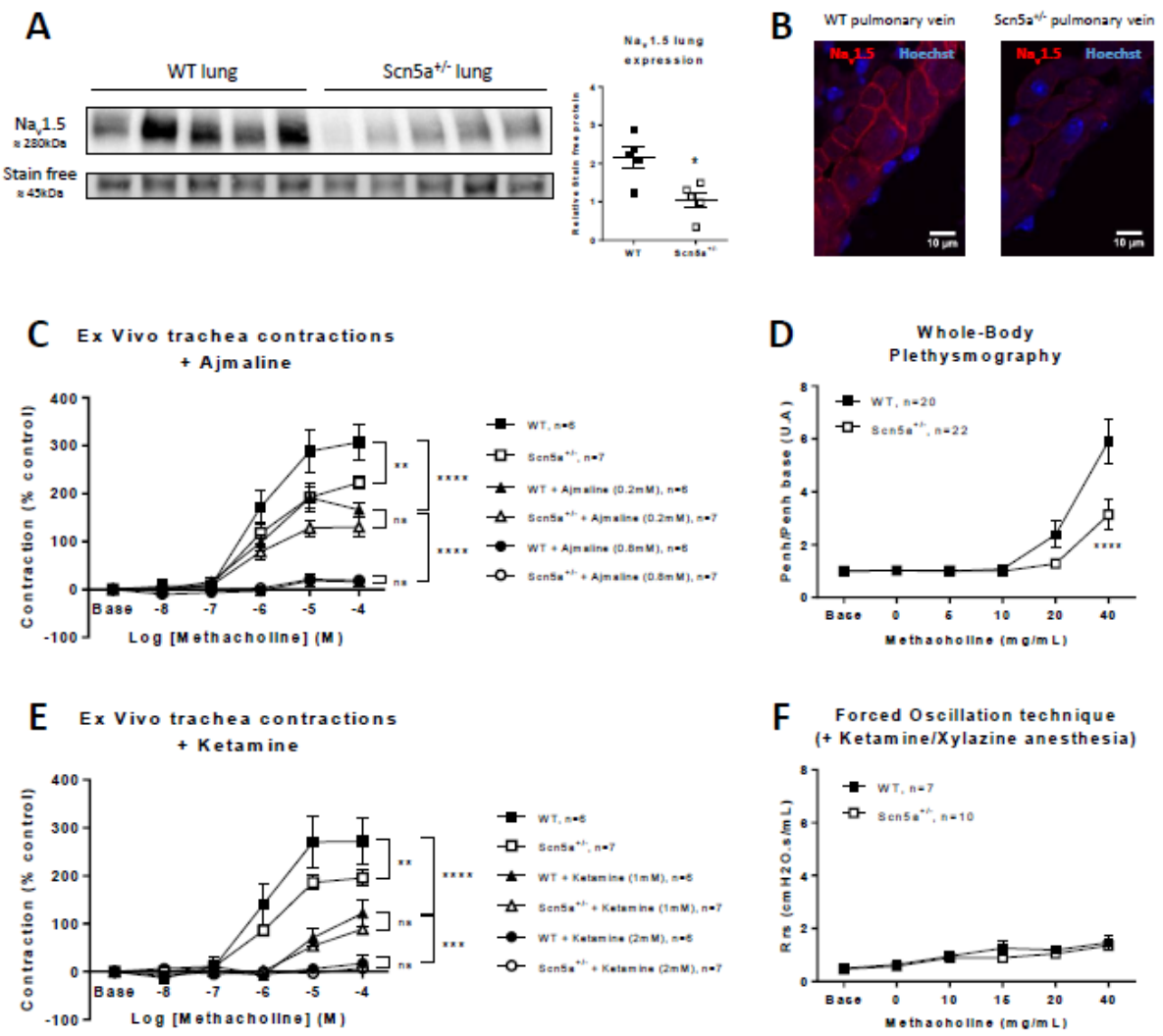


**Fig 3. Nav1.5 voltage-gated sodium channel is involved in respiratory function.**

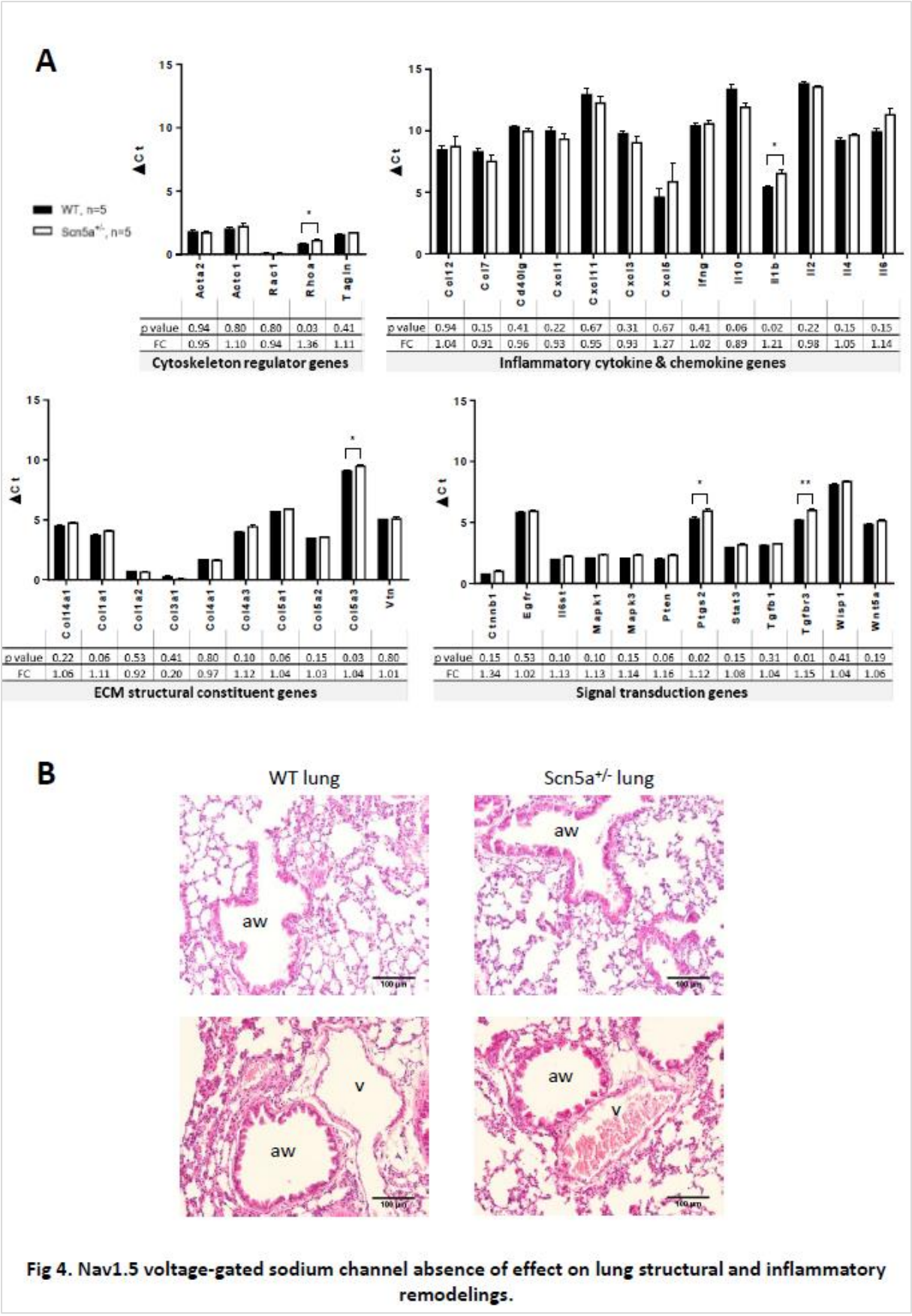


**Fig 4. Nav1.5 voltage-gated sodium channel absence of effect on lung structural and inflammatory remodelings.**

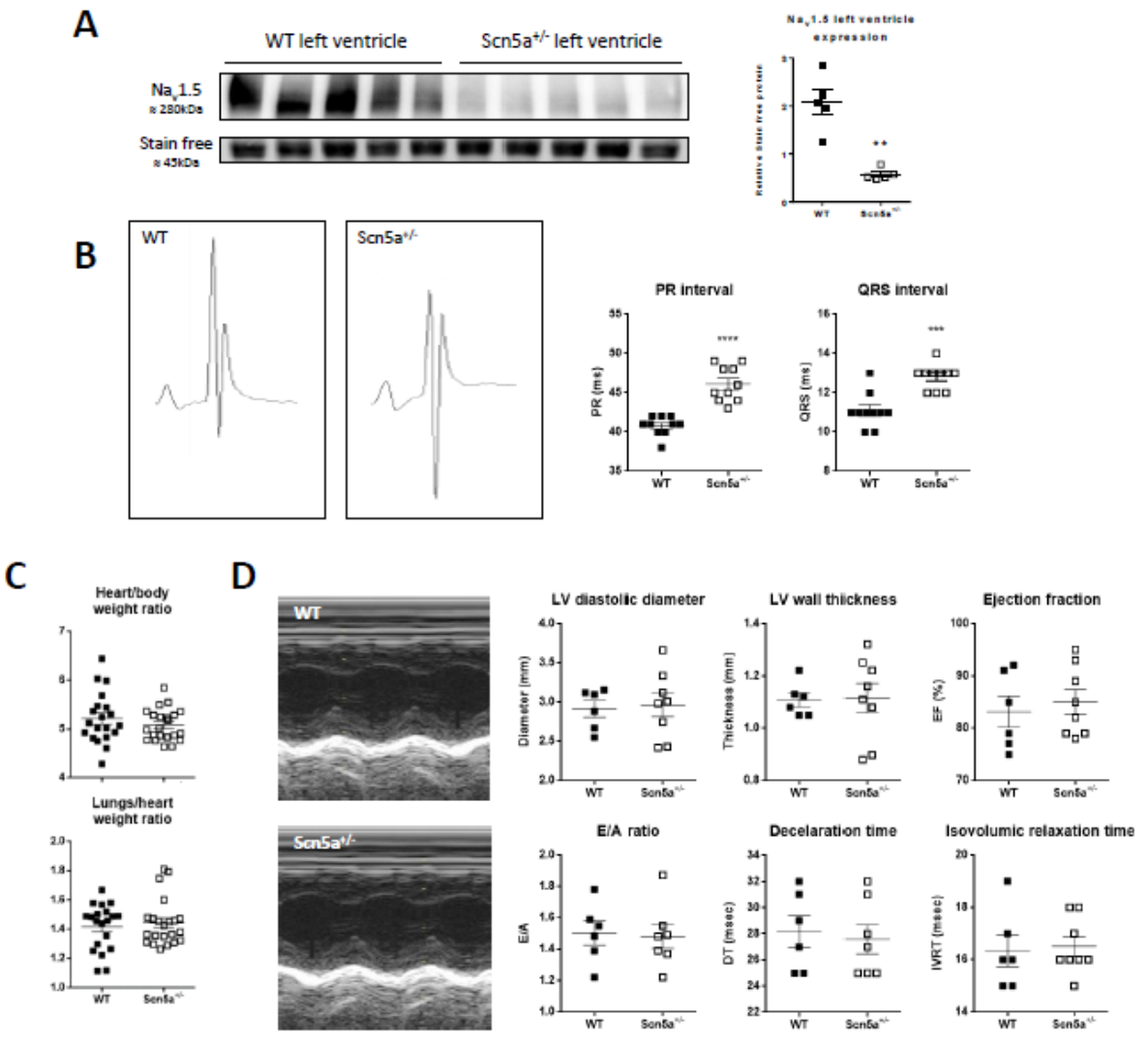


**Fig S1. Nav1.5 voltage-gated sodium channel effects on heart function.**

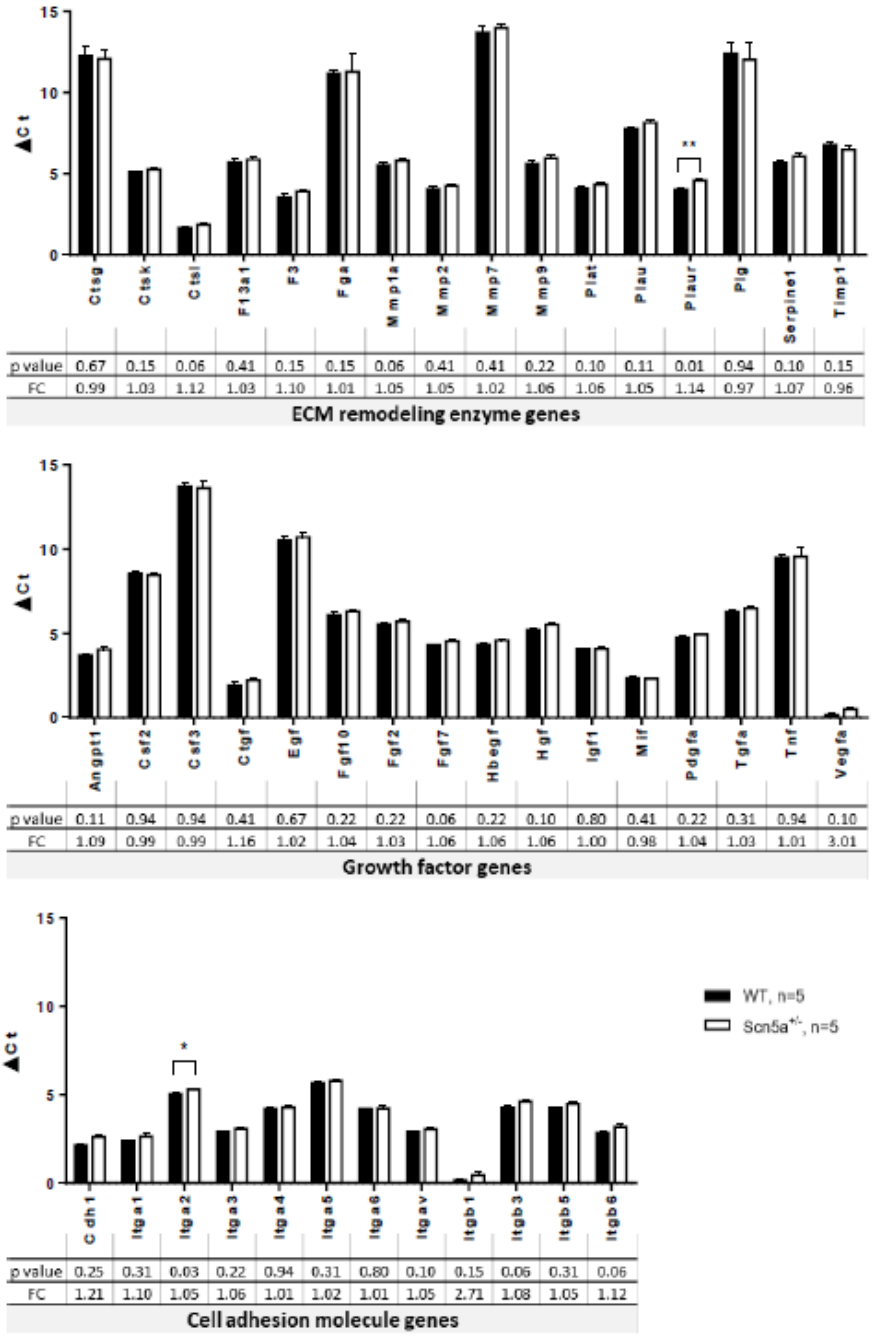


**Fig S2. Nav1.5 voltage-gated sodium channel absence of effect on lung structural remodelings.**

# II. Résultats complémentaires sur les remodelages pulmonaires.

## A. Expression pulmonaire de $Na_v1.5$ *in situ*

Pour compléter l'analyse histologique effectuée dans la Figure A1 de l'article, d'autres prises d'images ont été réalisées. On observe sur la Figure 24 l'expression importante de $Na_v1.5$ sur une vue d'ensemble du poumon, à faible grossissement. On remarque que deux types de structures expriment la protéine d'intérêt $Na_v1.5$ : les bronches et les veines pulmonaires (Figure 24A). On observe cependant que l'expression majoritaire est portée par les cellules musculaires présentes dans la paroi des veines pulmonaires, qui expriment également la TnI et la MHC3 (Figure 24B). A plus fort grossissement sur ces cellules musculaires veineuses, on observe une morphologie large pour les cellules exprimant $Na_v1.5$ (Figure 24C). On remarque également une expression organisée de la MHC3 au sein de ces

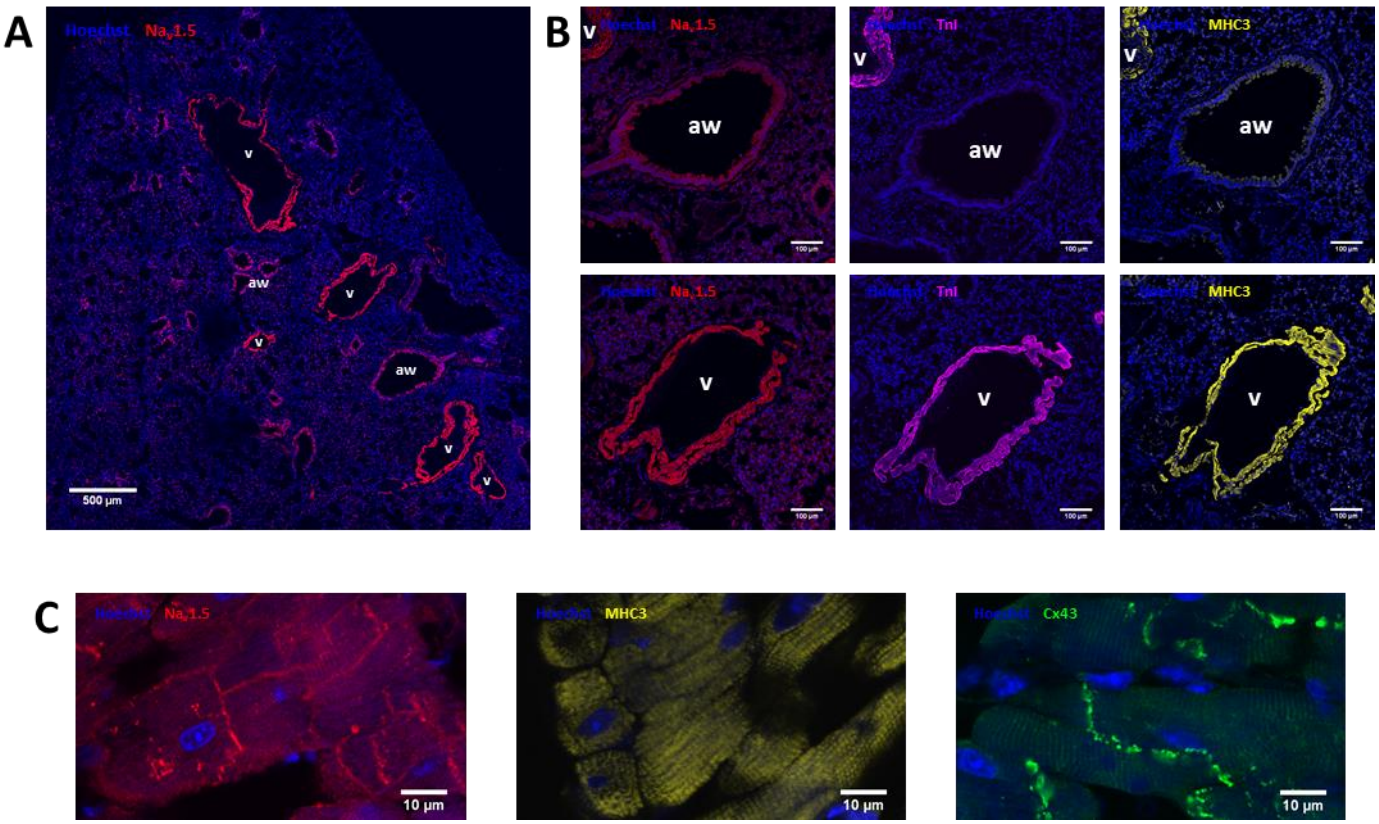


Figure 24. **Marquages immunofluorescents de coupes congelées de poumons de souris.**
(A) Vue d'ensemble d'une coupe de poumon de souris. (B) Zoom sur des bronches et des veines pulmonaires pour les marquages $Na_v1.5$, TnI et MHC3. (C) Zoom sur les cellules musculaires péri-veineuses pour les marquages $Na_v1.5$, MHC3 et Cx43. *aw* : airways ; *v* : vein.

cellules, avec l'apparition de stries par fluorescence (Figure 24C). Enfin, on voit une expression de la Cx43 au niveau de jonctions entre ces cellules mais de manière bien localisée. En effet la Cx43 n'apparait pas exprimées sur l'ensemble des membranes plasmiques au contact des cellules avoisinantes (Figure 24C).

## B. $Na_v1.5$ et remodelages pulmonaires

Les travaux présentés dans la Figure A4 puis en Figure AS2 de l'article, portant sur l'implication potentielle du canal sodique $Na_v1.5$ dans les remodelages de la sphère respiratoire, ont été complétés par d'autres analyses biochimiques. En complément des résultats transcriptomiques, les résultats obtenus par Western Blot sur des préparations issues d'échantillons de poumon entier montrent une diminution significative de l'expression de la protéine Rac1 dans les poumons de souris *Scn5a*$^{+/-}$ *versus* WT (Figure 25A) (WT=0,88±0,05 et *Scn5a*$^{+/-}$=0,66±0,04 ; n=5 ; **p<0,01 *versus* WT). Une tendance à la baisse semble également être observée pour l'expression de la forme mature de la protéine LOX (WT=0,27±0,07 et *Scn5a*$^{+/-}$=0,15±0,02 ; n=5 ; p=0,09 *versus* WT) chez les souris *Scn5a*$^{+/-}$ (Figure 25A). Aucune modification significative des profils d'expressions des protéines CTGF (WT=0,95±0,07 et *Scn5a*$^{+/-}$=0,89±0,11 ; n=5), de la forme précurseur du TGFβ (WT=0,17±0,12 et *Scn5a*$^{+/-}$=0,15±0,03 ; n=5) et de la forme active de la MMP2 (WT=0,47±0,09 et *Scn5a*$^{+/-}$ =0,36±0,04 ; n=5) n'ont été observées chez nos souris (Figure 25A).

Des colorations au rouge Picrosirius, sur des préparations histologiques de poumons de souris, ont été réalisées pour approfondir les précédentes études portant sur l'expression des différents marqueurs de remodelages structuraux et fibrotiques. La présence importante de collagène dans les poumons permet d'utiliser la coloration au rouge PicroSirius comme un colorant de structure, afin de compléter l'analyse morphologique des poumons tout en évaluant le taux de fibrose. Les résultats montrent en lumière blanche une absence de remodelage pathologique chez les souris *Scn5a*$^{+/-}$ au niveau de la zone péri-bronchiolaire. Les cellules épithéliales sont sans lésion ni hyperplasie, les couches de cellules musculaires lisses sont très fines et les zones adventitielles sont d'épaisseur physiologique que ce soit pour les souris WT comme pour les souris *Scn5a*$^{+/-}$. En lumière polarisée, les images obtenues permettant de discriminer les analyses des formes I et III du collagène ont permis leurs quantifications exclusives dans la zone péri-bronchiolaire. Les résultats comparant les souris

WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$ montrent une absence de modification du niveau d'expression de collagène I (WT=2,61±0,5 pour n=16 et *Scn5a*$^{+/-}$=3,73±1,86 pour n=6) et de collagène III (WT=2,21±0,36 pour n=16 et *Scn5a*$^{+/-}$=2,92±1,38 pour n=6) autour des bronchioles. (Figure 25B).

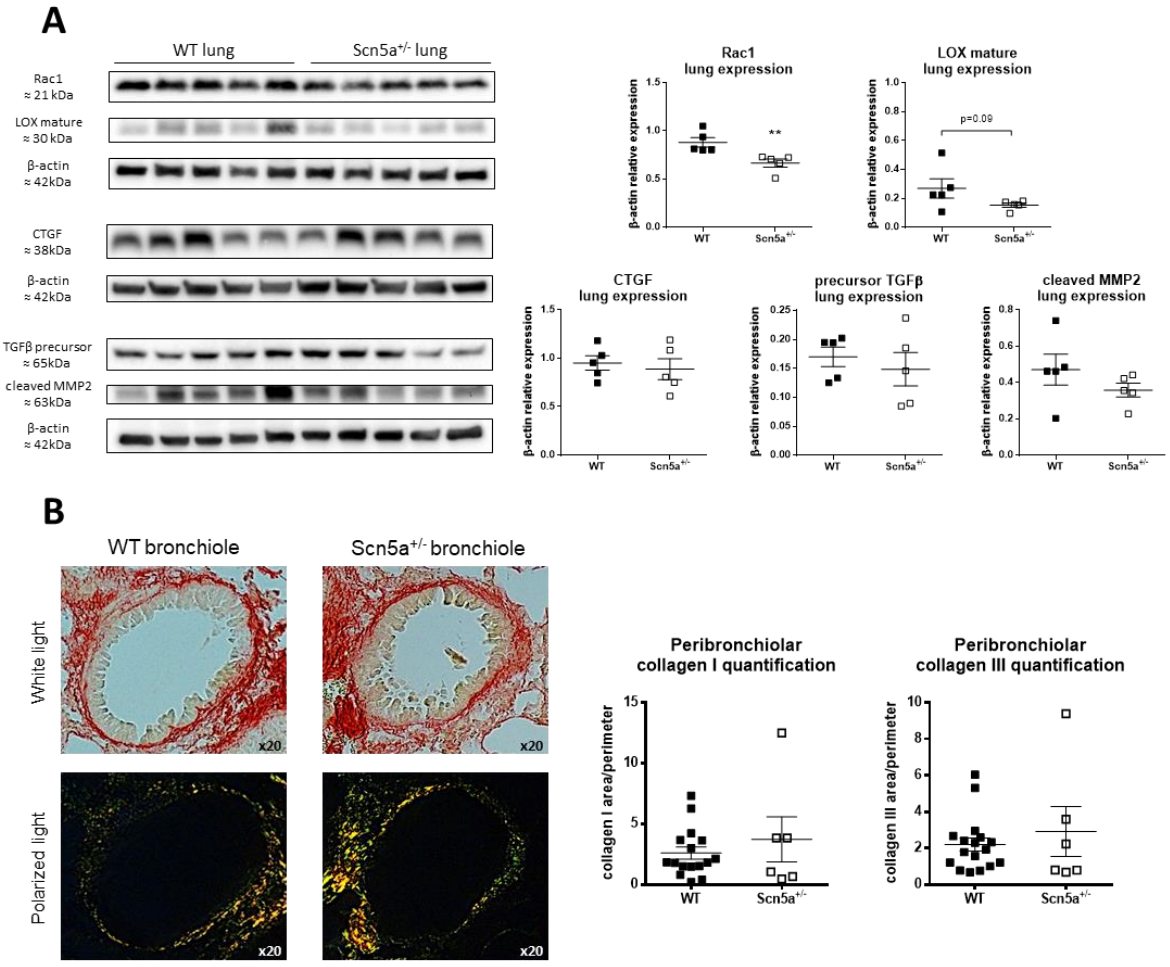


Figure 25. **Absence d'effet de l'expression de $Na_v1.5$ sur les remodelages pulmonaires en conditions physiologiques chez les souris femelles.**
(A) Détections et quantifications relatives de l'expression de protéines impliquées dans la fibrose et l'inflammation dans des préparations de poumon entier de souris WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$ (n=5/condition). (B) Détections et quantifications des collagènes I et III sur des coupes de poumons colorées au rouge Picro Sirius (n=6-16/condition). Les résultats sont représentés par la moyenne ±SEM. **p<0,01 *versus* WT.

## C. Le modèle murin C57BL/6J *Scn5a*$^{+/-}$ : mise en évidence d'une différence d'expression de l'invalidation génique en fonction du sexe.

Dans le modèle murin *Scn5a*$^{+/-}$ mâle, on observe par Western Blot des signaux positifs pour $Na_v1.5$ dans les cœurs mais avec une hétérogénéité importante des intensités détectées, que ce soit pour les préparations de ventricule gauche de souris WT comme *Scn5a*$^{+/-}$ (Figure 26A), contrairement au modèle femelle présenté dans la Figure AS1 de l'article présenté en amont (Fonteneau et al., en révision). Les résultats de quantifications de ces signaux, conformément aux observations formulées précédemment, ne permettent pas de mettre en évidence une différence de niveau d'expression du canal sodique $Na_v1.5$ entre le groupe WT et *Scn5a*$^{+/-}$ (WT=1,3±0,19 et *Scn5a*$^{+/-}$=1,2±0,2 ; n=5) (Figure 26A)

Cette différence d'expression de $Na_v1.5$ au niveau protéique est confirmée au niveau fonctionnel. Les évaluations par ECG des souris mâles montrent effectivement qu'il n'y a aucun ralentissement de la conduction cardiaque dans le groupe *Scn5a*$^{+/-}$ comparé au groupe WT : les intervalles moyens PR (WT=40,90±0,57 and *Scn5a*$^{+/-}$=40,30±1,83ms) et QRS (WT=11±0,30 and *Scn5a*$^{+/-}$=11,10±0,23ms) sont similaires entre les deux conditions (Figure 26B).

Comme chez les femelles, aucun remodelage majeur n'est détecté par les calculs des ratios poids du cœur/poids du corps (WT=5,0±0,1 pour n=21 et *Scn5a*$^{+/-}$=5,1±0,1 pour n=20) (Figure 26C) et poids des poumons/poids du cœur (WT=1,2±0,03 pour n=20 et *Scn5a*$^{+/-}$ =1,1±0,02 pour n=20) (Figure 26C). Les évaluations structurales et fonctionnelles par échocardiographie ne montrent pas non plus de remodelage ventriculaire gauche (diamètre télédiastolique du ventricule gauche : WT=2,9±0,2mm pour n=9 et *Scn5a*$^{+/-}$=2,9±0,1mm pour n=11 ; épaisseur de paroi libre du ventricule gauche : WT=1,0±0,05mm pour n=9 et *Scn5a*$^{+/-}$ =1,2±0,05mm pour n=11), ni de dysfonction systolique (fraction d'éjection : WT=82,8±2,0% pour n=9 et *Scn5a*$^{+/-}$=85,6±1,6% pour n=11) ou diastolique (E/A : WT=1,5±0,06 pour n=9 et *Scn5a*$^{+/-}$=1,5±0,05 pour n=11 ; temps de décélération : WT=25,7±1,2ms pour n=9 et *Scn5a*$^{+/-}$ =26,5±1,4ms pour n=11 ; temps de relaxation isovolumétrique : WT=16,4±0,4ms pour n=9 et *Scn5a*$^{+/-}$=16,0±0,3ms pour n=11) (Figure 26D).

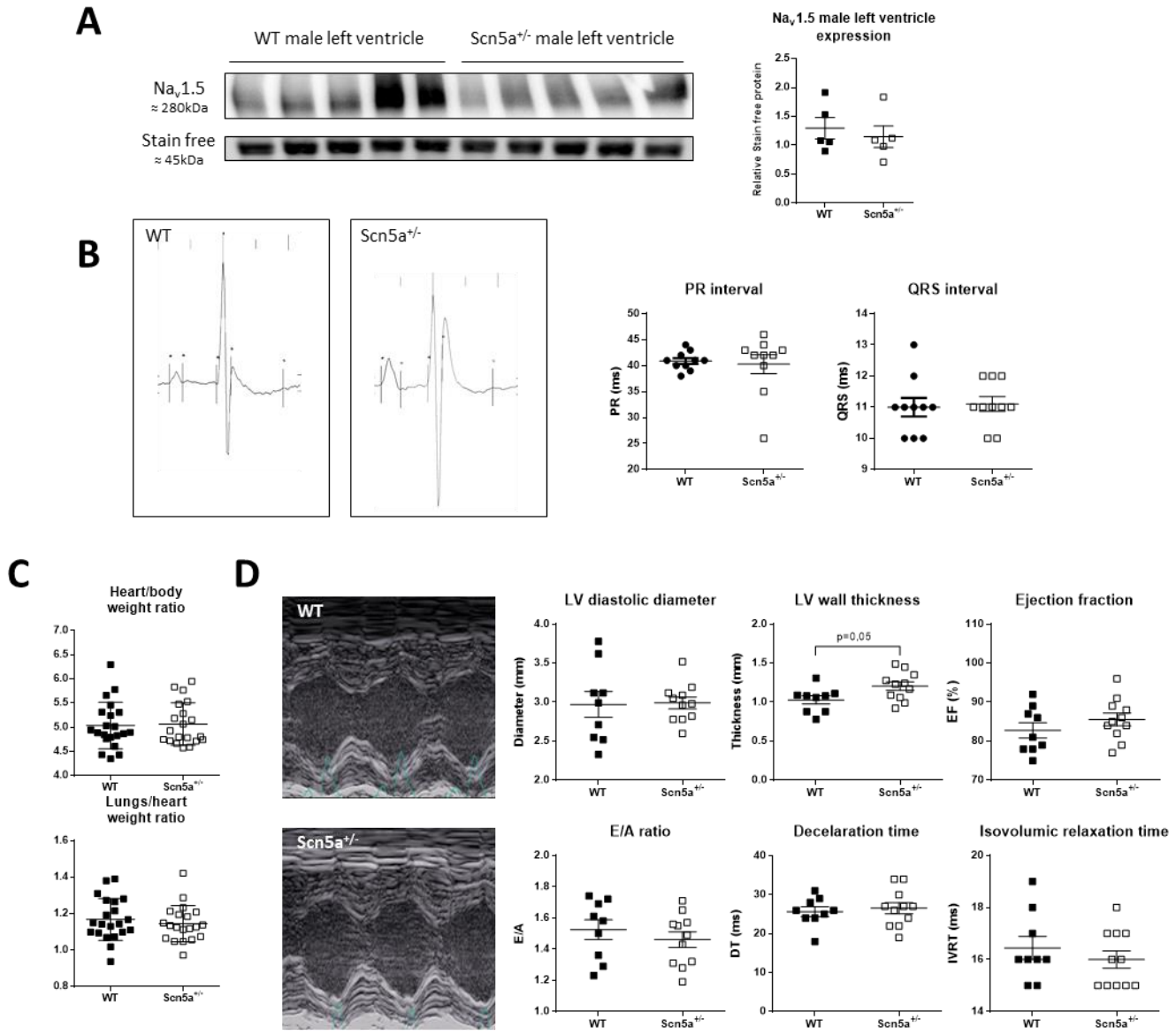


Figure 26. **Absence de modulation de la fonction cardiaque chez les souris mâles du modèle C57BL/6J *Scn5a*$^{+/-}$.**

(A) Détections et quantifications relatives de l'expression de la protéine $Na_v1.5$ dans des préparations de ventricule gauche de souris mâles WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$ (n=5/condition). (B) Effets de l'expression de $Na_v1.5$ sur les durées de l'intervalle RR et du complexe QRS chez des souris mâles WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$ enregistrées par ECG en dérivation DI (n=10/condition). (C) Poids des cœurs et poumons rapportés au poids des souris mâles WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$ (n=20-21/condition). (D) Images représentatives des enregistrements échocardiographiques en mode TM des ventricules gauches de souris mâles WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$. Les mesures des paramètres structuraux (diamètre télédiastolique et épaisseur de paroi du LV), de fonction systolique (fraction d'éjection) et de fonction diastolique (ratio E/A, temps de décélération et temps de relaxation isovolumique) sont présentées à droite (n=9-11/condition). Les résultats sont représentés par la moyenne ±SEM. (*E/A*: vitesse de propagation du flux transmitral E (passif) sur A (actif); *LV*: ventricule gauche).

Au niveau pulmonaire, les Western Blot réalisés sur des préparations de poumons totaux de souris mâles montrent une expression de $Na_v1.5$ dans cet organe comme chez les femelles. En revanche, chez les souris *Scn5a*$^{+/-}$ mâles, l'expression de $Na_v1.5$ est hétérogène et le niveau d'expression moyen apparaît similaire au groupe WT. Les résultats de quantification de ces signaux le confirment (WT=0,38±0,06 et *Scn5a*$^{+/-}$=0,26±0,06 ; n=5 ; p=0,31 *versus* WT) (Figure 27A). Pour vérifier que ces observations au niveau fonctionnel, nous avons également réalisé des expériences de contractilité *ex vivo* de trachées de souris dans des cuves à organe isolé. Les résultats obtenus ne montrent pas de différence de contractilité des trachées isolées, ni par exposition à des doses croissantes de méthacholine (WT=225±25% pour n=5 et *Scn5a*$^{+/-}$=223±23% pour n=8), ni après inhibition de cette contraction par des pré-incubations avec des doses croissantes d'ajmaline qui est un anti-arythmique de classe I, inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendants (dose 0,2mM d'ajmaline : WT=143±26%

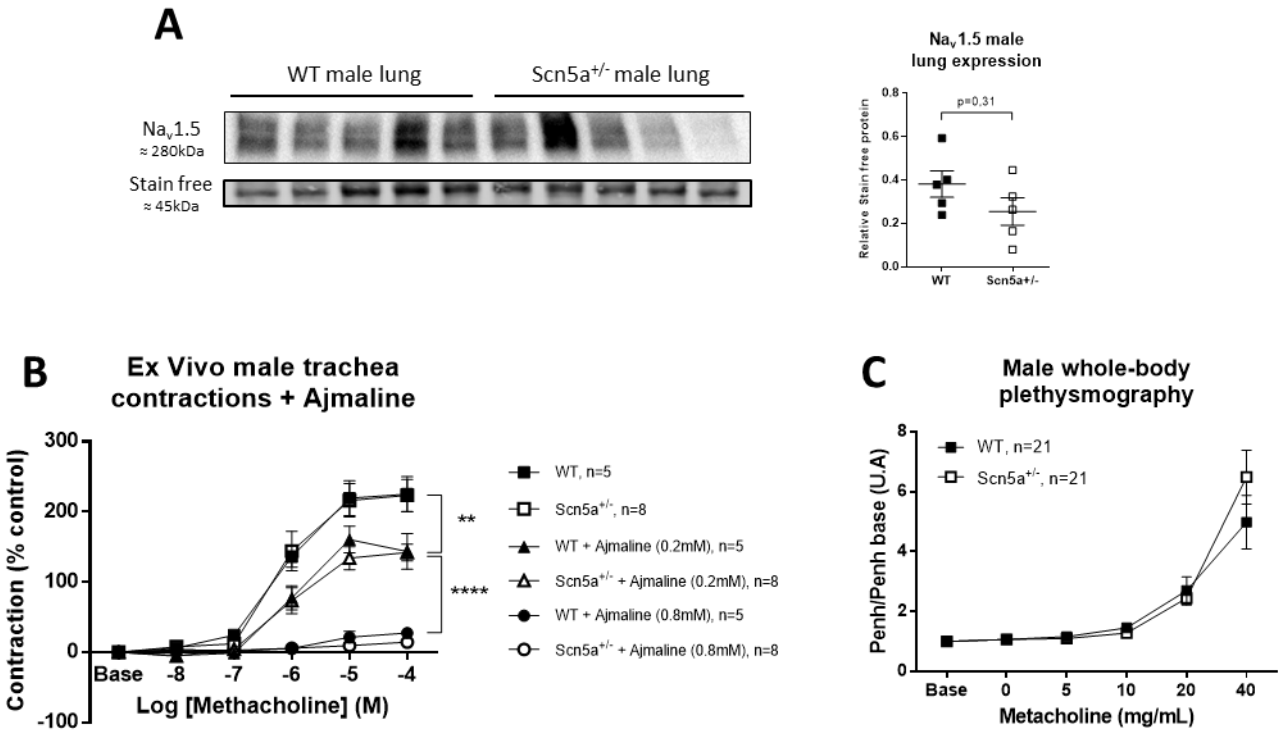


Figure 27. **Absence de modulation de la fonction respiratoire chez les souris mâles du modèle C57BL/6J *Scn5a*$^{+/-}$.**
(A) Détections et quantifications relatives de l'expression de la protéine $Na_v1.5$ dans des préparations de poumon de souris mâles WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$ (n=5/condition). (B) Contractions *Ex vivo* de trachées isolées de souris mâles WT et *Scn5a*$^{+/-}$ exposées à des doses croissantes de méthacholine, avant et après incubation avec l'ajmaline. (C) Pléthysmographie corporelle totale, mesurant la réactivité du système respiratoire exposé à des doses croissantes de méthacholine, de souris mâles WT et *Scn5a*$^{+/-}$. Les résultats sont représentés par la moyenne ±SEM. ***p*<0,01 ; *****p*<0,0001.

et *Scn5a*$^{+/-}$=142±12% ; dose 0,8mM d'ajmaline : WT=27±3% pour n=5 et *Scn5a*$^{+/-}$=14±4% pour n=8) (Figure 27B). Après les tests fonctionnels *ex vivo*, des expériences fonctionnelles *in vivo* par pléthysmographie corporelle totale ont également été réalisées chez les souris mâles. Encore une fois, les résultats obtenus montrent une absence de différence fonctionnelle au niveau de la réactivité du système respiratoire entre les souris WT et *Scn5a*$^{+/-}$ exposées à des doses croissantes de méthacholine (dose 40mg/mL de méthacholine : WT=5,0±0,9 pour n=21 et *Scn5a*$^{+/-}$=6,5±0,9 pour n=21) (Figure 27C).

## D. $Na_v1.5$ et réaction immunitaire pulmonaire

Les analyses transcriptomiques présentés dans la Figure A4 puis en Figure AS2 de l'article précédent (Fonteneau et al., en révision) étudient également l'expression de marqueurs de l'inflammation. Ces résultats, obtenus chez les souris femelles, ont été complétés par une approche biochimique. Les lymphocytes T étant une population cellulaire clé de la réaction immunitaire pathologique dans les poumons, ces cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Une sélection des cellules est dans un premier temps effectuée au niveau morphologique, les lymphocytes T étant une population cellulaire de taille moyenne et de granulosité moyenne (Figure 28A). Après avoir exclu les doublons de comptage par la linéarité en deux dimensions des tailles de cellules, les résultats préliminaires obtenus pour les lymphocytes T $CD3^+$ $CD4^+$ montrent que la majorité d'entre eux retrouvés chez la souris expriment le canal sodique $Na_v1.5$ (Figure 28A). D'après les résultats de quantification des signaux de fluorescence émis par ces cellules par cytométrie en flux, les lymphocytes T de souris WT et *Scn5a*$^{+/-}$ expriment un taux de $Na_v1.5$ statistiquement similaire (WT=1189±277,0 et *Scn5a*$^{+/-}$=760±116,5 ; n=2 ; p=0,33 *versus* WT) (Figure 28B). La quantification montre également que le taux de lymphocytes exprimant $Na_v1.5$ chez ces souris est similaire (WT=81,9±1,6% et *Scn5a*$^{+/-}$=67,4±4,1% ; n=2 ; p=0,33 *versus* WT) (Figure 28B). L'observation au microscope de ces signaux fluorescents confirme l'expression du canal sodique $Na_v1.5$ par les lymphocytes T de souris. Ce signal positif pour $Na_v1.5$ est localisé de manière dispersée et sous forme de multiples amas à la membrane plasmique des cellules (Figure 28C). Cependant, les acquisitions au microscope ne permettent pas non plus de mettre en évidence de différence de profil d'expression du canal sodique $Na_v1.5$ à la membrane des lymphocytes T (Figure 28C). Enfin, l'étude préliminaire de l'implication de $Na_v1.5$ dans l'inflammation dans un contexte pathologique a été évaluée par la mise en place chez les souris transgéniques d'un

modèle d'asthme allergique HDM. Les résultats préliminaires obtenus par flexiVent ne montrent pas de modification de la résistance des voies respiratoires chez les souris *Scn5a*$^{+/-}$ *versus* WT ni dans la condition contrôle DP (dose 40mg/mL de méthacholine :

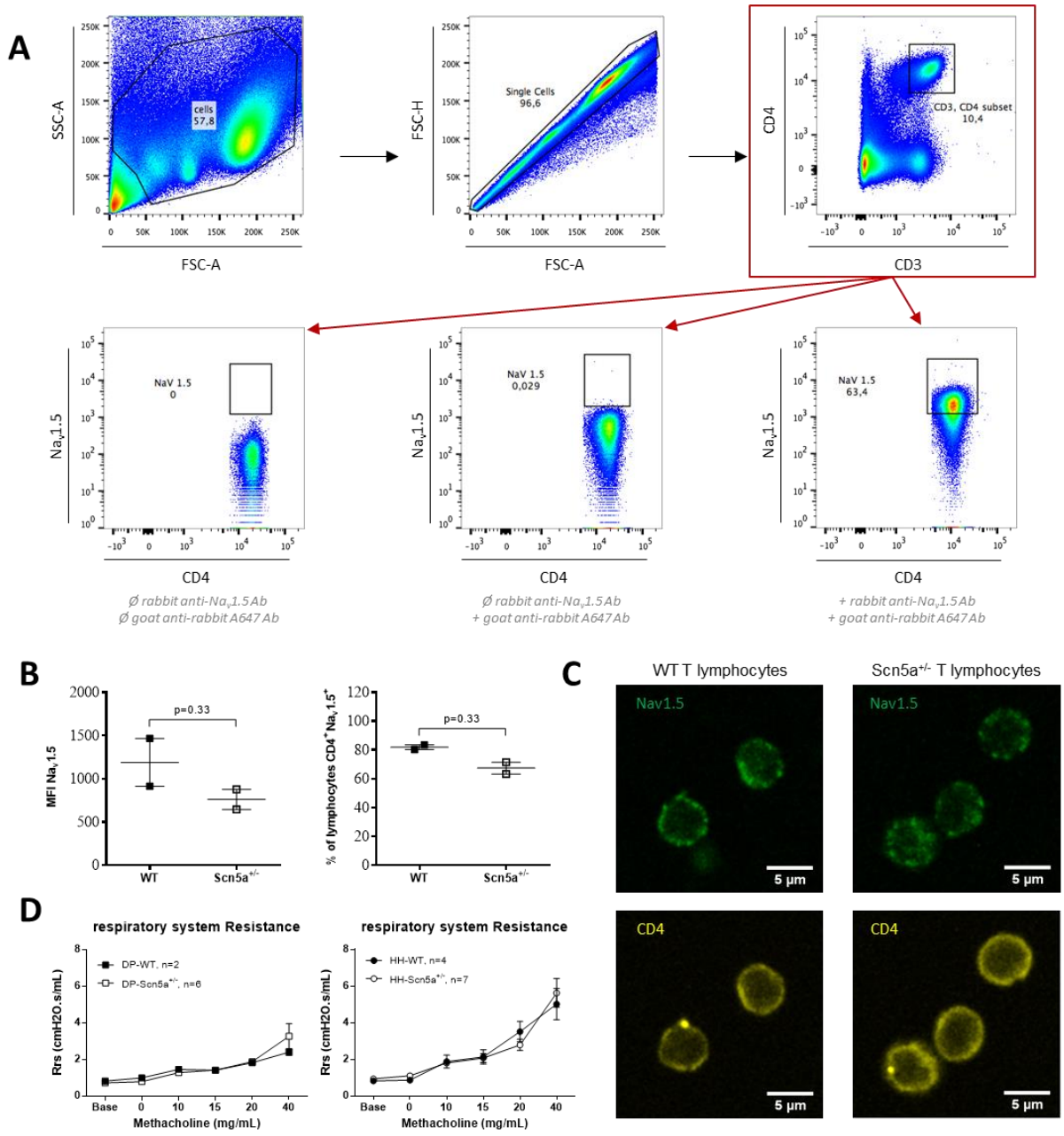


Figure 28. **Expression de $Na_v1.5$ dans l'inflammation chez les souris femelles.**
(A) Identification par cytométrie en flux des cellules $Na_v1.5^+$ parmis les cellules $CD3^+$ et $CD4^+$ issues de préparations de rate de souris. (B) Quantification par cytométrie de la fluorescence moyenne émise et du pourcentage de lymphocytes $CD4^+$ $Na_v1.5^+$ (n=2/condition). (C) Détection par immunofluorescence de $Na_v1.5$ et CD4 sur des lymphocytes T de rate de souris WT et *Scn5a*$^{+/-}$ (n=2/condition). (D) Mesure de la capacité inspiratoire et de la résistance des voies aériennes exposées à des doses croissantes de méthacholine dans un modèle d'asthme-HDM développé sur des souris WT et *Scn5a*$^{+/-}$ (n=2-7/conditions). Les résultats sont représentés par la moyenne ±SEM. (*DP* : condition contrôle DMSO/PBS; *FSC* : Forward Scatter, paramètre de taille; *HH*: condition asthmatique HDM; *ns* : non significatif; *SSC*: Side Scatter, paramètre de granulosité).

WT=2,39±0,17cmH2O.s/mL pour n=2 et *Scn5a*$^{+/-}$=3,26±0,69cmH2O.s/mL pour n=6), ni en condition pathologique HH (dose 40mg/mL de méthacholine : WT=5,03±0,85cmH2O.s/mL pour n=4 et *Scn5a*$^{+/-}$=5,63±0,79cmH2O.s/mL pour n=7) (Figure 28D).

# DISCUSSION GENERALE

## I. $Na_v1.5$ est exprimé dans les cellules musculaires lisses des voies aériennes.

Dans les expériences de RT-PCR, l'ARNm codant pour $Na_v1.5$ a été détecté dans tous les échantillons de poumons testés (Figure A1A). L'ARNm codant pour $Na_v1.5$ avait auparavant été décrit dans la littérature comme étant exprimé dans des cellules musculaires lisses vasculaires humaines en culture (Firth et al., 2011; Platoshyn et al., 2005) ainsi que dans les cellules musculaires lisses isolées de bronches de lapin (Bradley et al., 2013). Par nos résultats, cette expression est ici pour la première fois confirmée à l'échelle de l'organe entier chez un mammifère. Dans la littérature, à l'échelle moléculaire seule cette démonstration de l'expression de l'ARNm prouve indirectement la présence de $Na_v1.5$ dans les poumons (Bradley et al., 2013; Firth et al., 2011; Platoshyn et al., 2005). Pour compléter ce premier résultat, nous avons ensuite confirmé de manière directe l'expression de $Na_v1.5$ au niveau protéique par Western Blot (Figure A1B). La protéine y est détectée de la même façon dans le cœur, validant ainsi l'efficacité de notre anticorps.

Une fois cette expression pulmonaire de $Na_v1.5$ mise en évidence, il nous restait à identifier les différents sites d'expression potentiels. Dans cette optique, le choix d'une détection de ce canal sur coupes de tissus par immunofluorescence nous a semblé être la meilleure stratégie. Notre volonté était de pouvoir explorer pour la première fois toutes les structures et tous les types cellulaires potentiellement concernés par cette expression de $Na_v1.5$ dans les poumons chez la souris. D'après les précédentes études de nos confrères sur des modèles cellulaires, nous avons voulu vérifier que ces expressions étaient retrouvées chez la souris *in situ*, dans les cellules musculaires lisses des voies aériennes et des vaisseaux.

Premièrement, bien que la couche de cellules musculaires lisses autour des bronches soit suffisamment épaisse sur des coupes de poumons de souris pour être exploitée, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence de manière incontestable une expression de $Na_v1.5$ dans ces cellules *in situ*. Dans une étude réalisée chez le lapin (Bradley et al., 2013), il a été démontré une expression de l'ARNm codant pour ce canal dans ces cellules musculaires lisses

isolées autour de bronches secondaires de tous calibres. De plus des investigations électrophysiologiques ont permis de mettre en évidence la présence d'un courant sodique voltage dépendant rapide, de sensibilité intermédiaire à l'inhibition par la TTX, et ayant des propriétés électriques similaires à celles des lignées cellulaires humaines HEK 293 exprimant le canal sodique $Na_v1.5$. Nos analyses histologiques sur ces cellules, *in situ* chez la souris, montrent une intensité de signal enregistrée pour $Na_v1.5$ très faible puisqu'elle est à peine plus élevée que le signal de bruit de fond enregistré pour le contrôle négatif. Ce signal est particulièrement diffus dans les cellules musculaires lisses de bronches et il est également observé sur la couche de cellules épithéliales, ce qui interroge sur la spécificité de ce signal diffus (Figure A1C). Pourtant en étudiant les cellules musculaires lisses de voies aériennes après isolement et mise en culture, nous avons pu mettre en évidence les expressions de l'ARNm du gène *Scn5a* et de la protéine $Na_v1.5$. Cette expression au niveau protéique est confirmée par immunocytochimie. Toutefois l'expression de $Na_v1.5$ dans ces cellules est localisée au niveau cytoplasmique et non à la membrane plasmique, ce qui peut paraître surprenant du fait de l'activité électrique de ce canal attendue et démontrée par Bradley et ses collaborateurs chez le lapin (Bradley et al., 2013). Plusieurs hypothèses sont à envisager pour expliquer ces résultats différentiels entre le lapin et la souris. Premièrement, il est fort possible que la technique d'immunofluorescence sur tissus soit moins sensible que l'immunofluorescence sur cellules. La difficulté étant plus grande sur tissus à disposer d'épitopes de reconnaissance libérés de toutes contraintes physico-chimiques dues à un environnement biologique plus dense. Cette hypothèse pourrait expliquer une absence de signal net pour $Na_v1.5$ sur tissu contrairement à une expression évidente sur cellules. Un autre aspect technique peut être remis en question. Dans l'étude réalisée chez le lapin, l'expression de $Na_v1.5$ est montrée indirectement, par biologie moléculaire puis par électrophysiologie. Or dans notre étude réalisée chez la souris, la démonstration de l'expression de la protéine se fait de manière plus directe par immunodétection, ce qui rend l'interprétation de la comparaison plus délicate. Enfin, il faut prendre en compte les biais de comparaison entre modèles : il s'agit de comparer deux espèces différentes, mais également des cellules différentes. En effet les cellules musculaires lisses de voies respiratoires étudiées que nous sommes en train de comparer proviennent de lapin, isolées à partir de bronches secondaires dans les travaux de Bradley et son équipe, et de souris 1) *in situ* puis 2) isolées et mises en culture à partir de trachée et de bronches principales dans nos travaux. L'ensemble de ces

éléments discutables pourraient expliquer la concordance imparfaite entre les résultats obtenus chez le lapin et les nôtres obtenus chez la souris. Néanmoins, notre travail n'exclut absolument pas la possibilité d'une expression de $Na_v1.5$ dans la couche musculaire lisse des voies respiratoires de souris, et donc d'une potentielle implication fonctionnelle à étudier. L'expression cytoplasmique et non membranaire de $Na_v1.5$, observée chez la souris dans les cellules musculaires lisses de voies respiratoires, pourrait par ailleurs s'expliquer par la mise en culture des cellules isolées. En effet, en 2004 des travaux menés sur des cellules musculaires lisses des bronches humaines mises en culture montrent une expression faible de l'ARNm *Scn5a*, expression qui ne semble d'ailleurs pas fonctionnelle d'après les enregistrements électrophysiologiques des courants sodiques effectués, qui sont sensibles à la TTX (Jo et al., 2004). La piste d'une modification du profil d'expression protéique provoquée par la mise en culture cellulaire, même après un seul repiquage, ne peut donc être exclue.

## I. $Na_v1.5$ est majoritairement exprimé à la membrane plasmique des « cardiomyocytes » veineux dans les poumons.

La Figure A1 de notre article nous montre un autre résultat étonnant (Fonteneau et al., en révision). Au niveau vasculaire, un signal évident est démontré, positif pour $Na_v1.5$. Un marquage intense et net est observé, bien défini, localisé à la membrane plasmique d'épaisses cellules bordant la paroi des veines pulmonaires. On remarque cependant que le marquage positif pour $Na_v1.5$ est observé sur des cellules morphologiquement surprenantes dans un tissu comme le poumon. Ces cellules sont particulièrement larges et forment des couches cellulaires *a priori* trop épaisses pour correspondre à des cellules musculaires lisses de vaisseaux. Les réalisations de différents immunomarquages nous ont permis d'identifier ces structures et ces cellules. Le profil d'expression de la SM22, protéine exprimée uniquement dans les cellules musculaires lisses, nous a permis de discriminer les artères et les veines. Les résultats obtenus nous montrent que parmi tous les vaisseaux identifiés seules les artères présentent une couche relativement épaisse de cellules musculaires lisses, positives pour le signal SM22. Les autres vaisseaux sont ceux exprimant $Na_v1.5$, c'est-à-dire les veines (Figure 24). Dans ces structures veineuses les cellules exprimant $Na_v1.5$ à leur membrane plasmique

sont, comme expliqué précédemment, des cellules larges et organisées en couches cellulaires épaisses. L'hypothèse formulée alors fut donc d'être plutôt en présence de cellules musculaires de type striées, de phénotype cardiomyocytaire. En effet, d'autres études ont auparavant démontré la présence d'un myocarde pulmonaire chez différentes espèces de mammifères : chez l'homme (Haïssaguerre et al., 1998; Namekata, Tsuneoka, & Tanaka, 2013), le chien (Ehrlich et al., 2003; Melnyk et al., 2005), le lapin (Lu et al., 2013), le rat (Michelakis et al., 2001; Xiao et al., 2016) et la souris (Tsuneoka et al., 2012). La répartition de ce « myocarde » le long du système veineux pulmonaire diffère selon les espèces. Il est retrouvé uniquement le long des veines de gros diamètre proches du cœur chez l'Homme, tandis que chez le rongeur il est décrit plus profondément dans le poumon, autour de veines indépendamment du calibre (Mueller-Hoecker et al., 2008). De plus, dans toutes ces espèces, il a été décrit dans le myocarde des veines pulmonaires une activité électrique autonome, associée aux expressions de différentes protéines cardiaques. Xiao et ses collaborateurs en 2016 dans une étude réalisée chez le rat, montrent par immunohistochimie que les cardiomyocytes de veines pulmonaires expriment les jonctions communicantes Cx43 ainsi que les canaux sodique $Na_v1.5$ et potassique Kir2.1, tous deux impliqués respectivement dans les potentiels d'action et de repos dans le cœur (Xiao et al., 2016). Les protéines Serca2a, et RYR2, spécifiques des cellules musculaires striés et cardiaques y sont également exprimés, suggérant le recrutement des voies de signalisation calcique dans ces cellules similaire à celui retrouvé dans le cœur. Enfin, il est également démontré dans cette étude l'expression de la Cav3 par ces cardiomyocytes de veines pulmonaires de rat, isoforme d'une protéine d'arrimage et d'organisation à la membrane plasmique essentielle dans le cœur. Cette dernière est partenaire de nombreuses protéines impliquées dans l'activité contractile cardiaque dont la Cx43 citée précédemment (Xiao et al., 2016). Enfin, chez la souris, Folmsbee et ses collaborateurs en 2016 ont montré que ces cardiomyocytes veineux expriment également la desmine, protéine des filaments intermédiaires et l'α-T-caténine, protéine de jonction inter-cellulaire abondamment exprimée dans le cœur au niveau des disques intercalaires (Folmsbee et al., 2015; Goossens et al., 2007). Dans nos travaux, nous avons montré que les cellules pulmonaires péri-veineuses chez la souris exprimant $Na_v1.5$ (Figure A1D) à leur membrane plasmique exprimaient également la MHC3 (Figure A1E et Figure 24B), isoforme de la chaîne lourde de myosine exprimée dans les muscles striés squelettique et cardiaque (Rutland et al., 2011; Schiaffino et al., 2015). De plus ces cellules expriment également la TnI, sous-unité

inhibitrice de l'interaction actine/myosine du complexe troponine lié aux filaments d'actine dans les muscles striés (Figure 24B). Sur des zooms optiques réalisés pour les marquages de la MHC3, des bandes nettes à l'intérieur des cellules correspondant à la présence de sarcomères striés sont clairement observées (Figure 24C). De la même façon que chez le rat (Xiao et al., 2016), la Cx43 est retrouvée dans les poumons chez la souris sur ces cellules exprimant $Na_v1.5$ (Figure 24C). Cette dernière n'est pas exprimée sur les membranes latérales mais plutôt du côté des jonctions inter-cellulaires, formant des zones de contact similaires aux disques intercalaires retrouvés dans le cœur (Manring et al., 2018). Pour l'expression de $Na_v1.5$, on observe une expression de la protéine tout le long de la membrane plasmique des cardiomyocytes veineux pulmonaires, avec une concentration plus forte au niveau de ces structures ressemblant à des disques intercalaires (Figure A1 et Figure 24C).

L'ensemble de ces éléments nous permet de déduire que l'expression majoritaire de $Na_v1.5$ dans les poumons chez la souris est portée, d'après nos analyses immunohistochimiques, par des cellules musculaires striées de type cardiomyocytaire présentes en périphérie de l'ensemble du système veineux. L'expression de protéines contractiles majoritairement cardiaques dans ces cellules, associée à la colocalisation à la membrane de $Na_v1.5$ et de la Cx43 au niveau de disques intercalaires, suggère la présence d'une conduction électrique dans ces cellules. Toutefois, ces cardiomyocytes pulmonaires sont totalement absents au niveau des veinules et des capillaires, suggérant que $Na_v1.5$ n'intervient pas dans les échanges respiratoires.

## II. L'activité électrique de $Na_v1.5$ dans les poumons est nécessaire à la bronchoconstriction induite par la méthacholine.

Suite au travail de caractérisation d'expression du canal sodique $Na_v1.5$ dans les poumons chez la souris, nous avons ensuite voulu étudier son rôle dans la physiologie pulmonaire. Les résultats obtenus à l'échelle moléculaire ont mis en évidence deux sites d'expression pour $Na_v1.5$ dans les poumons de souris : la cellule musculaire lisse de voies aériennes et le cardiomyocyte veineux, ce dernier ayant été identifié comme étant le siège d'expression majoritaire intrapulmonaire. Etant dans l'impossibilité d'étudier les deux types

cellulaires exprimant $Na_v1.5$ séparément à l'état de cellules fraîchement isolées, nous avons choisi une approche intégrée pour prendre en compte l'ensemble des expressions de $Na_v1.5$ et toutes leurs implications dans la physiologie et la physiopathologie pulmonaires. Le muscle lisse des voies aériennes est l'un des principaux effecteurs de la réactivité de l'arbre respiratoire et c'est pourquoi il est essentiellement étudié dans les problèmes d'hyper-réactivité bronchique, comme c'est le cas dans la pathologie de l'asthme. Cependant d'après la littérature, les études portant sur le myocarde péri-veineux pulmonaire se sont seulement portées sur les pathologies cardiaques qui lui sont liées, notamment la fibrillation atriale (Chang et al., 2016; Namekata et al., 2013; Tsuneoka et al., 2012) qui par ailleurs a est fortement associée à diverses mutations du gène *SCN5A* comme expliqué précédemment dans l'introduction. On sait ainsi que chez l'Homme, les fibres musculaires cardiaques présentes dans les veines pulmonaires constituent un siège majeur de fibrillation, et que la solution thérapeutique privilégiée chez les patients concernés est une ablation de ces fibres par radiofréquence (Chard & Tabrizchi, 2009). Un lien entre les remodelages pulmonaires de l'hypertension et la fibrillation atriale par le biais de ces cardiomyocytes veineux a été mis en lumière récemment (Xia et al., 2018), mais personne d'autre ne s'était intéressé au rôle potentiel de ces cardiomyocytes veineux dans les pathologies pulmonaires et notamment respiratoires, excepté le groupe de Cara Gottardi et Stephen Sai Folmsbee. Ils ont en effet réussi à mettre en lien la pathologie de l'asthme et l'expression de la α-T-caténine, protéine de jonction inter-cellulaire majoritairement exprimée dans les cardiomyocytes au niveau des disques intercalaires (Folmsbee et al., 2014, 2015). Leurs travaux sont basés sur l'utilisation d'un modèle murin présentant une invalidation homozygote de l'α-T-caténine, chez qui ils ont montré que la perte d'expression de l'α-T-caténine au niveau des cardiomyocytes veineux pulmonaires était associée à une absence de réponse inflammatoire dans les poumons suite à un protocole d'induction d'asthme allergique HDM (Folmsbee et al., 2015). Leurs résultats montrent chez des souris WT-HDM un important recrutement de cellules immunitaires autour des veines pulmonaires. Parallèlement l'inflammation des voies respiratoires observée chez ces souris est directement corrélée à leur proximité avec les veines pulmonaires. Ce phénomène, non observé chez les souris KO-HDM, a mis en évidence le rôle essentiel d'une protéine « cardiaque », l'α-T-caténine, dans le recrutement inflammatoire observé au niveau des veines pulmonaires, démontrant par la même occasion le rôle indirect mais essentiel des cardiomyocytes des veines pulmonaires dans l'inflammation des voies respiratoires

adjacentes (Folmsbee et al., 2015; Folmsbee & Gottardi, 2017). Le lien établit par ces auteurs entre la pathologie de l'asthme et l'expression de protéines cardiomyocytaires dans les poumons est très intéressant, car des études démontrent des corrélations entre certaines pathologies cardiaques et le développement de l'asthme comme expliqué dans l'introduction. Parmi ces pathologies cardiaques l'insuffisance cardiaque et la fibrillation atriale sont retrouvées, deux troubles déjà associés dans la littérature à des modifications d'expression du gène *SCN5A* (cf. introduction). Ce lien pertinent entre les pathologies cardiaques et l'asthme par le biais éventuel de ces cardiomyocytes veineux pulmonaires nous a conduit à nous intéresser aux voies aériennes et à leur fonction potentielle chez nos souris transgéniques *Scn5a*$^{+/-}$.

Pour étudier le rôle fonctionnel de $Na_v1.5$ dans la fonction respiratoire, nous avons utilisé un modèle murin transgénique présentant une invalidation hétérozygote du gène *Scn5a*, l'invalidation homozygote étant létale. Ce modèle transgénique *Scn5a*$^{+/-}$ est depuis longtemps utilisé dans les études des troubles du rythme cardiaque, sur fond génétique 129Sv. Or dans ce travail nous travaillons sur fond génétique C57BL/6J, qui semble être plus équilibré en terme de réaction inflammatoire pathologique, comme par exemple dans le modèle d'infarctus du myocarde par ligature coronaire (Gao et al., 2010). C'est également un fond génétique beaucoup plus couramment utilisé que le 129Sv dans le domaine des pathologies respiratoires. Il nous a donc d'abord fallu retrouver au niveau cardiaque la pertinence de ce modèle nouvellement dérivé sur fond C57BL/6J, tout en s'assurant que les souris *Scn5a*$^{+/-}$ ne présentent pas de trouble de la fonction cardiaque majeur pouvant impacter la fonction respiratoire adjacente. Au niveau du cœur, nos investigations par Western Blot et par ECG confirment la pertinence du modèle murin *Scn5a*$^{+/-}$ avec une diminution nettement significative de l'expression de la protéine dans l'organe entier (Figure AS1A), associée à un ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire comme précédemment décrit pour le même modèle murin sur fond génétique 129Sv (Royer et al., 2005) (Figure AS1B). Les observations des masses et les évaluations échocardiographiques ne mettent en évidence ni remodelage structural majeur, ni altération fonctionnelle contractile pouvant perturber significativement les débits sanguins (Figure AS1C et Figure AS1D). Nous avons donc pu utiliser ce modèle murin dans le contexte pulmonaire sans craindre d'observer les répercussions

d'une éventuelle pathologie cardiaque sous-jacente, excepté une perturbation de l'activité électrique des cellules contractiles.

Dans les poumons, la souris *Scn5a*$^{+/-}$ montre comme attendu une nette diminution de l'expression de $Na_v1.5$ dans les poumons entiers (Figure A3A). Cette baisse du niveau d'expression de la protéine se retrouve *in situ* au niveau du sarcolemme des cardiomyocytes veineux, prouvant l'importance de ce site d'expression pour nos interprétations futures (Figure A3B). La première exploration de l'activité des voies respiratoires a été réalisée par une approche *ex vivo*. Ne pouvant pas isoler manuellement les bronches secondaires, l'étude de la contractilité de trachées isolées nous a permis néanmoins d'approcher au mieux la physiologie du muscle lisse des voies aériennes secondaires. Les résultats ont montré une diminution significative de la contraction des trachées de souris transgéniques comparées aux trachées WT exposées à des doses croissantes de méthacholine, un bronchoconstricteur analogue de l'acétylcholine (Figure A3C). La spécificité de cette altération fonctionnelle a été confirmée par la suite par inhibitions partielle ou totale de la contraction en pré-incubant les trachées avec différentes doses d'ajmaline, un traitement anti-arythmique de classe I décrit comme un inhibiteur de $Na_v1.5$ de haute affinité (Figure A3C). L'ajmaline est notamment utilisée en clinique pour démasquer un ECG suspect chez les patients potentiellement atteints du syndrome de Brugada, arythmie cardiaque héréditaire à pénétrance partielle pour laquelle les mutations dans le gène *SCN5A* sont mises en cause dans environ 22% des cas (Priori et al., 2002). Cette perte fonctionnelle que nous avons observée sur les trachées de souris *Scn5a*$^{+/-}$ *ex vivo* a de plus été confirmée par une approche *in vivo*, sur souris vigile et non contrainte par pléthysmographie corporelle totale barométrique (Figure A3D). Ces résultats mettent en évidence pour la première fois l'importance de la protéine $Na_v1.5$ dans les voies de signalisation de la réactivité cholinergique des voies aériennes.

Pour renforcer ces résultats et pour en apprendre un peu plus à propos de cette réactivité respiratoire observée, nous avons voulu réaliser un autre test fonctionnel couramment utilisé dans les études des pathologies respiratoires chez le rongeur, appelée la technique des oscillations forcées avec le système flexiVent. Cette technique sert également à évaluer la réactivité du système respiratoire sous l'induction de méthacholine, mais est réalisée sur souris anesthésiée. Elle a pour avantage d'être plus reproductible et donc plus robuste que le test de pléthysmographie. La mesure des paramètres respiratoires étant

réalisée directement *via* une trachéotomie, cette méthode s'affranchi des biais potentiels sur les mesures de pression par pléthysmographie corporelle totale, potentiellement perturbées par la température corporelle de l'animal ou l'humidité de l'air environnant. De plus, le contrôle des rythmes et des flux inspiratoires par la ventilation mécanique permet des mesures plus précises que par pléthysmographie bien que réalisées dans des conditions moins physiologiques. Toutefois, dans le cadre de notre étude, la réalisation de ce test nous confronte à un éventuel obstacle méthodologique. En effet, cette procédure de flexiVent de par la trachéotomie et la ventilation forcée imposées à l'animal nécessite une anesthésie fixe et une analgésie profonde. Or, de nombreux travaux ont décrit des effets inhibiteurs sur les courants sodiques voltage-dépendants par la majorité des agents anesthésiants utilisés en expérimentation animale (Leffler et al., 2012; Ouyang et al., 2007; Stoetzer et al., 2016; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2014), incluant la kétamine dont l'utilisation est préconisée dans la procédure de flexiVent (Hara et al., 1998; Luo et al., 2015; Wagner et al., 2001). Afin de vérifier si cet effet inhibiteur s'applique à la réaction de bronchoréactivité que nous souhaitons observer *in vivo*, nous avons tout d'abord réalisé de nouvelles investigations *ex vivo* sur trachées isolées afin d'observer l'effet éventuel de la kétamine sur leurs contractions induites par la méthacholine. Sous l'induction de doses croissantes de méthacholine, une inhibition partielle ou totale de la contraction des trachées isolées a été observée avec les doses de kétamines dans lesquelles elles ont été pré-incubées pour les souris WT comme pour les souris *Scn5a*$^{+/-}$. Cet effet inhibiteur au niveau des trachées est retrouvé dans les voies respiratoires plus profondes lors de la réalisation du flexiVent, où aucune différence entre les résistances des systèmes respiratoires n'est observée chez les souris WT *versus Scn5a*$^{+/-}$. Ces résultats signifient que l'utilisation du flexiVent n'est malheureusement pas appropriée lorsqu'il s'agit d'étudier l'implication directe d'un courant sodique sur la contractilité des voies respiratoires.

Les investigations fonctionnelles réalisées chez la souris transgénique *Scn5a*$^{+/-}$ ont permis de mettre en évidence l'influence majeure de $Na_v1.5$ dans la résistance des voies respiratoires *via* son rôle dans la contraction du muscle lisse régulant leur calibre. L'inhibition de cette contraction des voies aériennes par l'ajmaline et la kétamine, des inhibiteurs des courants sodiques voltage-dépendants, suggèrent que ce rôle contractile de $Na_v1.5$ est assuré majoritairement par son activité électrique.

# III. La diminution d'expression de $Na_v1.5$ n'est pas associée à des remodelages pulmonaires.

D'autres paramètres majeurs de la contractilité des voies respiratoires n'ont pas été directement explorés dans les investigations fonctionnelles tels que les remodelages structuraux et inflammatoires. Un lien a été suggéré dans les troubles de conduction cardiaque entre $Na_v1.5$ et les remodelages (cf. introduction), et les travaux de Folmsbee et ses collaborateurs cités précédemment montrent une connexion inflammatoire entre les veines pulmonaires exprimant des protéines cardiaques et les voies aériennes avoisinantes dans le tissu pulmonaire. Il nous est donc apparu important de s'intéresser à ces paramètres de remodelages pulmonaires en lien avec l'expression de $Na_v1.5$ dans les poumons chez la souris.

Dans des contextes pathologiques comme l'asthme, l'hyper-réactivité du muscle lisse respiratoire est accompagnée de différents remodelages bronchiques. Ainsi il est décrit au niveau structural une dispersion plus importante dans l'épithélium de l'arbre respiratoire de cellules caliciformes productrices de mucus, une fibrose sub-épithéliale, une hypertrophie et une hyperplasie des cellules musculaires lisses, ainsi qu'une perturbation de la matrice extracellulaire notamment due à des dépôts désorganisés de collagène. Ces remodelages structuraux sont toujours accompagnés du recrutement de nombreuses cellules de l'immunité comme les polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages et les lymphocytes T (Benayoun & Pretolani, 2003). La cellule musculaire lisse, dans cet environnement structural altéré, devient la cible de la réaction inflammatoire induite par les déséquilibres des cycles de synthèse et de dégradation de tous les types cellulaires environnants. Ces perturbations directes de l'activité de la cellule musculaire lisse bronchique sont notamment médiées par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires synthétisées dans son environnement (Berger et al., 2002).

Les résultats fonctionnels obtenus précédemment dans notre modèle de souris montrent une diminution de la contractilité des muscles lisses des voies respiratoires en cas de diminution du niveau d'expression de $Na_v1.5$, et par conséquent du courant sodique voltage-dépendant associé (Figure A3). Néanmoins, ces résultats ne nous permettent pas de comprendre comment cette activité électrique intervient dans la contraction des cellules musculaires lisses. Il était donc intéressant de savoir si l'invalidation hétérozygote du gène

*Scn5a* dans ce modèle murin transgénique n'apportait pas également une protection vis-à-vis des différents remodelages structuraux et inflammatoires, qui pourraient influer sur la contractilité du muscle lisse. En effet, dans la littérature des corrélations commencent à être effectuées entre le canal sodique $Na_v1.5$ et les remodelages structuraux (Derangeon et al., 2017). De plus, l'expression de $Na_v1.5$ ayant également été démontrée dans des cellules comme les macrophages et les lymphocytes T (Black & Waxman, 2013), nous pouvions envisager que le canal sodique interviendrait également *via* la réaction immunitaire. D'après nos investigations fonctionnelles, la résistance pulmonaire diminue avec le niveau d'expression de $Na_v1.5$. Nous avons bien observé chez les souris *Scn5a*$^{+/-}$ une « hypo-réactivité » des voies respiratoires qui est la réaction inverse de celle observée dans la pathologie de l'asthme. C'est pourquoi il était intéressant de se demander si chez ces souris transgéniques, les poumons présentaient d'éventuels remodelages bronchiques structuraux et inflammatoires « inversés » et donc diminués comparés aux souris WT, potentiellement associés à des expressions éventuelles de cytokines anti-inflammatoires. Enfin, il était également pertinent de s'interroger sur un éventuel caractère « protecteur » de la baisse du niveau d'expression de $Na_v1.5$ chez les souris transgéniques sur la fonction respiratoire d'animaux rendues asthmatiques.

Afin d'appréhender les éventuels mécanismes de remodelages pulmonaires liés à l'expression de $Na_v1.5$, une approche transcriptomique globale a été menée en première intention. Les études des profils d'expression de nombreux transcrits codant pour des protéines clés de nombreuses voies de signalisation des remodelages ont été étudiés : des facteurs de croissance, des protéines de la transduction de signal, de la mise en place du cytosquelette, de l'inflammation, de l'adhésion cellulaire, et de la constitution et la régulation de la matrice extracellulaire (Table 2). Malheureusement, aucune voie de signalisation ne semble être modulée lorsque l'on compare les profils d'expression des transcrits issus de préparations de poumons de souris WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$ (Figure A4A et Figure AS2). Les quelques transcrits qui semblent statistiquement surexprimés chez les souris *Scn5a*$^{+/-}$ le sont de manière très modérée et totalement isolée des autres acteurs des voies de signalisations concernées (Table 2), ce qui rend ces diverses surexpressions difficilement interprétables. On observe des augmentations légères des transcrits pour Rhoa ; Il1β ; Col5a3 ; Ptgs2 ; Tgfβr3 (Figure A4A) ; Plaur et Itga2 (Figure AS2). Ces investigations ont été complétées par une étude

des profils d'expressions protéiques de différents marqueurs de remodelages par Western blot, combinée à des études morphologiques par colorations histologiques de coupes de poumons pour visualiser les éventuels remodelages structuraux et inflammatoires (Figure 25A et Figure 25B). Aucun marqueur de fibrose ou d'inflammation ne semble être exprimé de manière différentielle entre les poumons des animaux WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$ au niveau protéique. De plus, les analyses histologiques ne mettent en évidence au niveau des bronches ni déstructuration de la paroi, ni répartition inadaptée des collagènes, ni recrutement anormal des cellules immunitaires dans leur environnement (Figure A4B). Ces résultats montrent que le mécanisme d'action de la protéine $Na_v1.5$ dans la bronchoconstriction passe par son activité électrique de canal sodique, en dehors de tout contexte fibrotique ou inflammatoire majoré ou minoré, en conditions non pathologiques.

Cependant, les travaux de Folmsbee et ses collaborateurs portant sur l'expression de l'α-T-caténine dans les cardiomyocytes des veines pulmonaires suggèrent leur implication dans une forme de communication inflammatoire entre les veines et les voies respiratoires (Folmsbee et al., 2014, 2015). Ces cardiomyocytes ont donc été suggérés comme des médiateurs de la réponse inflammatoire dans le tissu pulmonaire dans l'asthme allergique (Folmsbee & Gottardi, 2017). Ayant démontré l'expression également importante de $Na_v1.5$ dans les cardiomyocytes pulmonaires, nous avons voulu, à l'image de leurs travaux, vérifier l'implication potentielle de $Na_v1.5$ dans la pathologie de l'asthme allergique par la mise en place chez nos souris *Scn5a*$^{+/-}$ d'un modèle d'asthme par exposition aux acariens HDM. Nos travaux ont permis de démontrer dans un premier temps que les médiateurs principaux de la réponse immunitaire allergique, les lymphocytes T, exprimaient effectivement $Na_v1.5$ dans notre modèle murin ce qui est en accord avec la littérature actuelle (Cf. introduction) (Figure 28A). Cependant il ne nous a pas été possible de montrer une différence d'expression sur cette population cellulaire isolée de lymphocytes T de souris WT *versus* *Scn5a*$^{+/-}$ ni par cytométrie en flux, ni par microscopie confocale. Cependant cette démonstration est tout à fait préliminaire du fait des très faibles effectifs étudiés (Figure 28B et Figure 28C). En revanche, une autre partie de ce travail en condition pathologique a consisté à réaliser de nouveaux tests fonctionnels *in vivo* par flexiVent sur des souris WT et *Scn5a*$^{+/-}$ contrôles et asthmatiques. Comme expliqué précédemment, l'utilisation d'une anesthésie fixe à la kétamine dans cette procédure inhibe la réponse électrique du canal sodique $Na_v1.5$ dans les poumons des souris,

ce test a donc pour but uniquement de montrer la différence de résistance respiratoire induites par d'éventuelles différences de remodelages structuraux résultant de la réaction immunitaire consécutive au développement de l'asthme. On observe effectivement une augmentation de la résistance des voies respiratoires entre les groupes contrôles DP et les groupes de souris asthmatiques HH, mais aucune différence fonctionnelle entre les groupes WT et *Scn5a*$^{+/-}$ même en condition asthmatique HH (Figure 28D). Ces résultats montrent que la protéine $Na_v1.5$, en conditions pathologiques d'asthme allergique, ne participe pas à la mise en place de la réponse immunitaire initiatrice des nombreux remodelages pulmonaires observés dans cette pathologie. Cela n'exclut pas une implication potentielle de $Na_v1.5$ dans cette pathologie. Toutefois ces résultats confirment la pertinence de s'intéresser préférentiellement à l'activité électrique de $Na_v1.5$ dans la fonction respiratoire et les pathologies associées, et non à son implication dans les remodelages par interaction éventuelle avec la matrice extracellulaire.

## IV. L'expression et la fonction de la protéine $Na_v1.5$ semblent différentes selon le sexe.

Ce travail portant sur l'implication potentielle de $Na_v1.5$ dans la respiration a permis de mettre en évidence le rôle de $Na_v1.5$ dans la réactivité contractile des voies respiratoires chez la souris femelle, grâce à l'utilisation d'un modèle murin *Scn5a*$^{+/-}$. Cependant, nous n'avons pas pu réaliser cette même démonstration chez les souris mâles, car notre modèle murin transgénique mâle s'est révélé non pertinent. Nous avons dans un premier temps voulu valider que l'invalidation du gène *Scn5a* était retrouvée au niveau protéique par Western Blot chez ces mâles. Mais nos résultats ont montré une absence de baisse significative du niveau d'expression de $Na_v1.5$ dans des préparations de ventricule gauche de souris *Scn5a*$^{+/-}$ mâles contrairement à ce qui avait été observé chez les femelles (Figure 26A). En effet le niveau d'expression protéique est similaire entre les groupes de souris mâles WT et *Scn5a*$^{+/-}$. Ce résultat est confirmé au niveau fonctionnel puisque l'on observe une absence de ralentissement de la conduction atrio-ventriculaire chez les souris mâles *Scn5a*$^{+/-}$ (Figure 26B) comparé aux souris femelles (Figure AS1B). De manière attendue, la suite de la caractérisation cardiaque de ces souris a montré une absence de modifications structurales et fonctionnelles par échocardiographie, comme chez les femelles (Figure 26C et Figure 26D). Mais cette non-

pertinence du modèle d'invalidation du gène *Scn5a* chez les souris mâles au niveau du cœur est confirmée également au niveau des poumons, où l'on observe dans des préparations d'organe entier une absence de différence d'expression de $Na_v1.5$ par Western Blot (Figure 27A). De la même façon que dans le cœur, cette observation biochimique est confirmée au niveau fonctionnel dans les poumons avec une absence de différence de réactivité cholinergique des voies respiratoires *ex vivo* (Figure 27B) comme *in vivo* (Figure 27C) comparée aux souris femelles (Figures A3C et Figure A3D). Ces résultats montrent deux choses importantes. Premièrement, l'étude de ce groupe mâle transgénique confirme l'importance d'une baisse du niveau d'expression de $Na_v1.5$ dans les poumons pour observer les répercussions fonctionnelles d'hypo-réactivité respiratoire chez les souris, confirmant ainsi le rôle essentiel de $Na_v1.5$ dans cette fonction respiratoire. Ce groupe de souris mâles sert ainsi de groupe contrôle supplémentaire. Enfin, ces résultats suggèrent une autre information intéressante pour la compréhension des mécanismes régulateurs de $Na_v1.5$. La régulation de l'expression de ce canal semble être modulée par les hormones sexuelles. Cette hypothèse a été auparavant avancée par Fraser et ses collaborateurs dans le cadre de leurs travaux sur l'expression de $Na_v1.5$ dans les cellules cancéreuses du sein (Fraser et al., 2005). Il a également été montré que l'activation de la protéine G monomérique RhoA dans la réponse contractile à l'acétylcholine était plus importante dans les cellules musculaires lisses gastriques de rats que dans les cellules gastriques de rates (Al-Shboul, 2016), protéine RhoA qui est par ailleurs régulatrice de l'expression de $Na_v1.5$ dans les cellules cancéreuses du sein (Dulong et al., 2014). De nombreuses études montent également une différence dans les diverses expressions du syndrome du côlon irritable selon les sexes (Mulak, Taché, & Larauche, 2014), pathologie associée à l'expression de $Na_v1.5$ (Cf. introduction). D'autres pathologies corrélées à l'expression de $Na_v1.5$ montrent des différences d'expressions de la maladie selon le sexe, notamment les canalopathies cardiaques sodiques. Le syndrome de Brugada semble en effet prédominant chez les hommes (Milman et al., 2018), tandis qu'être une femme est présenté comme un facteur de risque pour le développement du syndrome du QT long (Lowe et al., 2012; Vink et al., 2017). Mais les mécanismes sous-jacents à ces différences entre les sexes ne sont pas élucidés. L'ensemble de ces éléments suggère une implication potentielle de l'expression de $Na_v1.5$ dans ces différents troubles fonctionnels respiratoires, gastro-intestinaux et cardiaques qu'il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie, ainsi que dans le contexte du développement des métastases dans le cancer.

# V. Limitations majeures de cette étude

Bien que ce travail de thèse présente pour la première fois une description complète de l'expression du canal sodique $Na_v1.5$ dans les poumons de souris, certaines limitations sont à prendre en compte dans la discussion de ces résultats.

Tout d'abord, la première étape d'identification des sites d'expression de $Na_v1.5$ dans les poumons par histologie nous a permis d'identifier plusieurs sites d'expressions : la cellule musculaire lisse des bronches et le cardiomyocyte veineux. Au niveau fonctionnel la réponse contractile des cellules musculaires lisses des voies respiratoires a été reliée au niveau d'expression de $Na_v1.5$. Les deux sites d'expression pouvant être reliés à la fonction contractile d'après les nombreux éléments bibliographiques précédemment cités, il aurait été intéressant d'étudier séparément ces deux types cellulaires afin d'élucider leurs voies de signalisations impliquant $Na_v1.5$ qui sont probablement différentes. Toutefois, comme expliqué précédemment il nous a été difficile d'exploiter de manière plus approfondie les modèles cellulaires isolés. Concernant les cellules musculaires lisses de voies aériennes, il est possible de les étudier au niveau des bronches et à l'état de cellules fraîchement isolées chez l'humain ou encore chez des animaux de grande taille. Chez la souris, il est beaucoup plus difficile de les exploiter ainsi à cause de la petite taille des organes respiratoires pour deux raisons. La première est qu'il est manuellement impossible d'avec accès aux bronches secondaires, nous obligeant à travailler uniquement sur les cellules isolées de trachée et de bronches principales, ce qui nous éloigne de la physiologie intra-pulmonaire. La seconde est la trop faible quantité de cellules isolées obtenues lors de la digestion des trachées/bronches, quantité de cellules qui est donc trop difficilement exploitables pour des tests fonctionnels nécessaires à l'étude de la mécanique intracellulaire. La mise en culture de ces cellules isolées semblait être une bonne alternative pour les amplifier. Mais dans ces travaux de thèse, la pertinence même de l'utilisation de cellules mises en culture dans l'étude de l'expression de $Na_v1.5$ est remise en question. Une autre solution serait de faire le choix de regrouper plusieurs individus dans une même préparation cellulaire. Ce choix, bien que coûteux en terme de gestion d'élevage murin semble cependant nécessaire à de plus amples investigations sur les cellules musculaires lisses des voies respiratoires. Concernant l'étude isolée des cardiomyocytes de veines pulmonaires de souris, aucun protocole ne permet à ce jour de les isoler de manière mécanique ou enzymatique. Pourtant, leur exploitation en électrophysiologie semble particulièrement

intéressante du fait de l'expression de $Na_v1.5$ et des nombreux partenaires protéiques du couplage excitation/contraction et de la conduction exprimés sur ces cellules. Mais chez la souris, la seule solution semble être d'utiliser des protocoles de tranches *in vivo* pour mesurer l'activité électrique de ces cellules, mais également pour observer leur éventuelle contraction, nécessitant donc des équipements bien spécifiques. Pour conclure, il manque aujourd'hui des investigations fonctionnelles au niveau cellulaire, qui ne nous sont pas accessibles à ce jour mais qui permettraient pourtant d'obtenir de précieuses informations sur l'activité électrique et la signalisation calcique de ces cellules exprimant $Na_v1.5$ afin de mieux comprendre ses implications dans la physiologie pulmonaire.

Au niveau de la fonction respiratoire, il existe également quelques limitations à considérer. La première approche fonctionnelle, *ex vivo*, a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de $Na_v1.5$ dans la contraction des voies respiratoires chez la souris. Encore une fois cette démonstration n'a pu être réalisée qu'au niveau de la trachée, les voies respiratoires intra-pulmonaires nous étant inaccessibles manuellement. *In vivo* ensuite, la difficulté est majeure pour les investigations fonctionnelles respiratoires. En effet en clinique humaine, deux paramètres sont importants dans la réalisation des tests fonctionnels : ils sont réalisés 1) chez des individus vigiles, et 2) font appel à la motricité volontaire, notamment concernant les paramètres d'expiration forcée qui sont nécessaires à la mise en évidence de la résistance des voies aériennes et donc de la contraction des cellules musculaires lisses. Or chez la souris, il est impossible de reproduire ces tests, et les techniques utilisées pour étudier la fonction respiratoire sont basées sur des modèles mathématiques complexes qui cherchent à détourner ces problèmes cités. La pléthysmographie corporelle totale, réalisée sur animaux vigiles, mesure des variations de pression dans une chambre hermétique où la souris est enfermée. Mais elle ne prend pas en compte les biais potentiels engendrés par les niveaux d'humidité et par la température corporelle de l'animal qui influent sur la température de l'air dans cette chambre. Or, humidité et température sont deux paramètres qui peuvent significativement perturber des mesures de pression. De plus, la formule mathématique utilisée permettant d'extrapoler une valeur de Penh représentative de la réactivité des voies respiratoires est régulièrement contestée (Adler, Cieslewicz, & Irvin, 2004; Lomask, 2006; Lundblad et al., 2007). Le flexiVent lui, mesure directement les pressions et volumes respiratoires à la sortie des poumons *via* une trachéotomie. En revanche cette technique

nécessite de faire appel à une ventilation forcée car l'animal doit absolument être anesthésié. Or, comme expliqué dans nos résultats, la majorité des agents anesthésiques et analgésiques sont incompatibles avec l'étude de la fonction électrique du canal sodique $Na_v1.5$. Il est donc nécessaire d'utiliser toutes ces techniques, et non pas d'en exploiter une de façon isolée, afin d'interpréter le plus pertinemment possible la contraction des voies respiratoires chez le rongeur en lien avec l'expression de $Na_v1.5$.

# CONCLUSION

Ce travail de thèse présente pour la première fois une description intégrée du canal sodique $Na_v1.5$ dans les poumons chez la souris. Nous avons pu démontrer son expression, sa localisation et son rôle dans la fonction respiratoire.

L'expression de $Na_v1.5$ démontrée au niveau transcriptionnelle et protéique dans les cellules musculaires lisses de voies aériennes de souris en culture confirme les premiers résultats obtenus précédemment dans la littérature (Bradley et al., 2013). Cette expression de $Na_v1.5$ dans ces cellules est essentielle à la contraction cholinergique des voies respiratoires, et est médiée par son activité électrique. Si l'activité électrique de $Na_v1.5$ a été précédemment confirmée à l'échelle cellulaire chez le lapin, nos travaux l'ont aujourd'hui confirmé de manière plus intégrée chez la souris. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle important du courant sodique voltage-dépendant $Na_v1.5$ dans les mécanismes de couplage excitation-contraction de la cellule musculaire lisse respiratoire, dont l'initiation était jusqu'alors attribuée à l'activation de canaux calciques exclusivement (Roux et al., 1997). Le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses de bronches peut varier physiologiquement entre -30mV et -70mV (Hirota, Helli, & Janssen, 2007), ce qui correspond à des potentiels de membrane pouvant activer quelques canaux $Na_v1.5$ et par conséquent permettre l'apparition d'un courant $I_{NaL}$. Ce courant sodique, médié par l'activation de $Na_v1.5$, pourrait constituer le point initial du déclenchement d'un potentiel d'action bronchique. Des études électrophysiologiques par patch-clamp ainsi que l'étude des flux calciques dans ces cellules pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action de $Na_v1.5$ dans la contraction de ces cellules, essentiels à la modulation de la résistance des voies respiratoires.

L'expression de $Na_v1.5$, également retrouvée au niveau vasculaire, est localisée dans la paroi des veines pulmonaires à la membrane plasmique de cellules musculaires ayant un phénotype cardiomyocytaire. La présence de ces cellules dans les poumons et leur fonction est actuellement étudiée dans le domaine des pathologies cardiaques, puisque ces cellules en conditions pathologiques peuvent être douée d'une activité électrique autonome et conduire à des problèmes de fibrillation atriale. L'expression de $Na_v1.5$, protéine cardiaque essentielle à l'initiation et à la propagation du potentiel d'action cardiaque paraît prendre tout son sens

dans ce contexte. Mais ces cardiomyocytes pulmonaires font désormais l'objet d'études dans l'asthme, suggérant dans cette pathologie un rôle de ces cellules dans la modulation du recrutement des cellules immunitaires et par conséquent de la mise en place des nombreux remodelages conduisant aux symptômes du sujet asthmatique (Folmsbee & Gottardi, 2017). Nos travaux n'ont cependant pas permis de mettre en évidence un rôle de la protéine $Na_v1.5$ dans les mécanismes de remodelages pulmonaires inflammatoires faisant communiquer les veines et les bronches, et ce ni en conditions physiologiques, ni dans un modèle d'asthme allergique aigu. Néanmoins, d'autres modèles pathologiques restent à être explorés pour conclure définitivement sur l'implication potentielle de $Na_v1.5$ dans les remodelages pulmonaires pathologiques.

Enfin, l'utilisation du modèle murin transgéniques *Scn5a*$^{+/-}$ nous a permis d'étudier la différence d'expression du canal sodique $Na_v1.5$ uniquement chez les souris femelles, l'invalidation chez les souris mâles ne s'exprimant pas au niveau protéique. Cette anomalie d'expression chez les mâles met en évidence de possibles mécanismes régulateurs de l'expression du gène *Scn5a*, différents entre les mâles et les femelles, qu'il serait pertinent d'étudier de manière plus approfondie. En effet de nombreux troubles fonctionnels dans des pathologies associées à $Na_v1.5$ s'expriment différemment selon le sexe, et la régulation différente de l'expression de $Na_v1.5$ pourrait en être la cause directe ou indirecte. Il apparaît essentiel d'être vigilant sur l'utilisation de modèles animaux transgéniques pour l'étude du gène *Scn5a*, qu'il s'agisse d'invalidation ou de mutations, car ne pas prendre en compte la différence de sexe pourrait conduire à l'interprétation de résultats faussés par cet éventuel mécanisme de régulation qui n'est pas élucidé à ce jour.

Pour conclure, ces travaux ont permis de mettre en évidence l'expression et la fonction de $Na_v1.5$ dans un nouvel organe. Les sites d'expression multiples pour cette protéine ne sont pas surprenants à la vue de la diversité d'organes et de types cellulaires exprimant $Na_v1.5$. Mais à ces multiples sites d'expression s'ajoutent de multiples nouveaux rôles fonctionnels pour ce canal. Or, en dehors de la fonction électrique de $Na_v1.5$ dans le potentiel d'action cardiaque, très peu de données sont actuellement disponibles sur ses autres mécanismes d'actions. Néanmoins, la proximité physique des poumons et du cœur, leur connexion fonctionnelle dans la circulation sanguine et leur communication électrique par la présence de cardiomyocytes qui « débordent » dans les veines pulmonaires rendent particulièrement

intéressante l'expression fonctionnelle de $Na_v1.5$ dans les poumons. De nombreuses études génétiques ont montré l'expression de mutations du gène $Na_v1.5$ dans certaines pathologies cardiaques arythmiques comme le syndrome de Brugada, le syndrome du QT long et la maladie de Lenègre. Les pathologies respiratoires quant à elles ont été associées à la manifestation de ces arythmies, notamment l'asthme qui est aujourd'hui qualifiée de désordre génétique complexe. Nos travaux ont permis de confirmer l'expression fonctionnelle de $Na_v1.5$ dans la fonction respiratoire chez la souris. Il est possible d'envisager que le canal sodique $Na_v1.5$ constitue le lien manquant à notre compréhension des nombreuses corrélations entre les fonctions de ces deux organes. Il serait pertinent de s'intéresser à l'avenir à l'expression du gène *SCN5A* et de ses éventuelles mutations dans les populations de patients asthmatiques pour confirmer l'intérêt de $Na_v1.5$ dans l'association révélée entre les troubles du rythme cardiaque et les troubles de la fonction respiratoire.

# BIBLIOGRAPHIE


**Abriel, H. (2010).** Journal of Molecular and Cellular Cardiology Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins : Physiology and pathophysiology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *48*(1), 2–11. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.025

**Abriel, H., Rougier, J.-S., & Jalife, J. (2016).** Ion Channel Macromolecular Complexes in Cardiomyocytes: Roles in Sudden Cardiac Death. *Circulation Research*, *8*(5), 583–592. https://doi.org/10.1002/aur.1474.Replication

**Adimadhyam, S., Schumock, G., Walton, S., Joo, M., McKell, J., & Lee, T. (2014).** Risk of Arrhythmias Associated with Ipratropium Bromide in Children, Adolescents, and Young Adults with Asthma: A Nested Case-Control Study. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, *34*(4), 315–323. https://doi.org/10.1002/phar.1336

**Adler, A., Cieslewicz, G., & Irvin, C. (2004).** Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airway responsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *Journal of Applied Physiology*, *5*, 286–292.

**Ahmad, I., Hoessli, D., Gupta, R., Walker-Nasir, E., Rafik, S., Choudhary, M., … Nasir-ud-Din. (2007).** In silico determination of intracellular glycosylation and phosphorylation sites in human selectins: Implications for biological function. *Journal of Cellular Biochemistry*, *100*(6), 1558–1572. https://doi.org/10.1002/jcb.21156

**Al-Shboul, O. (2016).** The role of the RhoA/ROCK pathway in gender-dependent differences in gastric smooth muscle contraction. https://doi.org/10.1007/s12576-015-0400-9

**American Cancer Society. (2016).** What Is Non-Small Cell Lung Cancer? Retrieved from https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/what-is-non-small-cell-lung-cancer.html

**Amin, A., Asghari-Roodsari, A., & Tan, H. (2010).** Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *460*(2), 223–237. https://doi.org/10.1007/s00424-009-0761-0

**Amrani, Y., & Panettieri, R. (2003).** Airway smooth muscle: contraction and beyond. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *35*, 272–276.

**Arnolds, D., Patel, V., & Moskowitz, I. (2012).** TBX5 drives Scn5a expression to regulate cardiac conduction system function. *J Clin Invest*, *122*(7). https://doi.org/10.1172/JCI62617

**Ashpole, N., Herren, A., Ginsburg, K., Brogan, J., Johnson, D., Cummins, T., … Hudmon, A. (2012).** Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(24), 19856–19869. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322537

**Asthme et Allergies association. (2017).** Asthme - Asthme et Allergies et Urticaire. Retrieved from https://asthme-allergies.org/asthme/

**Aurlien, D., Leren, T., Taubøll, E., & Gjerstad, L. (2009).** New SCN5A mutation in a SUDEP victim with idiopathic epilepsy. https://doi.org/10.1016/j.seizure.2008.07.008

**Baptista-Hon, D., Robertson, F., Robertson, G., Owen, S., Rogers, G., Lydon, E., … Hales, T. (2014)**. Potent inhibition by ropivacaine of metastatic colon cancer SW620 cell invasion and Nav1.5 channel function. *British Journal of Anaesthesia*, *113*, i39–i48. https://doi.org/10.1093/bja/aeu104

**Barnes, P. (2017).** Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clinical Science*, *131*, 1541–1558. https://doi.org/10.1042/CS20160487

**Bartos, D., Grandi, E., & Ripplinger, C. (2015).** Ion Channels in the Heart. *Comprehensive Physiology*, *5*(3), 1423–64. https://doi.org/10.1002/cphy.c140069

**Benayoun, L., & Pretolani, M. (2003).** Le remodelage bronchique dans l'asthme : mécanismes et enjeux thérapeutiques. https://doi.org/10.1051/medsci/2003193319

**Berger, P., Marthan, R., & Tunon de Lara, J.-M. (2002).** Physiopathologie de la cellule musculaire lisse dans l ' inflammation bronchique. *Revue Des Maladies Respiratoires*, (569164), 778–794.

**Berra-Romani, R., Blaustein, M., & Matteson, D. (2005).** TTX-sensitive voltage-gated Na+ channels are expressed in mesenteric artery smooth muscle cells.

**Bers, D. (2002).** The role of calcium in contraction and flux balance.

**Besson, P., Driffort, V., Bon, É., Gradek, F., Chevalier, S., & Roger, S. (2015).** How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells? *BBA - Biomembranes*, *1848*, 2493–2501. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.04.013

**Beyder, A., Mazzone, A., Strege, P., Tester, D., Saito, Y., Bernard, C., … Farrugia, G. (2014).** Loss-of-function of the Voltage-gated Sodium Channel Nav1.5 (Channelopathies) in Patients with Irritable Bowel Syndrome. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.054

**Bezzina, C., Veldkamp, M., van Den Berg, M., Postma, A., Rook, M., Viersma, J., … Wilde, A. (1999).** A single Na+ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circulation Research*, *85*, 1206–1213. https://doi.org/10.1161/01.RES.85.12.1206

**Black, J., Dib-Hajj, S., Cohen, S., Hinson, A., & Waxman, S. (1998).** Glial cells have heart: rH1 Na+ channel mRNA and protein in spinal cord astrocytes. *Glia*, *23*(3), 200–208. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199807)23:3<200::AID-GLIA3>3.0.CO;2-8

**Black, J., Liu, S., & Waxman, S. (2009).** Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia*, *57*(10), 1072–1081. https://doi.org/10.1002/glia.20830

**Black, J., Newcombe, J., & Waxman, S. (2010).** Astrocytes within multiple sclerosis lesions upregulate sodium channel Nav1.5. https://doi.org/10.1093/brain/awq003

**Black, J., & Waxman, S. (2013).** Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, *80*(2), 280–291. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.012

**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 BACKGROUND AND PURPOSE. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00912.x

**Boukens, B., Rivaud, M., Rentschler, S., & Coronel, R. (2014).** Misinterpretation of the mouse ECG: "musing the waves of Mus musculus". *The Journal of Physiology*, *592*(21), 4613–26. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.279380

**Bozkaya, Y., Aydin, H., Celik, H., Kayikcioglu, M., Payzin, S., Kultursay, H., … Hasdemir, C. (2008).** Increased myocardial collagen turnover in patients with progressive cardiac conduction disease. *Pacing and Clinical Electrophysiology : PACE*, *31*(10), 1284–90. https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2008.01179.x

**Brackenbury, W., Isom, L., Desaphy, J.-F., & Shah, M. (2011).** Na+ channel β subunits: overachievers of the ion channel family. https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00053

**Bradley, E., Webb, T., Hollywood, M., Sergeant, G., McHale, N., & Thornbury, K. (2013).** The cardiac sodium current Nav1.5 is functionally expressed in rabbit bronchial smooth muscle cells. *AJP: Cell Physiology*, *305*(4), C427–C435. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00034.2013

**Brisson, L., Driffort, V., Benoist, L., Poet, M., Counillon, L., Antelmi, E., … Roger, S. (2013).** Na1.5 Na+ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *Journal of Cell Science*, *126*, 4835–4842. https://doi.org/10.1242/jcs.123901

**Cai, B., Wang, N., Mao, W., You, T., Lu, Y., Li, X., … Xu, H. (2014).** Deletion of FoxO1 leads to shortening of QRS by increasing Na+ channel activity through enhanced expression of both cardiac Nav1.5 and β3 subunit. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *74*, 297–306. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.06.006

**Campbell, T., Main, M., & Fitzgerald, E. (2013).** Functional expression of the voltage-gated Na+ channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, *126*, 4939–4949. https://doi.org/10.1242/jcs.130013

**Casini, S., Verkerk, A., van Borren, M., van Ginneken, A., Veldkamp, M., de Bakker, J., & Tan, H. (2009).** Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, *81*(1), 72–81. https://doi.org/10.1093/cvr/cvn274

**Catterall, W. (2000).** From Ionic Currents to Molecular Review Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, *26*, 13–25.

**Chang, C.-J., Cheng, C., Chen, Y., Kao, Y., Chen, S., & Chen, Y. (2016).** Gap junction modifiers

regulate electrical activities of the sinoatrial node and pulmonary vein: Therapeutic implications in atrial arrhythmogenesis. *International Journal of Cardiology*, *221*, 529–536. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.07.027

**Chard, M., & Tabrizchi, R. (2009).** The role of pulmonary veins in atrial fibrillation: A complex yet simple story. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.07.002

**Charpentier, F., Bourgé, A., & Mérot, J. (2008).** Mouse models of SCN5A-related cardiac arrhythmias. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *98*, 230–237. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.012

**Chatelier, A., Mercier, A., Tremblier, B., Thériault, O., Moubarak, M., Benamer, N., … Faivre, J. (2012).** A distinct de novo expression of Nav1.5 sodium channels in human atrial fibroblasts differentiated into myofibroblasts. *Journal of Physiology*, *590*(17), 4307–4319. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.233593

**Chen, Y., Guo, H., Xu, D., Xu, X., Wang, H., Hu, X., … Weir, E. (2012).** Left ventricular failure produces profound lung remodeling and pulmonary hypertension in mice: Heart failure causes severe lung disease. *Hypertension*, *59*(6), 1170–1178. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186072

**Chioni, A., Shao, D., Grose, R., & Djamgoz, M. (2010).** Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: Activity-dependent positive feedback and cellular migration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *42*, 346–358. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.021

**Chomczynski, P. (1987).** Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction, *159*, 156–159. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2

**Collins, S., Widger, J., Davis, A., & Massie, J. (2012).** Management of asthma in children with long QT syndrome. *Paediatric Respiratory Reviews*, *13*(2), 100–105. https://doi.org/10.1016/J.PRRV.2011.02.003

**Craner, M., Damarjian, T., Liu, S., Hains, B., Lo, A., Black, J., … Waxman, S. (2005).** Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia*, *49*(2), 220–229. https://doi.org/10.1002/glia.20112

**Daimi, H., Lozano-Velasco, E., Khelil, A., Chibani, J., Barana, A., Amorós, I., … Franco, D. (2015).** Regulation of SCN5A by microRNAs: miR-219 modulates SCN5A transcript expression and the effects of flecainide intoxication in mice. *Heart Rhythm*, *12*, 1333–1342. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2015.02.018

**Dale Brown, R., Kelly Ambler, S., Darren Mitchell, M., & Long, C. (2005).** The Cardiac Fibroblast: Therapeutic Target in Myocardial Remodeling and Failure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, *45*, 657–87. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095802

**DeMarco, K., & Clancy, C. (2016).** Cardiac Na Channels: Structure to Function. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 78, pp. 287–311). https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2016.05.001

**Derangeon, M., Montnach, J., Baró, I., & Charpentier, F. (2012).** Mouse models of SCN5A-related cardiac arrhythmias. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00210

**Derangeon, M., Montnach, J., Ore Cerpa, C., Jagu, B., Patin, J., Toumaniantz, G., … Charpentier, F. (2017).** Transforming growth factor β receptor inhibition prevents ventricular fibrosis in a mouse model of progressive cardiac conduction disease. *Cardiovascular Research*, *113*(5), 464–474. https://doi.org/10.1093/cvr/cvx026

**Detta, N., Frisso, G., & Salvatore, F. (2015).** The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1854*(10), 1502–1509. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.07.009

**Dionne, V. (2016).** Spontaneously active Nav1.5 sodium channels may underlie odor sensitivity.

**Doyle, I., Nicholas, T., & Bersten, A. (1999).** Partitioning lung and plasma proteins: Circulating surfactant proteins as biomarkers of alveolocapillary permeability. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *26*(3), 185–197. https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.03015.x

**Driffort, V., Gillet, L., Bon, E., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Joulin, V., … Roger, S. (2014).** Ranolazine inhibits Nav1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization. *Molecular Cancer*, *13*(1), 264. https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-264

**Dulong, C., Fang, Y., Gest, C., Zhou, M., Patte-Mensah, C., Mensah-Nyagan, A., … Li, H. (2014).** The small GTPase RhoA regulates the expression and function of the sodium channel Nav1.5 in breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, *44*(2), 539–547. https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2214

**Ednie, A., Horton, K.-K., Wu, J., & Bennett, E. (2013).** Expression of the sialyltransferase, ST3Gal4, impacts cardiac voltage-gated sodium channel activity, refractory period and ventricular conduction. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.02.013

**Ehrlich, J., Cha, T., Zhang, L., Chartier, D., Melnyk, P., Hohnloser, S., & Nattel, S. (2003).** Cellular electrophysiology of canine pulmonary vein cardiomyocytes: Action potential and ionic current properties. *Journal of Physiology*, *551*(3), 801–813. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046417

**Emerman, C., Crafford, W., & Vrobel, T. (1986).** Ventricular arrhythmias during treatment for acute asthma. *Annals of Emergency Medicine*, *15*(6), 699–702. https://doi.org/10.1016/S0196-0644(86)80428-0

**Fehrenbach, H., Wagner, C., & Wegmann, M. (2017).** Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell and Tissue Research*, *367*(3), 551–569. https://doi.org/10.1007/s00441-016-2566-8

**Filatov, G., & Rich, M. (2004).** Hyperpolarized shifts in the voltage dependence of fast

inactivation of Nav1.4 and Nav1.5 in a rat model of critical illness myopathy. *The Journal of Physiology*, *559*(3), 813–820. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.062349

**Firth, A., Remillard, C., Platoshyn, O., Fantozzi, I., Ko, E., & X-J Yuan, J. (2011).** Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. *Pulmonary Circulation Pulm Circ*, *11*(48), 48–71. https://doi.org/10.4103/2045-8932.78103

**Folmsbee, S., Budinger, G., Bryce, P., & Gottardi, C. (2015).** The cardiomyocyte protein a T-catenin contributes to asthma through regulating pulmonary vein inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *138*(1), 123–129.e2. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.11.037

**Folmsbee, S., & Gottardi, C. (2017).** Cardiomyocytes of the Heart and Pulmonary Veins : Novel Contributors to Asthma ? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, (312), 1–24.

**Folmsbee, S., Morales-nebreda, L., Hengel, J., Tyberghein, K., Roy, F., Budinger, G., … Gottardi, C. (2014).** The cardiac protein alphaT-catenin contributes to chemical-induced asthma. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 253–258. https://doi.org/10.1152/ajplung.00331.2014

**Fondation contre le Cancer. (2016).** Qu'est-ce que le cancer? Retrieved from https://www.cancer.be/le-cancer/quest-ce-que-le-cancer

**Frantz, S., Bauersachs, J., & Ertl, G. (2009).** Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. https://doi.org/10.1093/cvr/cvn292

**Fraser, S., Diss, J., Chioni, A., Mycielska, M., Pan, H., Yamaci, R., … Djamgoz, M. (2005).** Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(15), 5381–9. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327

**Fraser, S., Diss, J., Lloyd, L., Pani, F., Chioni, A., George, A., & Djamgoz, M. (2004).** T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na+ channel activity. *FEBS Letters*, *569*(1–3), 191–194. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.063

**Frenz, C., Hansen, A., Dupuis, N., Shultz, N., Levinson, S., Finger, T., & Dionne, V. (2014).** Nav1.5 sodium channel window currents contribute to spontaneous firing in olfactory sensory neurons. *Journal of Neurophysiology*, *112*(5), 1091–104. https://doi.org/10.1152/jn.00154.2014

**Gao, G., & Dudley, S. (2013).** RBM25/LUC7L3 Function in Cardiac Sodium Channel Splicing Regulation of Human Heart Failure. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *23*(1), 8. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.08.003

**Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., & Wang, Z. (2010).** Expression of voltage-gated sodium channel α subunit in human ovarian cancer. *Oncology Reports*, *23*(5), 1293–1299.

https://doi.org/10.3892/or_00000763

**Gao, X., Ming, Z., Su, Y., Fang, L., Kiriazis, H., Xu, Q., … Du, X. (2010).** Infarct size and post-infarct inflammation determine the risk of cardiac rupture in mice. *International Journal of Cardiology*, *143*(1), 20–28. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.01.019

**Garcia-Elias, A., & Benito, B. (2018).** Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *International Journal of Molecular Sciences*. https://doi.org/10.3390/ijms19030692

**Gaudesius, G., Miragoli, M., Thomas, S., & Rohr, S. (2003).** Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circulation Research*, *93*(5), 421–8. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000089258.40661.0C

**Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., … Le Guennec, J.-Y. (2009).** Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. https://doi.org/10.1074/jbc.M806891200

**Goossens, S., Janssens, B., Bonne, S., De Rycke, R., Braet, F., van Hengel, J., & van Roy, F. (2007).** A unique and specific interaction between T-catenin and plakophilin-2 in the area composita, the mixed-type junctional structure of cardiac intercalated discs. *Journal of Cell Science*, *120*(12), 2126–2136. https://doi.org/10.1242/jcs.004713

**Gosling, M., Harley, S., Turner, R., Carey, N., & Powell, J. (1998).** Human saphenous vein endothelial cells express a tetrodotoxin-resistant, voltage-gated sodium current. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(33), 21084–90.

**Grossman, J. (1976).** The occurrence of arrhythmias in hospitalized asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *57*(4), 310–317. https://doi.org/10.1016/0091-6749(76)90087-7

**Haïssaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D., Takahashi, A., Hocini, M., Quiniou, G., … Clémenty, J. (1998).** Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins. *New England Journal of Medicine*, *339*(10), 659–666. https://doi.org/10.1056/NEJM199809033391003

**Hallaq, H., Wang, D., Kunic, J., George, A., Wells, K., & Murray, K. (2011).** Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na+ channels.

**Han, D., Tan, H., Sun, C., & Li, G. (2018).** Dysfunctional Nav1.5 channels due to SCN5A mutations. *Experimental Biology and Medicine*, 153537021877797. https://doi.org/10.1177/1535370218777972

**Hara, Y., Chugun, A., Nakaya, H., & Kondo, H. (1998).** Tonic block of the sodium and calcium currents by ketamine in isolated guinea pig ventricular myocytes. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, *60*(4), 479–83. https://doi.org/10.1292/jvms.60.479

**Hartmann, H., Colom, L., Sutherland, M., & Noebels, J. (1999).** Selective localization of cardiac

SCN5A sodium channels in limbic regions of rat brain. *Nature Neuroscience*, *2*(7), 593–595. https://doi.org/10.1038/10147

**Haruta, D., Matsuo, K., Ichimaru, S., Soda, M., Hida, A., Sera, N., … Akahoshi, M. (2009).** Men With Brugada-Like Electrocardiogram Have Higher Risk of Prostate Cancer. *Circulation Journal*, *73*(1), 63–68. https://doi.org/10.1253/circj.CJ-08-0680

**Hirota, S., Helli, P., & Janssen, L. (2007).** Ionic mechanisms and Ca2+ handling in airway smooth muscle. *European Respiratory Journal*, *30*(1), 114–133. https://doi.org/10.1183/09031936.00147706

**Holm, A., Rich, A., Miller, S., Strege, P., Ou, Y., Gibbons, S., … Farrugia, G. (2002).** Sodium Current in Human Jejunal Circular Smooth Muscle Cells. https://doi.org/10.1053/gast.2002.30346

**Hong, T., & Shaw, R. (2017).** Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. *Physiological Reviews*, *97*(1), 227–252. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2015

**House, C., Vaske, C., Schwartz, A., Obias, V., Frank, B., Luu, T., … Lee, N. (2010).** Voltage-gated Na+ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Research*, *70*(17), 6957–6967. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1169

**Huang, C. (2017).** Murine Electrophysiological Models of Cardiac Arrhythmogenesis. *Physiological Reviews*, *97*(1), 283–409. https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2016

**Hulsmans, M., Clauss, S., Xiao, L., Aguirre, A., King, K., Hanley, A., … Nahrendorf, M. (2017).** Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.050

**Inserm. (2015a).** Asthme. Retrieved from https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/asthme

**Inserm. (2015b).** Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Retrieved from https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/bronchopneumopathie-chronique-obstructive-bpco

**Jabbari, R., Glinge, C., Jabbari, J., Risgaard, B., Winkel, B., Terkelsen, C., … Tfelt-Hansen, J. (2017).** A Common Variant in SCN5A and the Risk of Ventricular Fibrillation Caused by First ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170193

**Janse, M., & Wit, A. (1989)**. Electrophysiological Mechanisms of Ventricular Arrhythmias Resulting From Myocardial Ischemia and Infarction, *69*(4).

**Jespersen, T., Gavillet, B., van Bemmelen, M., Cordonier, S., Thomas, M., Staub, O., & Abriel, H. (2006).** Cardiac sodium channel Nav1.5 interacts with and is regulated by the protein tyrosine phosphatase PTPH1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *348*(4), 1455–1462. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.08.014

**Jo, T., Nagata, T., Iida, H., Imuta, H., Iwasawa, K., Ma, J., … Nakajima, T. (2004).** Voltage-gated sodium channel expressed in cultured human smooth muscle cells: Involvement of SCN9A. *FEBS Letters*, *567*(2–3), 339–343. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.092

**Kawaguchi, T., Hayashi, H., Miyamoto, A., Yoshino, T., Taniguchi, A., Naiki, N., … Horie, M. (2013).** Prognostic implications of progressive cardiac conduction disease. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, *77*(1), 60–7.

**Kerr, N., Gao, Z., Holmes, F., Hobson, S., Hancox, J., Wynick, D., & James, A. (2007).** The sodium channel Nav1.5a is the predominant isoform expressed in adult mouse dorsal root ganglia and exhibits distinct inactivation properties from the full-length Na v 1.5 channel. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.03.002

**Kohl, P., Camelliti, P., Burton, F., & Smith, G. (2005).** Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2005.06.096

**Konstam, M., Kramer, D., Patel, A., Maron, M., & Udelson, J. (2011).** Left ventricular remodeling in heart failure: Current concepts in clinical significance and assessment. *JACC: Cardiovascular Imaging*, *4*(1), 98–108. https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2010.10.008

**Landstrom, A., Dobrev, D., & Wehrens, X. (2017).** Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310083

**Leffler, A., Frank, G., Kistner, K., Niedermirtl, F., Koppert, W., Reeh, P., & Nau, C. (2012).** Local Anesthetic-like Inhibition of Voltage-gated Na+ Channels by the Partial μ-opioid Receptor Agonist Buprenorphine. *Anesthesiology*, (6).

**Lenegre, J. (1964).** Etiology and pathology of bilateral bundle branch block in relation to complete heart block. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *6*(5), 409–444. https://doi.org/10.1016/S0033-0620(64)80001-3

**Leoni, A., Gavillet, B., Rougier, J., Marionneau, C., Probst, V., Le Scouarnec, S., … Charpentier, F. (2010).** Variable Nav1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the Scn5a +/- mouse model. *PLoS ONE*, *5*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009298

**Li, G.-R., Sun, H.-Y., Chen, J.-B., Zhou, Y., Tse, H.-F., & Lau, C.-P. (2009).** Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PloS One*, *4*(10), e7307. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007307

**Light, P., Wallace, C., & Dyck, J. (2003).** Constitutively active adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Circulation*, *107*(15), 1962–1965. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000069269.60167.02

**Liu, M., Sanyal, S., Gao, G., Gurung, I., Zhu, X., Gaconnet, G., … Dudley, S. (2009).** Cardiac Na + Current Regulation by Pyridine Nucleotides. *Circ Res. Circ Res. October*, *9*(1058), 737–745. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.197277

**Liu, M., Yang, K., & Dudley, S. (2016).** Cardiac Sodium Channel Mutations: Why so Many Phenotypes? *Current Topics in Membranes*, *78*, 513–559. https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.12.004

**Liu, X.-P., Wooltorton, J., Gaboyard-Niay, S., Yang, F.-C., Lysakowski, A., & Eatock, R. (2016).** Sodium channel diversity in the vestibular ganglion: Nav1.5, Nav1.8, and tetrodotoxin-sensitive currents. *Journal of Neurophysiology*, *115*(5), 2536–55. https://doi.org/10.1152/jn.00902.2015

**Lo, W.-L., Donermeyer, D., & Allen, P. (2012).** A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4 + T cells. https://doi.org/10.1038/ni.2379

**Locke, G., Ackerman, M., Zinsmeister, A., Thapa, P., & Farrugia, G. (2006).** Gastrointestinal symptoms in families of patients with an SCN5A-encoded cardiac channelopathy: Evidence of an intestinal channelopathy. *American Journal of Gastroenterology*, *101*(6), 1299–1304. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00507.x

**Lomask, M. (2006).** Further exploration of the Penh parameter. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *57*(SUPPL. 2), 13–20. https://doi.org/10.1016/j.etp.2006.02.014

**Loussouarn, G., Sternberg, D., Nicole, S., Marionneau, C., Le Bouffant, F., Toumaniantz, G., … Charpentier, F. (2016).** Physiological and pathophysiological insights of Nav1.4 and Nav1.5 comparison. *Frontiers in Pharmacology*, *6*(JAN). https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00314

**Lowe, J., Stroud, D., Yang, T., Hall, L., Atack, T., & Roden, D. (2012).** Increased late sodium current contributes to long QT-related arrhythmia susceptibility in female mice. *Cardiovascular Research*, *95*(3), 300–307. https://doi.org/10.1093/cvr/cvs160

**Lu, Y.-Y., Chen, Y., Kao, Y., Chen, S., & Chen, Y. (2013).** Extracellular matrix of collagen modulates arrhythmogenic activity of pulmonary veins through p38 MAPK activation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *59*, 159–166. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.03.008

**Lu, Z., Jiang, Y.-P., Wu, C.-Y., Ballou, L., Liu, S., Carpenter, E., … Lin, R. (2013).** Increased persistent sodium current due to decreased PI3K signaling contributes to QT prolongation in the diabetic heart. *Diabetes*, *62*(12), 4257–65. https://doi.org/10.2337/db13-0420

**Lundblad, L., Irvin, C., Hantos, Z., Sly, P., Mitzner, W., & Bates, J. (2007).** Penh is not a measure of airway resistance! *European Respiratory Journal*, *30*(4), 805. https://doi.org/10.1183/09031936.00091307

**Luo, A., Cao, Z., Xiang, Y., Zhang, S., Qian, C., Fu, C., … Ma, J. (2015).** Ketamine attenuates the Na+ dependent Ca2+ overload in rabbit ventricular myocytes in vitro by inhibiting late Na+ and L-type Ca2+ currents. *Acta Pharmacologica Sinica*, *36*(11), 1327–1336. https://doi.org/10.1038/aps.2015.75

**Luo, L., Ning, F., Du, Y., Song, B., Yang, D., Salvage, S., … Wang, T. (2017).** Calcium-dependent Nedd4-2 upregulation mediates degradation of the cardiac sodium channel Nav1.5:

implications for heart failure. *Acta Physiologica*, *221*(1), 44–58. https://doi.org/10.1111/apha.12872

**Maier, S., Westenbroek, R., McCormick, K., Curtis, R., Scheuer, T., & Catterall, W. (2004).** Distinct Subcellular Localization of Different Sodium Channel alpha and beta Subunits in Single Ventricular Myocytes from Mouse Heart. *Circulation*, *109*(11), 1421–1427. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121421.61896.24

**Malissen, B. (2012).** A voltage-gated sodium channel mediates positive selection of T cells. *Nature Immunology*, *13*(9), 810–812. https://doi.org/10.1038/ni.2400

**Manring, H., Dorn, L., Ex-Willey, A., Accornero, F., & Ackermann, M. (2018).** At the heart of inter- and intracellular signaling: the intercalated disc. https://doi.org/10.1007/s12551-018-0430-7

**Mao, W., You, T., Ye, B., Li, X., Dong, H., Hill, J., … Xu, H. (2012).** Reactive Oxygen Species Suppress Cardiac Nav1.5 Expression through Foxo1. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032738

**Marieb, E., Hoehn, K., Moussakova, L., Lachaîne, R., & Desbiens, A. (2015).** *Anatomie et physiologie humaines*.

**Marionneau, C., & Abriel, H. (2015).** Regulation of the cardiac Na+ channel Nav1.5 by post-translational modifications. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *82*, 36–47. https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2015.02.013

M**chale, N., Hollywood, M., Sergeant, G., & Thornbury, K. (2006).** Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. *J Physiol*, *5701*, 23–28. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098376

**Melnyk, P., Ehrlich, J., Pourrier, M., Villeneuve, L., Cha, T., & Nattel, S. (2005).** Comparison of ion channel distribution and expression in cardiomyocytes of canine pulmonary veins versus left atrium. *Cardiovascular Research*, *65*(1), 104–116. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.08.014

**Michael, G., Xiao, L., Qi, X.-Y., Dobrev, D., & Nattel, S. (2009).** Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. https://doi.org/10.1093/cvr/cvn266

**Michelakis, E., Weir, E., Wu, X., Nsair, A., Waite, R., Hashimoto, K., … Archer, S. (2001).** Potassium channels regulate tone in rat pulmonary veins. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *280*(6), L1138–L1147.

**Milam, A., Bartleson, J., Donermeyer, D., Horvath, S., Durai, V., Raju, S., … Allen, P. (2018).** Tuning T Cell Signaling Sensitivity Alters the Behavior of CD4+ T Cells During an Immune Response. *The Journal of Immunology*, ji1701422. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1701422

**Milman, A., Gourraud, J.-B., Andorin, A., Postema, P., Sacher, F., Mabo, P., … Belhassen, B. (2018).** Gender Differences in Patients with Brugada Syndrome and Arrhythmic Events: Data from a Survey on Arrhythmic Events in 678 Patients. *Heart Rhythm*. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.06.019

**Miragoli, M., Gaudesius, G., & Rohr, S. (2006).** Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circulation Research*, *98*(6), 801–10. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000214537.44195.a3

**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. *European Journal of Pharmacology*, *184*, 315–319.

**Miyazaki, A., Sakaguchi, H., Aiba, T., Kumakura, A., Matsuoka, M., Hayama, Y., … Ohuchi, H. (2016).** Comorbid Epilepsy and Developmental Disorders in Congenital Long QT Syndrome With Life-Threatening Perinatal Arrhythmias. https://doi.org/10.1016/j.jacep.2015.10.010

**Molimard, M., Lara, M. T. De, & Marthan, R. (1998).** Le muscle lisse bronchique - Une nouvelle cellule pro-inflammatoire ? *La Lettre Du Pneumologue*, 6–10.

**Morel, J., Rannou, F., Talarmin, H., Giroux-Metges, M. A., Pennec, J. P., Dorange, G., & Gueret, G. (2010).** Sodium Channel Na V 1.5 Expression is Enhanced in Cultured Adult Rat Skeletal Muscle Fibers. https://doi.org/10.1007/s00232-010-9262-5

**Mueller-Hoecker, J., Beitinger, F., Fernandez, B., Bahlmann, O., Assmann, G., Troidl, C., … Deindl, E. (2008).** Of rodents and humans: A light microscopic and ultrastructural study on cardiomyocytes in pulmonary veins. *International Journal of Medical Sciences*, *5*(3), 152–158.

**Mulak, A., Taché, Y., & Larauche, M. (2014).** Sex hormones in the modulation of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol March*, *14*(2010), 2433–2448. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2433

**Murphy, B. J., Rogers, J., Perdichizzi, A. P., Colvin, A. A., & Catterall, W. A. (1996).** cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(46), 28837–43. https://doi.org/10.1074/JBC.271.46.28837

**Namekata, I., Tsuneoka, Y., & Tanaka, H. (2013).** Electrophysiological and pharmacological properties of the pulmonary vein myocardium. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *36*(1), 2–7. https://doi.org/10.1248/bpb.b212020

**Nash, D. T., & Nash, S. D. (2008).** New Drug Class Ranolazine for chronic stable angina. *Www.Thelancet.Com*, *372*. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61554-8

**Nattel, S., Maguy, A., Le Bouter, S., & Yeh, Y.-H. (2007).** Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation.

*Physiological Reviews*, *87*(2), 425–56. https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2006

**Neef, S., & Maier, L. S. (2013).** Novel aspects of excitation–contraction coupling in heart failure. https://doi.org/10.1007/s00395-013-0360-2

**Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005).** Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. Retrieved from https://www-physiology-org.gate2.inist.fr/doi/pdf/10.1152/physrev.00002.2005

**Newhouse, M. T., Chapman, K. R., McCallum, A. L., Abboud, R. T., Bowie, D. M., Hodder, R. V., … Molfino, N. A. (1996).** Cardiovascular Safety of High Doses of Inhaled Fenoterol and Albuterol in Acute Severe Asthma. *Chest*, *110*(3), 595–603. https://doi.org/10.1378/CHEST.110.3.595

**Noyes, A. M., Zhou, A., Gao, G., Gu, L., Day, S., Wasserstrom, J. A., & Dudley, S. C. (2017).** Abnormal sodium channel mRNA splicing in hypertrophic cardiomyopathy. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.08.071

**Nuyens, D., Stengl, M., Dugarmaa, S., Rossenbacker, T., Compernolle, V., Rudy, Y., … Carmeliet, P. (2001).** Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nature Medicine*, *7*(9), 1021–1027. https://doi.org/10.1038/nm0901-1021

**O'malley, H. A., & Isom, L. L. (2016).** Sodium channel β subunits: emerging targets in channelopathies. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071846

**Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012).** Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3

**Ou, Y., Gibbons, S. J., Miller, S. M., Strege, P. R., Rich, A., Distad, M. A., … Farrugia, G. (2002).** SCN5A is expressed in human jejunal circular smooth muscle cells. *Neurogastroenterology and Motility*, *14*(5), 477–486. https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2002.00348.x

**Ouyang, W., Ph, D., & Hemmings, H. C. (2007).** Isoform-selective Effects of Isoflurane on Voltage-gated Na+ Channels. *Anesthesiology*, (1), 91–98.

**Pacia, S. V, Devinsky, O., Luciano, D. J., & Vazquez, B. (1994).** The prolonged QT syndrome presenting as epilepsy: a report of two cases and literature review. *Neurology*, *44*(8), 1408–10. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8058139

**Papadatos, G. A., Wallerstein, P. M., Head, C. E., Ratcliff, R., Brady, P. A., Benndorf, K., … Grace, A. A. (2002).** Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene Scn5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(9), 6210–6215. https://doi.org/10.1073/pnas.082121299

**Pappalardo, L. W., Samad, O. A., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2014).** Voltage-gated sodium channel Nav1.5 contributes to astrogliosis in an in vitro model of glial injury via reverse Na+/Ca2+ exchange. https://doi.org/10.1002/glia.22671

**Parisi, P., Oliva, A., Vidal, M. C., Partemi, S., Campuzano, O., Iglesias, A., … Brugada, R. (2013).** Coexistence of epilepsy and Brugada syndrome in a family with SCN5A mutation. *Epilepsy Research*, *105*, 415–418. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.02.024

**Petitprez, S., Zmoos, A.-F., Ogrodnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., … Abriel, H. (2011).** SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circulation Research*, *108*(3), 294–304. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.228312

**Piccini, J. P., Berger, J. S., & Brown, D. L. (2008).** Early Sustained Ventricular Arrhythmias Complicating Acute Myocardial Infarction*. *@BULLET The American Journal of Medicine*, *121*, 797–804. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.04.024

**Platoshyn, O., Remillard, C. V, Fantozzi, I., Sison, T., & Yuan, J. X. (2005).** Identification of functional voltage-gated Na+ channels in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch*, *451*(2), 380–387. https://doi.org/10.1007/s00424-005-1478-3

**Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016).** The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. *Circulation Research*, *119*(1), 91–112. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577

**Priori, S. G., Napolitano, C., Gasparini, M., Pappone, C., Della Bella, P., Giordano, U., … Nastoli, J. (2002).** Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation*, *105*(11), 1342–7. https://doi.org/10.1161/HC1102.105288

**Quignard, J. F., Ryckwaert, F., Albat, B., Nargeot, J., & Richard, S. (1997).** A novel tetrodotoxin-sensitive Na+ current in cultured human coronary myocytes. *Circulation Research*, *80*(3), 377–82. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000435853.85322.AF

**Rannou, F., Pennec, J.-P., Morel, J., Guéret, G., Leschiera, R., Droguet, M., … Giroux-Metges, M.-A. (2011).** Nav1.4 and Nav1.5 are modulated differently during muscle immobilization and contractile phenotype conversion. *Journal of Applied Physiology*, *111*(2), 495–507. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01136.2010

**Remme, C. A., & Bezzina, C. R. (2010).** Sodium channel (Dys)function and cardiac arrhythmias. *Cardiovascular Therapeutics*, *28*(5), 287–294. https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00210.x

**Remme, C. A., Verkerk, A. A. O., Hoogaars, A. W. M. H., Aanhaanen, A. W. T. J., Scicluna, A. B. P., Annink, A. C., … Bezzina, A. C. R. (2009).** The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium. Retrieved from https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC2722719/pdf/395_2009_Article_12.pdf

**Remme, C. A., Verkerk, A. O., Nuyens, D., van Ginneken, A. C. G., van Brunschot, S., Belterman, C. N. W., … Bezzina, C. R. (2006).** Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation*, *114*(24), 2584–94. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653949

**Renganathan, M., Dib-Hajj, S., & Waxman, S. G. (2002).** Nav1.5 underlies the "third TTX-R sodium current" in rat small DRG neurons. *Molecular Brain Research*, *106*, 70–82. Retrieved from www.elsevier.com

**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. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.07.001

**Roger, S., Gillet, L., Le Guennec, J. Y., & Besson, P. (2015).** Voltage-gated sodium channels and cancer: Is excitability their primary role? *Frontiers in Pharmacology*, *6*(JUL), 1–22. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00152

**Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P.-I., Iochmann, S., … Le Guennec, J.-Y. (2007).** Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*, 774–786. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.12.007

**Rook, M. B., Evers, M. M., Vos, M. a, & Bierhuizen, M. F. a. (2012).** Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovascular Research*, *93*(1), 12–23. https://doi.org/10.1093/cvr/cvr252

**Rosero, S. Z., Zareba, W., Moss, A. J., Robinson, J. L., Hajj Ali, R. H., Locati, E. H., … Andrews, M. L. (1999).** Asthma and the risk of cardiac events in the long QT syndrome. *The American Journal of Cardiology*, *84*(12), 1406–1411. https://doi.org/10.1016/S0002-9149(99)00586-X

**Roux, E., Guibert, C., Savineau, J. P., & Marthan, R. (1997).** [Ca2+]i oscillations induced by muscarinic stimulation in airway smooth muscle cells: receptor subtypes and correlation with the mechanical activity. *British Journal of Pharmacology*, *120*, 1294–1301. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701061

**Roux, E., Molimard, M., Savineau, J.-P., & Marthan, R. (1998).** Muscarinic Stimulation of Airway Smooth Muscle Cells. *Gen. Pharmac*, *31*(3), 349–356. Retrieved from https://ac-els-cdn-com.gate2.inist.fr/S030636239800007X/1-s2.0-S030636239800007X-main.pdf?_tid=8077505a-20f3-4cbf-be8e-ce988d6a2aaf&acdnat=1531317376_a1c6cbb40cc0782bd06e98da893ba719

**Royer, A., Van Veen, T. A. B., Le Bouter, S., Marionneau, C., Griol-Charhbili, V., Léoni, A. L., … Charpentier, F. (2005).** Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's: Disease age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*, *111*(14), 1738–1746. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000160853.19867.61

**Rutland, C. S., Polo-Parada, L., Ehler, E., Alibhai, A., Thorpe, A., Suren, S., … Loughna, S. (2011).** Knockdown of embryonic myosin heavy chain reveals an essential role in the morphology and function of the developing heart. *Development (Cambridge, England)*, *138*(18), 3955–66. https://doi.org/10.1242/dev.059063

**Rydell-Törmänen, K., Risse, P. A., Kanabar, V., Bagchi, R., Czubryt, M. P., & Johnson, J. R. (2013).** Smooth muscle in tissue remodeling and hyper-reactivity: Airways and arteries.

*Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, *26*(1), 13–23. https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.04.003

**Saito, Y. a, Strege, P. R., Tester, D. J., Locke, G. R., Talley, N. J., Bernard, C. E., … Farrugia, G. (2009).** Sodium channel mutation in irritable bowel syndrome: evidence for an ion channelopathy. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *296*(2), G211-8. https://doi.org/10.1152/ajpgi.90571.2008

**Sakai, H., Suto, W., Kai, Y., Chiba, Y., & Sakai, H. (2017).** Mechanisms underlying the pathogenesis of hyper-contractility of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *J. Smooth Muscle Res*, *53*, 37–47. https://doi.org/10.1540/jsmr.53.37

**Santamore, P. (1991).** Dynamics of Coronary Occlusion in the Pathogenesis of Myocardial infarction. *JACC*.

**Savineau, J., & Marthan, R. (1997).** Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *11*(4), 289–299. https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1997.tb00841.x

**Schiaffino, S., Rossi, A. C., Smerdu, V., Leinwand, L. A., & Reggiani, C. (2015).** Developmental myosins: expression patterns and functional significance. https://doi.org/10.1186/s13395-015-0046-6

**Schittny, J. C. (2017).** Development of the lung. https://doi.org/10.1007/s00441-016-2545-0

**Scornik, F. S., Desai, M., Brugada, R., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., Antzelevitch, C., & Pérez, G. J. (2006).** Functional expression of "cardiac-type"; Nav1.5 sodium channel in canine intracardiac ganglia. Retrieved from https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC1989775/pdf/nihms25171.pdf

**Seda, M., Pinto, F. M., Wray, S., Cintado, C. G., Noheda, P., Buschmann, H., & Candenas, L. (2007).** Functional and Molecular Characterization of Voltage-Gated Sodium Channels in Uteri from Nonpregnant Rats. *Biology of Reproduction*, *77*(5), 855–863. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063016

**Sekiguchi, K., Kanda, F., Mitsui, S., Kohara, N., & Chihara, K. (2012).** Fibrillation potentials of denervated rat skeletal muscle are associated with expression of cardiac-type voltage-gated sodium channel isoform Nav1.5. *Clinical Neurophysiology*, *123*(8), 1650–1655. https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.01.002

**Shan, B., Dong, M., Tang, H., Wang, N., Zhang, J., Yan, C., … Wang, C. (2014).** Voltage-gated sodium channels were differentially expressed in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostate cancer cells. *Oncology Letters*, *8*(1), 345–350. https://doi.org/10.3892/ol.2014.2110

**Shang, L. L., Pfahnl, A. E., Sanyal, S., Jiao, Z., Allen, J., Banach, K., … Dudley, S. C. (2007).** Human Heart Failure Is Associated With Abnormal C-Terminal Splicing Variants in the Cardiac

Sodium Channel. *Circulation Research*, *101*(11), 1146–1154. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.152918

**Shang, L. L., Sanyal, S., Pfahnl, A. E., Jiao, Z., Allen, J., Liu, H., & Dudley, S. C. (2008).** NF-kB-dependent transcriptional regulation of the cardiac scn5a sodium channel by angiotensin II. *Am J Physiol Cell Physiol*, *294*, 372–379. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00186.2007

**Shy, D., Gillet, L., & Abriel, H. (2013).** Cardiac sodium channel Nav1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.026

**Sievi, N. A., Clarenbach, C. F., Camen, G., Rossi, V. A., Van Gestel, A. J., & Kohler, M. (2014).** High prevalence of altered cardiac repolarization in patients with COPD. https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-55

**Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (1994).** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, *372*(6503), 231–236. https://doi.org/10.1038/372231a0

**Stocker, P. J., & Bennett, E. S. (2006).** Differential Sialylation Modulates Voltage-gated Na+ Channel Gating throughout the Developing Myocardium. *The Journal of General Physiology J. Gen. Physiol*, *00*(3), 253–265. https://doi.org/10.1085/jgp.200509423

**Stoetzer, C., Reuter, S., Doll, T., Foadi, N., Wegner, F., & Leffler, A. (2016).** Inhibition of the cardiac Na+ channel α-subunit Nav1.5 by propofol and dexmedetomidine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *389*(3), 315–325. https://doi.org/10.1007/s00210-015-1195-1

**Strege, P. R., Ou, Y., Sha, L., Rich, A., Gibbons, S. J., Szurszewski, J. H., … Gibbons, S. J. (2003).** Sodium current in human intestinal interstitial cells of Cajal. Retrieved from https://www-physiology-org.gate2.inist.fr/doi/pdf/10.1152/ajpgi.00152.2003

**Suissa, S., Hemmelgarn, B., Blais, L., & Ernst, P. (1996).** Bronchodilators and acute cardiac death. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *154*(6 Pt 1), 1598–602. https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.6.8970341

**Suresh, K., & Shimoda, L. A. (2016).** Lung Circulation. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 6, pp. 897–943). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/cphy.c140049

**Suy, S., Hansen, T. P., Auto, H. D., Kallakury, B. V. S., Dailey, V., Danner, M., … Brown, M. L. (2012).** Expression of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.8 in Human Prostate Cancer is Associated with High Histological Grade. https://doi.org/10.4172/2324-9110.1000102

**Suzanne Vink, A., Clur, S.-A. B., Paed, F., Wilde, A. A., & Blom, N. A. (2017).** Effect of age and gender on the QTc-interval in healthy individuals and patients with long-QT syndrome. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2017.07.012

**Swynghedauw, B. (1999).** Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, *79*(1). Retrieved from https://www-physiology-

org.gate2.inist.fr/doi/pdf/10.1152/physrev.1999.79.1.215

**Takahara, A., Hagiwara, M., Namekata, I., & Tanaka, H. (2014).** Pulmonary Vein Myocardium as a Possible Pharmacological Target for the Treatment of Atrial Fibrillation. *Journal of Pharmacological Sciences*, *126*(1), 1–7. https://doi.org/10.1254/jphs.14R09CP

**Tan, D. W., Wong, J. L., Tie, S. T., Abisheganaden, J. A., Lim, A. Y., & Wong, W. F. (2014).** β2-adrenoceptor in obstructive airway diseases: Agonism, antagonism or both? *World Journal of Respirology*, *5*(3), 199. https://doi.org/10.5320/wjr.v5.i3.199

**Tandon, M. K. (1980).** Cardiopulmonary Effects of Fenoterol and Salbutamol Aerosols. *Chest*, *77*(3), 429–431. https://doi.org/10.1378/CHEST.77.3.429

**Terzano, C., Romani, S., Conti, V., Paone, G., Oriolo, F., & Vitarelli, A. (2014).** Atrial fibrillation in the acute, hypercapnic exacerbations of COPD. Retrieved from https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/2908-2917.pdf

**Tfelt-Hansen, J., Winkel, B. G., Grunnet, M., & Jespersen, T. (2010).** Inherited cardiac diseases caused by mutations in the nav1.5 sodium channel: Molecular perspectives. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, *21*(1), 107–115. https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2009.01633.x

**Thottathil, P., Acharya, J., Moss, A. J., Jons, C., McNitt, S., Goldenberg, I., … Robinson, J. L. (2008).** Risk of Cardiac Events in Patients with Asthma and Long QT Syndrome Treated with β2-agonists. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.05.029

**Tian, X.-L., Yong, S. L., Wan, X., Wu, L., Chung, M. K., Tchou, P. J., … Wang, Q. (2004).** Mechanisms by which SCN5A mutation N 1325 S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo. *Cardiovasc Res*, *61*(2), 256–267. Retrieved from https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC1579709/pdf/nihms12084.pdf

**Townsley, M. I. (2013).** Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries and veins. https://doi.org/10.1002/cphy.c100081

**Tsuneoka, Y., Kobayashi, Y., Honda, Y., Namekata, I., & Tanaka, H. (2012).** Electrical Activity of the Mouse Pulmonary Vein Myocardium. *Journal of Pharmacological Sciences*, *292*, 287–292. https://doi.org/10.1254/jphs.12062SC

**van Bemmelen, M., Rougier, J., Gavillet, B., Apothéloz, F., Daidié, D., Tateyama, M., … Abriel, H. (2004).** Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circulation Research*, *95*(3), 284–91. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000136816.05109.89

**van Stuijvenberg, L., Yildirim, C., Kok, B. G. J. M., van Veen, T. A. B., Varró, A., Winckels, S. K. G., … Bierhuizen, M. F. A. (2010).** Alternative Promoter Usage and Splicing of the Human *SCN5A* Gene Contribute to Transcript Heterogeneity. *DNA and Cell Biology*, *29*(10), 577–587. https://doi.org/10.1089/dna.2009.0999

**Veerman, C. C., Wilde, A. A. M., & Lodder, E. M. (2015).** The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product Nav1.5 : Role in physiology and pathophysiology. *Gene*, *573*(2), 177–187. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.062

**Virsolvy, A., Farah, C., Pertuit, N., Kong, L., Lacampagne, A., Reboul, C., … Richard, S. (2015).** Antagonism of Nav channels and α1-adrenergic receptors contributes to vascular smooth muscle effects of ranolazine. *Nature Publishing Group*, (November), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep17969

**Wagner, L. E., Gingrich, K. J., Kulli, J. C., & Yang, J. (2001).** Ketamine Blockade of Voltage-gated Sodium Channels Evidence for a Shared Receptor Site with Local Anesthetics. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, *95*(6), 1406–1413.

**Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E. C. L., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., … Maier, L. S. (2006).** Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na+ channels. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(12), 3127–38. https://doi.org/10.1172/JCI26620

**Wang, G., Rong, M., Li, Q., Liu, Y., Long, C., & Meng, P. (2015).** Alkaloids from Veratrum taliense Exert Cardiovascular Toxic Effects via Cardiac Sodium Channel Subtype 1.5. *Toxins*, 1–10. https://doi.org/10.3390/toxins8010012

**Wang, J., Ou, S.-W., Bai, Y.-F., Wang, Y.-J., Xu, Z.-Q. D., & Luan, G.-M. (2017).** Multiple Nav1.5 isoforms are functionally expressed in the brain and present distinct expression patterns compared with cardiac Nav1.5. *Molecular Medicine Reports*, *16*(1), 719–729. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6654

**Wang, J., Ou, S.-W., Wang, Y.-J., Kameyama, M., Kameyama, A., & Zong, Z.-H. (2009).** Analysis of four novel variants of Nav1.5/SCN5A cloned from the brain. https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.04.003

**Warnier, M. J., Rutten, F. H., Kors, J. A., Willem, J., Lammers, J., De Boer, A., … De Bruin, M. L. (2012).** Cardiac Arrhythmias in Adult Patients with Asthma. *Journal of Asthma*, *49*(499), 942–946. https://doi.org/10.3109/02770903.2012.724132

**Watanabe, H., Yang, T., Stroud, D. M., Lowe, J. S., Harris, L., Atack, T. C., … Roden, D. M. (2011).** Striking in Vivo Phenotype of a Disease-Associated Human SCN5A Mutation Producing Minimal Changes in Vitro. *Circulation. August*, *30*(1249), 1001–1011. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.987248

**Waxman Carrithers, S. G., Tokmoulina, G., Pypaert, M., Michael D Carrithers, E. A., Dib-Hajj, S., Carrithers, M. D., … Waxman, S. G. (2007).** Endosome Regulates Endosomal Acidification Channel Nav1.5 in the Macrophage Late Expression of the Voltage-Gated Sodium Expression of the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 in the Macrophage Late Endosome Regulates Endosomal Acidification. *J Immunol*, *178*, 7822–7832. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7822

**Wu, W. K. K., Li, G. R., Wong, H. P. S., Hui, M. K. C., Tai, E. K. K., Lam, E. K. Y., … Cho, C. H. (2006).** Involvement of Kv1.1 and Nav1.5 in proliferation of gastric epithelial cells. *Journal of*

*Cellular Physiology*, *207*(2), 437–444. https://doi.org/10.1002/jcp.20576

**Xia, P., Li, L., Qi, R., Shi, J., Ju, W., & Chen, M. (2018).** Electrical and histological remodeling of the pulmonary vein in 2K1C hypertensive rats : Indication of initiation and maintenance of atrial fibrillation. *Original Investigation*, 169–175. https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2017.7844

**Xiao, Y., Cai, X., Atkinson, A., Logantha, S. J., Boyett, M., & Dobrzynski, H. (2016).** Expression of connexin 43, ion channels and Ca2+ handling proteins in rat pulmonary vein cardiomyocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *12*(5), 3233–3241. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3766

**Xing, D., Wang, J., Ou, S., Wang, Y., Qiu, B. O., Ding, D., … Gao, Q. (2014).** Expression of neonatal Nav1.5 in human brain astrocytoma and its effect on proliferation, invasion and apoptosis of astrocytoma cells. *Oncology Reports*, *31*(6), 2692–2700. https://doi.org/10.3892/or.2014.3143

**Yamaci, R. F., Fraser, S. P., Battaloglu, E., Kaya, H., Erguler, K., Foster, C. S., & Djamgoz, M. B. A. (2017).** Neonatal Nav1.5 protein expression in normal adult human tissues and breast cancer. *Pathology - Research and Practice*, *213*(8), 900–907. https://doi.org/10.1016/J.PRP.2017.06.003

**Yu, S., Li, G., L-H Huang, C., Lei, M., & Wu, L. (2018).** Late sodium current associated cardiac electrophysiological and mechanical dysfunction. https://doi.org/10.1007/s00424-017-2079-7

**Zhang, Y., He, J., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., & Yu, T. (2014).** Assessment of the effect of etomidate on voltage-gated sodium channels and action potentials in rat primary sensory cortex pyramidal neurons. *European Journal of Pharmacology*, *736*, 55–62. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.04.036

**Zhao, Y., Huang, Y., Li, W., Wang, Z., Zhan, S., Zhou, M., … Huang, Z. (2015).** Post-transcriptional regulation of cardiac sodium channel gene SCN5A expression and function by miR-192-5p HHS Public Access. *Biochim Biophys Acta. Author Manuscript Biochim Biophys Acta*, (0), 2024–2034. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.07.016

**Zhou, A., Xie, A., Yun Kim, T., Liu, H., Shi, G., Kang, G.-J., … Dudley, S. C. (2018).** HuR-mediated SCN5A messenger RNA Q1 stability reduces arrhythmic risk in heart failure. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.02.018

**Zhou, J., Shin, H.-G., Yi, J., Shen, W., Williams, C. P., & Murray, K. T. (2002).** Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circulation Research*, *91*(6), 540–6. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000033598.00903.27

**Zimmer, T., Haufe, V., & Blechschmidt, S. (2014).** Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart. https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.58

UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

**Titre :** Le canal sodique voltage-dépendant $Na_v1.5$ : expressions pulmonaires et rôles potentiels dans la fonction respiratoire chez la souris.

**Mots clés :** $Na_v1.5$, poumons, cellule musculaire lisse, cardiomyocyte.

**Résumé :** Le canal sodique $Na_v1.5$, codé par le gène Scn5a, est nécessaire au potentiel d'action des cardiomyocytes. Mais son expression a aussi été décrite dans divers contextes et a été associée à de nouvelles fonctions. Une expression a été montrée dans le muscle lisse des voies respiratoires, suggérant une implication de $Na_v1.5$ dans la fonction respiratoire. Ce travail a consisté à décrire les expressions et à montrer les rôles potentiels de $Na_v1.5$ dans la respiration chez la souris. Des analyses histologiques ont confirmé l'expression de $Na_v1.5$ dans le muscle lisse des voies respiratoires *in situ*, mais un site d'expression majeur a également été montré à la membrane plasmique de « cardiomyocytes » présents dans les veines pulmonaires. Des tests de contractilité des voies respiratoires ont été réalisés sur des souris knock-out $Scn5a^{+/-}$. Ils ont montré *ex vivo* par des tests de contractilité de trachées isolées une baisse de la contraction pour les souris femelles $Scn5a^{+/-}$, et WT pré-incubées à l'ajmaline ou à la kétamine, des inhibiteurs sodiques. Cet effet a été confirmé *in vivo* par pléthysmographie corporelle totale montrant une hyporéactivité respiratoire chez les souris $Scn5a^{+/-}$ femelles. Aucun remodelage structural ou inflammatoire n'y étant associé, cela suggère un rôle électrique de $Na_v1.5$ dans la respiration. Les souris $Scn5a^{+/-}$ mâles n'ont pas montré de diminution d'expression et de fonction pour $Na_v1.5$, suggérant une possible influence hormonale dans sa régulation. Pour conclure, $Na_v1.5$ contribue à la contractilité des voies respiratoires chez la souris. Il reste à déterminer ses mécanismes d'action et ses éventuelles implications en pathologie, notamment dans l'asthme.

**Title :** The voltage-gated sodium channel $Na_v1.5$: pulmonary expressions and potential roles in respiratory function in mice.

**Keywords :** $Na_v1.5$, lungs, smooth muscle cell, cardiomyocyte.

**Abstract :** $Na_v1.5$ sodium channel, encoded by the Scn5a gene, is necessary for action potential in cardiomyocytes. However, its expression has been described in various contexts and has been associated with new functions. An expression has been recorded in airway smooth muscle, suggesting an involvement of $Na_v1.5$ in respiratory function. The aim of the work has been to describe the expressions and to highlight the potential roles of $Na_v1.5$ in mice breathing. Histological assay has confirmed $Na_v1.5$ expression in airway smooth muscle *in situ*, but a major expression site has been showed at the plasma membrane of "cardiomyocytes" located in pulmonary veins. Airway contractility assessments were made on knock-out $Scn5a^{+/-}$ mice. *Ex vivo* isolated trachea contractility test showed a decrease of contraction for $Scn5a^{+/-}$ mice and for WT mice pre-incubated with sodium blockers ajmaline or ketamine.This effect was confirmed by *in vivo* whole body plethysmography, showing respiratory hyporesponsiveness on female $Scn5a^{+/-}$ mice. No structural of inflammatory remodelings were associated, suggesting an electrical role for $Na_v1.5$ in respiration. Male $Scn5a^{+/-}$ mice do not showed a significant decrease of $Na_v1.5$ expression, suggesting a possible hormonal influence in its regulation. To conclude, $Na_v1.5$ contribute to mice airway contractility. It remains to determine its mechanism of action and its potential involvement in pathological context such as asthma.