



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Physiopathologie

Présentée et soutenue par Olivier LAIREZ
Le 30 novembre 2010

Influence de la sérotonine et de son récepteur 5-HT_{2A} sur le remodelage ventriculaire au cours de l'insuffisance cardiaque

JURY

| | |
|--|--------------------|
| Pr. Philippe VALET Professeur des Universités, Toulouse | Président |
| Pr. Pascal BOUSQUET Professeur des Universités / Praticien Hospitalier, Strasbourg | Rapporteur |
| Dr. Stéphanie BARRERE-LEMAIRE Chargé de recherche au CNRS, Montpellier | Rapporteur |
| Dr. Renée VENTURA-CLAPIER Directeur de recherche à l'INSERM, Chatenay-Malabry | Examineur |
| Dr. Jeanne MIALET-PEREZ Chargé de recherche à l'INSERM, Toulouse | Examineur |
| Pr. Angelo PARINI Professeur des Universités / Praticien Hospitalier, Toulouse | Directeur de thèse |

Ecole doctorale : Biologie – Santé – Biotechnologies

Unité de recherche : INSERM U858 – Equipe 6

Directeur de Thèse : Pr Angelo PARINI ; **Co-directeur de Thèse** : Dr Jeanne MIALET-PEREZ

Aux miens.

Résumé

L'insuffisance cardiaque est une maladie circulatoire qui implique la mise en jeu de systèmes d'adaptation neuro-hormonaux participant au remodelage ventriculaire et à l'entretien de la dysfonction cardiaque. La sérotonine plasmatique et plaquettaire est augmentée chez des patients en insuffisance cardiaque, ce qui suggère une participation de cette neuro-hormone dans le remodelage ventriculaire.

L'objectif de ce travail a été de préciser par une approche *in vivo* le rôle de la sérotonine et de son récepteur 5-HT_{2A} sur le remodelage ventriculaire, étape déterminante de l'insuffisance cardiaque.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés au phénotype cardiaque de souris génétiquement déficientes pour la monoamine oxydase – A (MAO-A, enzyme de dégradation de la sérotonine) qui présentent des taux élevés de sérotonine circulante. Dans cette étude nous démontrons que les souris KO MAO-A soumises à une sténose aortique présentent une augmentation des taux myocardiques de sérotonine et une exacerbation de la réponse hypertrophique sans dysfonction ventriculaire. Cette réponse hypertrophique exacerbée, ainsi que les stigmates histologiques et biologiques moléculaires qui accompagnent le remodelage ventriculaire, sont prévenus par l'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés au rôle du récepteur 5-HT_{2A} dans la phase de transition entre hypertrophie concentrique compensatrice et hypertrophie excentrique avec dysfonction ventriculaire, après sténose aortique, chez des souris sauvages C57/Bl6. Dans cette étude, nous montrons que l'inhibition sélective du récepteur 5-HT_{2A} par le M100907 prévient l'apparition d'une hypertrophie concentrique après sténose aortique mais précipite l'évolution vers l'insuffisance cardiaque. Ces données suggèrent que le récepteur 5-HT_{2A} pourrait exercer un effet protecteur au cours de la surcharge barométrique en favorisant l'hypertrophie compensatrice et en prévenant la dysfonction ventriculaire.

En se basant sur les résultats précédents, nous avons développé un essai clinique visant à mesurer la corrélation entre les niveaux circulants de sérotonine et la réponse hypertrophique du myocarde au cours du rétrécissement aortique serré chez l'homme. Cette étude est financée par la région Midi-Pyrénées.

Nos travaux démontrent que la sérotonine, via son récepteur 5-HT_{2A}, participe au remodelage ventriculaire au cours de la surcharge barométrique en favorisant l'hypertrophie myocardique compensatrice.

Summary

Heart failure is a systemic disease involving neuro-hormonal adaptive systems that participate to ventricular remodeling and maintain cardiac dysfunction. Plasmatic and platelets serotonin are increased in patients with heart failure suggesting a role during ventricular remodeling.

The aim of this work was to specify the *in vivo* role of serotonin and its receptor 5-HT_{2A} during ventricular remodeling that is a determinant step of heart failure.

In a first part, we studied the cardiac phenotype of mice knock-out for monoamine oxidase – A (MAO – A, serotonin degradation enzyme) which display elevated circulating levels of serotonin. With this study, we showed that mice knock-out for MAO – A display elevated intramyocardial serotonins levels with exacerbated hypertrophic response without myocardial dysfunction. This increased hypertrophic response and the histological and molecular signs of ventricular remodeling are prevented by selective 5-HT_{2A} receptor antagonist administration.

In a second part, we explored the role of the 5-HT_{2A} receptor during the transition phase between adapted concentric hypertrophic response and non-adapted eccentric hypertrophic response with ventricular dysfunction after aortic banding in C57/Bl6 wild type mice. In this study, we showed that selective 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907 administration prevents concentric hypertrophic response after aortic banding but precipitates evolution to heart failure. These results suggest that 5-HT_{2A} receptor could have a protecting effect during pressure overload by favoring adapted hypertrophy and preventing from ventricular dysfunction.

From these results, we designed a clinical trial, funded by Conseil Régional Midi-Pyrénées, aim to assess correlation between serotonin circulating levels and myocardial hypertrophic response during aortic stenosis in human .

Findings show that the serotonin and its 5-HT_{2A} receptor participate to ventricular remodeling during pressure overload by favoring adapted myocardial hypertrophic response.

Table des matières

| | |
|--|------------|
| RESUME | 5 |
| SUMMARY | 9 |
| TABLE DES MATIERES | 11 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 15 |
| LISTE DES FIGURES | 21 |
| LISTE DES TABLEAUX | 25 |
| INTRODUCTION GENERALE | 27 |
| I DEFINITION ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE | 30 |
| I.A LES SYSTEMES D'ADAPTATION NEURO-HORMONAUX | 32 |
| I.B LES SYSTEMES NEURO-HORMONAUX DE CONTRE-REGULATION | 40 |
| I.C LE REMODELAGE VENTRICULAIRE | 43 |
| I.D CONCLUSION | 62 |
| II LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE | 63 |
| II.A LE METABOLISME DE LA SEROTONINE | 63 |
| II.B FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA SEROTONINE | 69 |
| II.C CONCLUSION | 82 |
| III LA SEROTONINE ET LE REMODELAGE VENTRICULAIRE | 83 |
| III.A LES EFFETS RECEPTEUR-DEPENDANTS | 83 |
| III.B LES EFFETS RECEPTEURS-INDEPENDANTS | 87 |
| III.C CONCLUSION | 90 |
| IV OBJECTIFS DE LA THESE | 91 |
| TRAVAUX DE RECHERCHE FONDAMENTALE : PREMIERE ETUDE | 93 |
| AVANT-PROPOS | 95 |
| INTRODUCTION | 95 |
| MATERIALS AND METHODS | 97 |
| MATERIALS | 97 |
| EXPERIMENTAL ANIMALS | 97 |
| ASCENDANT AORTIC BANDING. | 97 |
| ECHOCARDIOGRAPHY | 98 |
| HISTOMORPHOLOGY | 98 |
| MEAN ARTERIAL PRESSURE | 98 |
| REAL-TIME QUANTITATIVE PCR | 98 |
| ASSAYS OF 5-HT | 99 |
| ASSAYS OF MAO ACTIVITY | 100 |
| WESTERN BLOT | 100 |
| STATISTICAL ANALYSIS | 100 |
| RESULTS | 100 |
| CHARACTERIZATION OF CARDIAC MAO ACTIVITIES, CARDIAC 5-HT RECEPTORS AND WHOLE-BLOOD 5-HT IN MAO-A KO MICE | 100 |
| INCREASED HYPERTROPHIC RESPONSE TO AORTIC BANDING IN MAO-A KO MICE | 103 |
| INCREASED FIBROSIS IN RESPONSE TO AORTIC BANDING IN MAO-A KO MICE. | 106 |
| EFFECT OF PRESSURE OVERLOAD ON CARDIAC SEROTONIN LEVELS AND SEROTONIN RECEPTORS EXPRESSION | 108 |
| ROLE OF SEROTONIN RECEPTOR ANTAGONISTS IN PRESSURE OVERLOAD-HYPERTROPHY | 109 |

| | |
|--|------------|
| DISCUSSION | 112 |
| CONCLUSION | 114 |
| <u>TRAVAUX DE RECHERCHE FONDAMENTALE : DEUXIEME ETUDE</u> | 117 |
| AVANT-PROPOS | 118 |
| INTRODUCTION | 118 |
| MATERIELS ET METHODES | 121 |
| MATERIELS | 121 |
| ANIMAUX | 121 |
| STENOSE AORTIQUE | 121 |
| ÉCHOCARDIOGRAPHIES | 122 |
| HISTOLOGIE | 122 |
| STATISTIQUES | 123 |
| RESULTATS | 123 |
| PHASE D'HYPERTROPHIE CONCENTRIQUE | 123 |
| PHASE D'HYPERTROPHIE EXCENTRIQUE | 126 |
| DISCUSSION | 127 |
| <u>TRAVAUX DE RECHERCHE CLINIQUE : ETUDE SERAOPI</u> | 131 |
| AVANT-PROPOS | 132 |
| JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE | 132 |
| LE RETRECISSEMENT AORTIQUE SERRE | 132 |
| HYPOTHESES DE LA RECHERCHE ET RESULTATS ATTENDUS | 134 |
| RAPPORT BENEFICE / RISQUE | 136 |
| RETOMBEES ATTENDUES | 136 |
| OBJECTIFS DE LA RECHERCHE | 137 |
| OBJECTIF PRINCIPAL | 137 |
| OBJECTIFS SECONDAIRES | 137 |
| SCHEMA DE LA RECHERCHE | 137 |
| CRITERES D'ELIGIBILITE | 138 |
| CRITERES D'INCLUSION | 138 |
| CRITERES DE NON INCLUSION | 139 |
| MODALITES DE RECRUTEMENT | 140 |
| TRAITEMENTS ET PROCEDURES ASSOCIE(E)S AUTORISE(E)S | 141 |
| TRAITEMENTS INTERDITS : | 144 |
| CRITERES DE JUGEMENT | 144 |
| CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL | 144 |
| CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES | 145 |
| DEROULEMENT DE LA RECHERCHE | 147 |
| CALENDRIER DE LA RECHERCHE | 147 |
| TABLEAU RECAPITULATIF DU SUIVI PATIENT | 148 |
| VISITE DE PRE-INCLUSION | 149 |
| VISITE D'INCLUSION | 150 |
| CONTRAINTES LIEES A LA RECHERCHE ET INDEMNISATION DES SUJETS | 155 |
| REGLES D'ARRET DE LA RECHERCHE | 155 |
| COLLECTION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES | 156 |
| GESTION DES EVENEMENTS INDESIRABLES ET DES FAITS NOUVEAUX | 157 |
| DEFINITIONS | 157 |
| DESCRIPTION DES EVENEMENTS INDESIRABLES | 158 |
| CONDUITE A TENIR EN CAS D'EVENEMENT INDESIRABLE OU DE FAIT NOUVEAU | 159 |
| DECLARATION ET ENREGISTREMENT DES EVENEMENTS INDESIRABLES GRAVES INATTENDUS ET DES FAITS NOUVEAUX | 160 |
| ASPECTS STATISTIQUES | 161 |
| CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE | 161 |
| METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES | 161 |
| DROITS D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE | 162 |
| ACCES AUX DONNEES | 162 |

| | |
|---|------------|
| DONNEES SOURCE | 162 |
| CONFIDENTIALITE DES DONNEES | 162 |
| CONTROLE ET ASSURANCE QUALITE | 163 |
| CONSIGNES POUR LE RECUEIL DES DONNEES | 163 |
| SUIVI DE LA RECHERCHE | 163 |
| CONTROLE DE QUALITE | 164 |
| AUDIT ET INSPECTION | 164 |
| CONSIDERATIONS ETHIQUES | 165 |
| AMENDEMENT AU PROTOCOLE | 166 |
| TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE | 166 |
| TRAITEMENT DES DONNEES | 166 |
| CONSERVATION DES DOCUMENTS RELATIFS A LA RECHERCHE | 167 |
| REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION | 168 |
| COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES | 168 |
| COMMUNICATION DES RESULTATS AUX PATIENTS | 168 |
| CESSION DES DONNEES | 168 |
| CONCLUSION | 168 |
| | |
| CONCLUSION GENERALE | 169 |
| | |
| ANNEXE 1 : COMPLEMENTS D'ETUDE SERAOPI | 173 |
| | |
| <u>ANNEXE 1A</u> : TABLEAU RECAPITULATIF DES TRAITEMENTS INTERDITS AU COURS DE L'ETUDE SERAOPI | 174 |
| <u>ANNEXE 1B</u> : TECHNIQUE DE DOSAGE HPLC DANS L'ETUDE SERAOPI | 176 |
| <u>ANNEXE 1C</u> : PROTOCOLE DE TRAITEMENT, DE CONGELATION ET DE STOCKAGE DES PRELEVEMENTS DANS L'ETUDE SERAOPI | 180 |
| | |
| ANNEXE 2 : AUTRES PUBLICATIONS | 181 |
| | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 185 |

Liste des abréviations

| | |
|---------|--|
| 5-HIAA | Acide 5-hydroxyindoacétique |
| 5-HT | 5-hydroxytryptamine (sérotonine) |
| 5-HTP | 5-hydroxytryptophane |
| 5-HTT | 5-hydroxytryptamine transporteur |
| AADC | Aromatic Amino acid Decarboxylase |
| ACTH | Adrénocorticotropine |
| AFSSAPS | Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé |
| AMP | Adénosine monophosphate |
| ANP | Atrial natriuretic peptide |
| ARAI | Antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II |
| AT | Angiotensine |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BNP | Brain natriuretic peptide |
| CaMK | Calmodulin-dependent kinase |
| CCVG | Chambre de chasse du ventricule gauche |
| CIC | Centre d'investigation clinique |
| CK-MB | Creatin kinase muscle brain |
| CNP | Peptide natriurétique de type C |
| CMD | Cardiomyopathie dilatée |
| CMF | Cytométrie de flux |
| CML | Cellules musculaires lisses |
| COAT | Collagen and thrombin activated platelets |
| COMT | Catechol-o-methyltransferase |
| DNP | Dendroaspis natriuretic peptide |
| DTDVG | Diamètre télédiastolique du ventricule gauche |
| EC | Excitation – contraction |
| ECA | Enzyme de conversion de l'angiotensine |
| E/R | Index de remodelage ventriculaire épaisseur/rayon |
| ERO | Espèces réactives de l'oxygène |

| | |
|-------|---|
| ERK | Extracellular-signal regulated kinase |
| ET | Endothéline |
| Fbg | Fibrinogène |
| FR | Fraction de raccourcissement |
| FS | Fractional shortening |
| FV | Facteur V |
| GMPc | Guanosine monophosphate cyclique |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| GSK | Glycogen synthase kinase |
| HDAC | Histone deacetylases |
| HPLC | High pressure liquid chromatography |
| HVA | Acide homovanillique |
| HW/BW | Heart/body weight |
| HTA | Hypertension artérielle |
| IC | Insuffisance cardiaque |
| IDM | Infarctus du myocarde |
| IEC | Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine |
| IGF | Insulin-like Growth Factor |
| IL | Interleukine |
| IP3 | Inositol triphosphate |
| IVST | Interventricular septum thickness |
| JNK | c-Jun N-terminal kinase |
| KO | Knock out |
| L-trp | L-tryptophane |
| MAO | Monoamine oxydase |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MEC | Matrice extracellulaire |
| MEF | Myocyte enhancer factor |
| MEK | Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal receptor-regulated kinase |

| | |
|---------|--|
| MHC | Myosin heavy chain |
| MKK | MAPK kinase |
| MMP | Matrix metalloproteinase |
| NA | Noradrénaline |
| NADPH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NAT | N-acétyltransférase |
| NFAT | Nuclear factor of activated T cells |
| NFS | Numération-formule sanguine |
| NO | Monoxyde d'azote |
| NOS | Nitric oxide synthase |
| NPY | Neuropeptide Y |
| PACAP | Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PDK | Phosphoinositide-dependent kinase |
| PE | Polyethylene |
| PEA | Phenylethylamine |
| PKB | Protéine kinase B |
| PP | Paroi postérieure |
| PS | Phosphatidylsérine |
| PWT | Posterior wall thickness |
| RA | Récepteurs adrénergiques |
| RAT1 | Récepteur à l'angiotensine de type 1 |
| RAT2 | Récepteur à l'angiotensine de type 2 |
| RCPG | Récepteur couplé à la protéine G |
| RPM | Rotations par minute |
| RS | Réticulum sarcoplasmique |
| RT-PCR | Reverse transcriptase – Polymerase chain reaction |
| S6K | S6 kinase |
| SERCA2A | Sarco/endoplasmique réticulum calcium ATPase-2A |

| | |
|-------|---|
| SIV | Septum interventriculaire |
| SNC | Système nerveux central |
| SNS | Système nerveux sympathique |
| SRAA | Système rénine – angiotensine – aldostérone |
| TGase | Transglutaminases |
| TGF | Transforming growth factor-béta |
| TPH | Tryptophane hydroxylase |
| TIMP | Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| Tsp | Thrombospondine |
| U2 | Urotensine II |
| VIH | Virus d'Immunodéficience Acquis |
| VMAT | Transporteur vésiculaire des monoamines |
| WT | Wild type |

Liste des figures

- Figure 1** : Le système rénine-angiotensine-aldostérone _____ page 34
- Figure 2** : Systèmes d'adaptation neuro-hormonaux et insuffisance cardiaque _____ page 37
- Figure 3** : Modèle de remodelage ventriculaire en fonction du type de surcharge imposée au ventricule _____ page 44
- Figure 4** : Schéma des voies de signalisation intracellulaires actuellement connues qui coordonnent la réponse hypertrophique du myocarde _____ page 47
- Figure 5** : Evolution de l'hypertrophie des cardiomyocytes au cours du remodelage ventriculaire _____ page 53
- Figure 6** : Architecture des cardiomyocytes en réponse à la surcharge hémodynamique _____ page 54
- Figure 7** : Relations entre fibres de collagène de la matrice extracellulaire et cardiomyocytes _____ page 56
- Figure 8** : Fibrose myocardique au cours du remodelage ventriculaire _____ page 57
- Figure 9** : Effets des espèces réactives de l'oxygène sur le cardiomyocyte _____ page 59
- Figure 10** : Voies de synthèse et de dégradation de la sérotonine _____ page 63
- Figure 11** : Mécanisme du transport de la sérotonine par son transporteur 5-HTT _____ page 65
- Figure 12** : Classification actuelle des récepteurs à la sérotonine et principales voies de signalisation _____ page 68
- Figure 13** : Mode d'action de la sérotonine dans l'intestin _____ page 70
- Figure 14** : Rôle de la sérotonine dans la formation des plaquettes COAT _____ page 73
- Figure 15** : Exocytose des granules α plaquettaires induite par la sérotonine durant le processus d'agrégation plaquettaire _____ page 74
- Figure 16** : Régulation du système cardiovasculaire par la sérotonine _____ page 75
- Figure 17** : Contrôle des fonctions cardiovasculaires par le centre cardiovasculaire _____ page 76
- Figure 18** : Régulation du tonus vasculaire par la sérotonine _____ page 79
- Figure 19** : Localisation des récepteurs sérotoninergiques dans le cœur humain _____ page 80
- Figure 20** : Cardiomyopathie dilatée développée par les souris 5-HT_{2B}^{-/-} _____ page 84

Figure 21 : Mécanismes d'action de la sérotonine menant à l'hypertrophie des cardiomyocytes_ _____ **page 87**

Figure 22 : Effets hypothétiques des concentrations de sérotonine sur le passage d'une voie de signalisation récepteur-dépendante à une voie dépendante de la monoamine oxydase _____ **page 89**

Figure 23 : Characteristics of MAO-A KO mice _____ **page 101**

Figure 24 : Measurements of cardiac hypertrophy induced by aortic banding in WT and MAO-A KO mice _____ **page 104**

Figure 25 : Myocardial fibrosis in WT and MAO-A KO mice _____ **page 106**

Figure 26 : Cardiac 5-HT levels and 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} mRNA expression after aortic banding in WT and KO mice _____ **page 108**

Figure 27 : Effect of Ketanserin and M100907 on cardiac hypertrophy induced by aortic banding _____ **page 110**

Figure 28 : Evolution des paramètres morphologiques échocardiographiques après 4 semaines de chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907 _____ **page 123**

Figure 29 : Taille des cardiomyocytes (μm^2) après 4 semaines de chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907 _____ **page 124**

Figure 30 : Evolution des paramètres morphologiques échocardiographiques après 8 semaines de chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907 _____ **page 125**

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution temporelle de la mortalité (%) ajustée à l'âge parmi les hommes et les femmes âgés de 65 à 74 ans ayant survécus au moins 30 jours après un premier épisode d'IC (étude de Framingham)_____ **page 28**

Tableau 2 : Principales causes menant à la dysfonction cardiaque_____ **page 30**

Tableau 3 : Primer séquences_____ **page 98**

Tableau 4 : Echocardiographic and Mean Arterial Pressure measurements in WT and KO mice after aortic banding_____ **page 102**

Tableau 5 : Morphometric analysis in WT and KO mice_____ **page 103**

Tableau 6 : Morphometric measurements in WT and KO mice after administration of vehicle or 5-HT_{2A} antagonists ketanserin or M100907 by osmotic pumps_____ **page 109**

Tableau 7 : Index de remodelage ventriculaire épaisseur/rayon 4 semaines après chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907_____ **page 122**

Tableau 8 : Index de remodelage ventriculaire épaisseur/rayon 8 semaines après chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907_____ **page 126**

Tableau 9 : Récapitulatif du calendrier de la recherche pour les sujets du groupe 1_____ **page 147**

Tableau 10 : Récapitulatif du calendrier de la recherche pour les sujets des groupes 2 à 4_____ **page 148**

Tableau 11 : Récapitulatif des notifications des événements indésirables dans le cadre de la recherche biomédicale_____ **page 159**

Introduction générale

La diminution de la prévalence de la dénutrition, la rétrocession des grandes pandémies et l'amélioration de la prise en charge des pathologies infectieuses avec l'avènement des antibiotiques, en augmentant l'espérance de vie, ont déplacé le pronostic global de la population vers celui des maladies dégénératives et des pathologies créées par l'homme. L'amélioration continue du contexte économique et le changement dans les profils d'activité professionnelle ont conduit à un changement radical des modes de vies à l'origine de profondes modifications dans l'alimentation, le niveau d'activité physique et le comportement tel que le tabagisme. Ces modifications du profil de risque associées au vieillissement de la population sont à l'origine de l'émergence des pathologies hypertensives et de l'athérosclérose [1], expliquant que malgré l'amélioration du niveau de santé publique et des prises en charge médicales ciblées, les maladies cardiovasculaires restent la première cause de mortalité à travers le monde avec plus de 16,7 millions de décès par an, soit 29,2 % des décès totaux annuels (Organisation Mondiale de la Santé - <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/>).

Parallèlement au vieillissement de la population, l'amélioration de la prise en charge des pathologies coronariennes a fait de l'insuffisance cardiaque (IC) l'issue convergente de la plupart des maladies cardiovasculaires. Avec une prévalence estimée entre 1 et 2 % de la population des pays occidentaux et une incidence en augmentation approchant les 5 à 10 pour 1000 habitants par an [2], l'IC concernerait 15 millions de personnes en Europe [3]. Outre le problème majeur de santé publique qu'elle représente au travers des excédents d'hospitalisation dont elle est la source, l'IC est à l'origine d'une diminution de la qualité de vie, de dépendance et d'une aggravation du pronostic, la plaçant au même rang que la plupart des maladies dégénératives comme le cancer [4]. Ainsi, malgré une amélioration du pronostic depuis les 50 dernières années, la mortalité à 5 ans ajustée à l'âge des patients ayant survécu à un premier épisode d'IC était de 54 % pour les hommes et 40 % pour les femmes dans l'étude de Framingham (Tableau 1) [5]. La survie à 5 ans après un premier épisode d'IC varie en fonction de la population observée, la définition et le mode de diagnostic de l'IC, l'étiologie et les co-morbidités, allant de 35 à 59 % selon les études [2].

| PERIOD | 1-YEAR MORTALITY | | 5-YEAR MORTALITY | |
|-----------|--|-----------|------------------|------------|
| | MEN | WOMEN | MEN | WOMEN |
| | percent (95 percent confidence interval) | | | |
| 1950–1969 | 20 (10–29) | 13 (4–21) | 66 (52–76) | 47 (32–59) |
| 1970–1979 | 30 (18–41) | 14 (5–22) | 71 (58–80) | 51 (36–62) |
| 1980–1989 | 25 (14–34) | 19 (9–28) | 60 (48–69) | 46 (33–56) |
| 1990–1999 | 18 (9–26) | 16 (7–25) | 54 (41–64) | 40 (27–50) |

Tableau 1 : Evolution temporelle de la mortalité (%) ajustée à l'âge parmi les hommes et les femmes âgés de 65 à 74 ans ayant survécu au moins 30 jours après un premier épisode d'IC (étude de Framingham).

Extrait de Levy et coll., New England Journal of Medicine 2002 [5]

I Définition et physiopathologie de l'insuffisance cardiaque

L'IC est un syndrome associant une série de symptômes causés par la dysfonction cardiaque, résultant en une réduction de la survie. La dysfonction cardiaque, point de départ de l'IC, est à l'origine d'une inadéquation entre les besoins et les apports métaboliques de l'organisme, source des symptômes tels que la dyspnée d'effort ou de repos, l'asthénie et les signes de rétention hydro-sodée.

Les principales causes, aiguës ou chroniques, menant à la dysfonction cardiaque sont listées dans le tableau 2 [3].

| |
|--|
| <u>Pathologies coronariennes</u> |
| <u>Hypertension artérielle</u> |
| <u>Cardiomyopathies</u> |
| <u>Génétiques/familiales</u> |
| Cardiomyopathies hypertrophiques idiopathiques |
| Cardiomyopathies dilatées idiopathiques |
| Cardiomyopathies restrictives |
| <u>Acquises</u> |
| Myocardites |
| <u>Médicaments</u> |
| β -bloquants |
| Antagonistes calciques |
| Anti-arythmiques |
| <u>Toxiques</u> |
| Alcool |
| Médications cyto-toxiques |
| Cocaïne |
| Métaux lourds (mercure, cobalt, arsenic) |
| <u>Endocrines</u> |
| Diabète |
| Hypo/hyperthyroïdie |
| Syndrome de Cushing |
| Insuffisance surrénale |
| Excès d'hormone de croissance |
| Péochromocytome |
| <u>Nutrition</u> |
| Déficience en thiamine, selenium, carnitine |
| Obésité |
| Cachexie |
| <u>Infiltrations</u> |
| Sarcoïdose |
| Amylose |
| Hémochromatose |
| <u>Autres</u> |
| Maladie de Chagas |
| Infection VIH |
| Connectivites |
| Cardiomyopathie du péri-partum |
| Insuffisance rénale terminale |

Tableau 2 : Principales causes menant à la dysfonction cardiaque.

D'après Dickstein et coll., European Heart Journal 2008 [3]

Bien que les concepts physiopathologiques de l'IC soient perpétuellement revus aux grés des évolutions de la recherche, la plupart des théories s'accordent sur l'altération des performances globales du myocarde comme point de départ de l'activation de mécanismes d'adaptation neuro-hormonaux entretenant le déclin des performances myocardiques. En pratique, ce schéma physiopathologique se traduit par une diminution du débit cardiaque et une vasoconstriction périphérique excessive entretenant la surcharge mécanique en pression et en volume du myocarde. Sur la bases de ces théories, l'IC n'est plus considérée comme un simple problème mécanique cardiaque, mais comme une pathologie cardio-circulatoire impliquant des mécanismes d'adaptation qui conduisent des modifications biologiques et architecturales du myocarde, regroupées sous le terme de remodelage ventriculaire. Le remodelage ventriculaire représente ainsi la transition entre un phénomène physiologique d'adaptation et un phénomène pathologique d'altération expliquant l'évolution progressive de l'IC [6].

1.A Les systèmes d'adaptation neuro-hormonaux

Les mécanismes d'adaptation neuro-hormonaux incluent de nombreuses voies tendant au maintien du débit cardiaque via une rétention hydro-sodée, une vasoconstriction périphérique, une augmentation de la contractilité myocardique, l'ensemble participant au remodelage ventriculaire.

1.A.1 Le système nerveux sympathique

Le déclin du débit cardiaque dans l'IC active une série de mécanismes de compensation visant à maintenir l'homéostasie cardio-vasculaire. L'un des plus important de ces mécanismes d'adaptation est l'activation du système nerveux sympathique (SNS) ou adrénérique, survenant précocement au cours de l'évolution de l'IC.

Dans les conditions physiologiques, un débit cardiaque normal permet d'assurer une pression artérielle suffisamment haute et une pression de remplissage ventriculaire suffisamment basse au maintien du tonus inhibiteur sur le SNS des barorécepteurs du sinus carotidien et de l'arche aortique, et des mécanorécepteurs cardio-pulmonaires. Le maintien d'une pression de perfusion suffisante permet de

diminuer l'activation des chémorécepteurs périphériques et des métabolorécepteurs musculaires, principaux activateurs du SNS. Aussi, les sujets sains présentent un tonus sympathique bas et une haute variabilité de la fréquence cardiaque au repos. Dans l'IC, le tonus inhibiteur des barorécepteurs et des mécanorécepteurs diminue au dépend du tonus activateur périphérique entraînant une augmentation du tonus sympathique à l'origine d'une perte de la variabilité de la fréquence cardiaque et d'une augmentation des résistances artérielles périphériques. L'activation du SNS s'accompagne d'une augmentation des taux circulants de noradrénaline (NA), un puissant neurotransmetteur adrénergique, via une augmentation du relargage et une diminution de la recapture au niveau des terminaisons nerveuses adrénergiques [7].

Le SNS exerce ses effets biologiques via l'action de 9 sous-types de récepteurs adrénergiques : 3 récepteurs α_1 (α_{1A} , α_{1B} , et α_{1D}), 3 récepteurs α_2 (α_{2A} , α_{2B} , et α_{2C}), et 3 récepteurs β (β_1 , β_2 , et β_3) [8]. Tous les récepteurs adrénergiques sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires exerçant leurs effets par un couplage avec une protéine G hétérotrimérique. Le cœur humain contient des récepteurs β_1 , β_2 , et β_3 [9]. Les sous-types β_1 et β_2 sont exprimés avec un ratio de 70:30, et leur stimulation augmente la contractilité cardiaque (effet inotrope positif), la fréquence cardiaque (effet chronotrope positif), la relaxation cardiaque (effet lusitrope positif) et la vitesse de conduction du nœud auriculo-ventriculaire (effet dromotrope positif). Les récepteurs β_3 sont normalement inactifs dans les conditions physiologiques [10]. Dans le cœur humain, l'activation des récepteurs β_1 et β_2 est le plus puissant mécanisme physiologique permettant l'augmentation des performances myocardiques. Les récepteurs β_1 activent les protéines G_s alors que les récepteurs β_2 activent les protéines G_i et G_s . Le cœur humain exprime aussi les récepteurs α_{1A} , α_{1B} en densité inférieure ($\approx 20\%$) à celle des récepteurs β [11]. Leur rôle physiologique reste mal connu, mais les récepteurs α_1 participeraient au remodelage ventriculaire [11]. Les récepteurs α_1 sont largement exprimés au niveau des gros vaisseaux artériels, incluant aorte, artère pulmonaire, artères digestives et artères coronaires, contribuant de façon majeure à la régulation du flux sanguin via la modulation de la vasoconstriction [12]. Les récepteurs α_{1A} et α_{1B} se couplent à la famille des protéines G_q .

L'augmentation de l'activité du SNS permet l'activation des récepteurs β_1 et β_2 se traduisant par une augmentation de la fréquence cardiaque et de l'inotropisme, à l'origine d'une augmentation du débit cardiaque. L'activation des récepteurs α_1 est

à l'origine d'un effet inotrope positif modeste mais d'une importante vasoconstriction artérielle périphérique. Aussi, l'activation du SNS augmente la contraction et la relaxation, et maintient la pression artérielle, au prix d'une augmentation de la dépense énergétique du myocarde pouvant favoriser l'ischémie myocardique. L'augmentation du tonus sympathique favorise la survenue de troubles du rythme ventriculaires, sources de mort subite, particulièrement en cas d'ischémie myocardique.

Aussi, l'activation du SNS permet une adaptation à court terme à une dysfonction myocardique aiguë, mais devient à long terme un phénomène maladaptatif.

1.A.2 Le système rénine – angiotensine – aldostérone

En comparaison au SNS, le système rénine – angiotensine – aldostérone (SRAA) est activé plus tardivement au cours de l'IC. L'activation du SRAA passerait par un phénomène d'hypoperfusion rénale et de diminution du sodium filtré atteignant la *macula densa* au niveau du tubule distal, parallèlement à la stimulation sympathique rénale, à l'origine d'une augmentation du relargage de rénine au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire. La rénine permet alors le clivage de l'angiotensinogène synthétisée par le foie en un décapeptide biologiquement inactif : l'angiotensine I. L'angiotensine I peut également être synthétisée par une voie indépendante de la rénine, à partir d'une conversion enzymatique de l'angiotensinogène en angiotensine I par la kallibréine et la cathepsine G. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) clive l'angiotensine I en un octopeptide biologiquement actif : l'angiotensine II (AT2) (Figure 1). L'AT2 peut être synthétisée par une voie indépendante de l'ECA, par une activation de chymases. Ces voies secondaires d'activation joueraient un rôle important au niveau du myocarde, particulièrement en cas d'augmentation des taux circulants de rénine et d'angiotensine I induite par l'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) dans le traitement de l'IC. L'AT2, par un mécanisme de protéolyse, va pouvoir libérer deux autres fragments protéiques biologiquement actifs : l'angiotensine III et l'angiotensine IV, provoquant avec l'AT2 une vasoconstriction périphérique et une dysfonction endothéliale. L'AT2 va exercer ses effets en se liant à deux récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) nommés récepteur à l'angiotensine de type 1 (RAT1) et récepteur à l'angiotensine de type 2

(RAT2). Les deux types de récepteurs à l'angiotensine sont présents au niveau du myocarde avec un ratio 2:1 pour les RAT2, alors que les RAT1 prédominent au niveau vasculaire. Au niveau myocardique, les RAT1 sont préférentiellement localisés au niveau du système nerveux myocardique et dans les cardiomyocytes, alors que les RAT2 sont majoritairement localisés au niveau des fibroblastes et de l'interstitium. L'activation des RAT1 est à l'origine d'une vasoconstriction, d'une augmentation de la croissance cellulaire, d'une sécrétion d'aldostérone et d'un relargage de catécholamines. L'activation des RAT2 est à l'origine d'une vasodilatation, d'une inhibition de la croissance cellulaire, d'une natriurèse et d'un relargage de bradykinine. L'IC s'accompagne d'une diminution des RAT1 et d'une augmentation des RAT2 résultant en une chute du ratio RAT1/RAT2 [13].

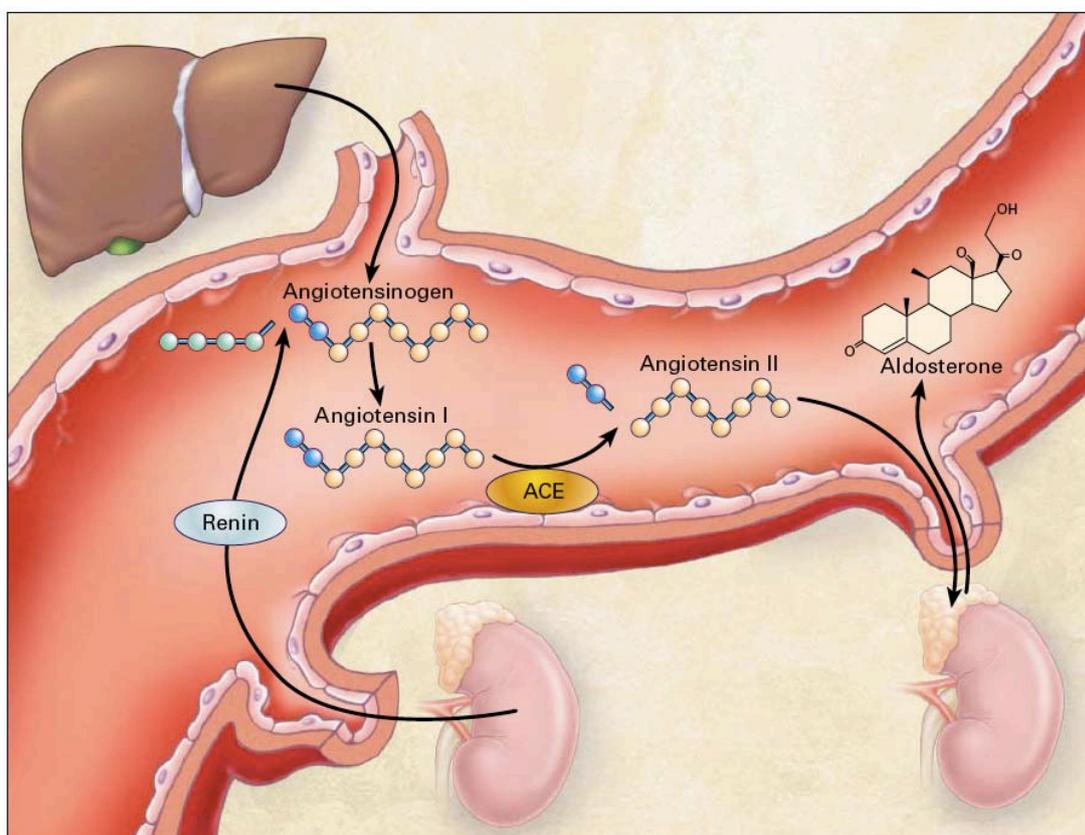


Figure 1 : Le système rénine-angiotensine-aldostérone

L'angiotensinogène est synthétisé par le foie puis clivé dans la circulation sanguine en angiotensine I par la rénine synthétisée par les cellules juxta-glomérulaires rénales. L'angiotensine I est à son tour clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine située au niveau des cellules endothéliales en angiotensine II. L'angiotensine II stimule la sécrétion d'aldostérone au niveau du cortex surrénalien. La production d'aldostérone est également stimulée par le potassium, la corticotropine, l'endothéline et les catécholamines comme la noradrénaline.

ACE : *angiotensin-converting enzyme* (enzyme de conversion de l'angiotensine)

Extrait de Weber, N Eng J Med 2001 [14]

L'AT2 va jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie circulatoire à court terme, mais sa surexpression à long terme est à l'origine d'une maladaptation aboutissant à un effet profibrosant au niveau du cœur, des reins et des autres organes. L'AT2 est également à l'origine d'une aggravation de l'activation neuro-hormonale, via le relargage de NA à partir des terminaisons nerveuses sympathiques et la stimulation de la corticosurrénale pour la production d'aldostérone. Au même titre que l'AT2, l'aldostérone va permettre une adaptation à court terme de l'appareil circulatoire en stimulant la réabsorption de sodium en échange de potassium au niveau des segments distaux du néphron. Cependant, la surexpression prolongée d'aldostérone va avoir des effets délétères à long terme en provoquant hypertrophie et fibrose au niveau myocardique et vasculaire, participant à la diminution de la compliance myocardique et à l'augmentation de la rigidité vasculaire. Par ailleurs, l'aldostérone va participer à la dysfonction endothéliale, la dysfonction des barorécepteurs et l'inhibition de la recapture de la NA, l'ensemble participant à l'entretien et à la progression de l'IC [13].

1.A.3 Le système arginine-vasopressine

L'IC aboutit à une augmentation de la rétention hydro-sodée par le rein. La diminution du débit cardiaque est à l'origine d'une diminution du volume sanguin effectif artériel à l'origine outre d'une hypoperfusion rénale, d'une activation des barorécepteurs artériels activant les voies d'adaptation neuro-hormonales aboutissant à une augmentation de la volémie globale et une redistribution du volume sanguin circulant via l'hyperinflation hydro-sodée. L'activation continue du SNS au niveau rénal contribue à la diminution de la perfusion rénale, entretenant la réabsorption tubulaire de sodium et d'eau, et le relargage non osmotique d'arginine-vasopressine (AVP) par l'hypophyse postérieure réduisant l'excrétion d'eau libre et contribuant à l'aggravation de la vasoconstriction périphérique et à l'augmentation de la production d'endothéline 1 (ET-1) [15].

L'AVP est une hormone hypophysaire qui joue un rôle central dans la régulation de la clairance de l'eau libre et de l'osmolalité plasmatique. Dans les conditions physiologiques, l'AVP est relarguée en réponse à une augmentation de l'osmolalité plasmatique, aboutissant à une réabsorption d'eau à partir du tube

proximal. L'IC s'accompagne d'une augmentation des taux circulants d'AVP qui persiste malgré la correction de l'osmolalité plasmatique, via les voies d'activation non osmotiques, contribuant à l'apparition d'une hyponatrémie. Les effets cellulaires de l'AVP sont médiés par trois type de RCPG : V_{1a} , V_{1b} et V_2 . Le récepteur V_{1a} est le plus répandu des trois, retrouvé majoritairement au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, à l'origine d'une vasoconstriction, d'une activation plaquettaire et d'une activation des facteurs de croissance myocardiques. Le récepteur V_{1b} , de distribution plus limitée, est retrouvé préférentiellement au niveau du système nerveux central (SNC), à l'origine d'une modulation de la sécrétion d'adrénocorticotrophine (ACTH) par l'hypophyse antérieure. Le récepteur V_2 est retrouvé majoritairement au niveau des cellules épithéliales rénales où il exerce des effets antidiurétiques via la stimulation de l'adénylyl cyclase augmentant la densité des vésicules riches en canaux à l'eau (aquaporines) au niveau des membranes apicales [16].

Parallèlement, l'augmentation de l'activité sympathique au niveau rénal entretient l'activation du SRAA via l'augmentation de la production de rénine par le rein, malgré l'augmentation de la volémie globale. L'AT2 favorise la rétention hydrosodée par de multiples mécanismes rénaux incluant un effet direct sur le tubule proximal et une libération d'aldostérone augmentant la réabsorption sodique au niveau du tubule distal (Figure 2).

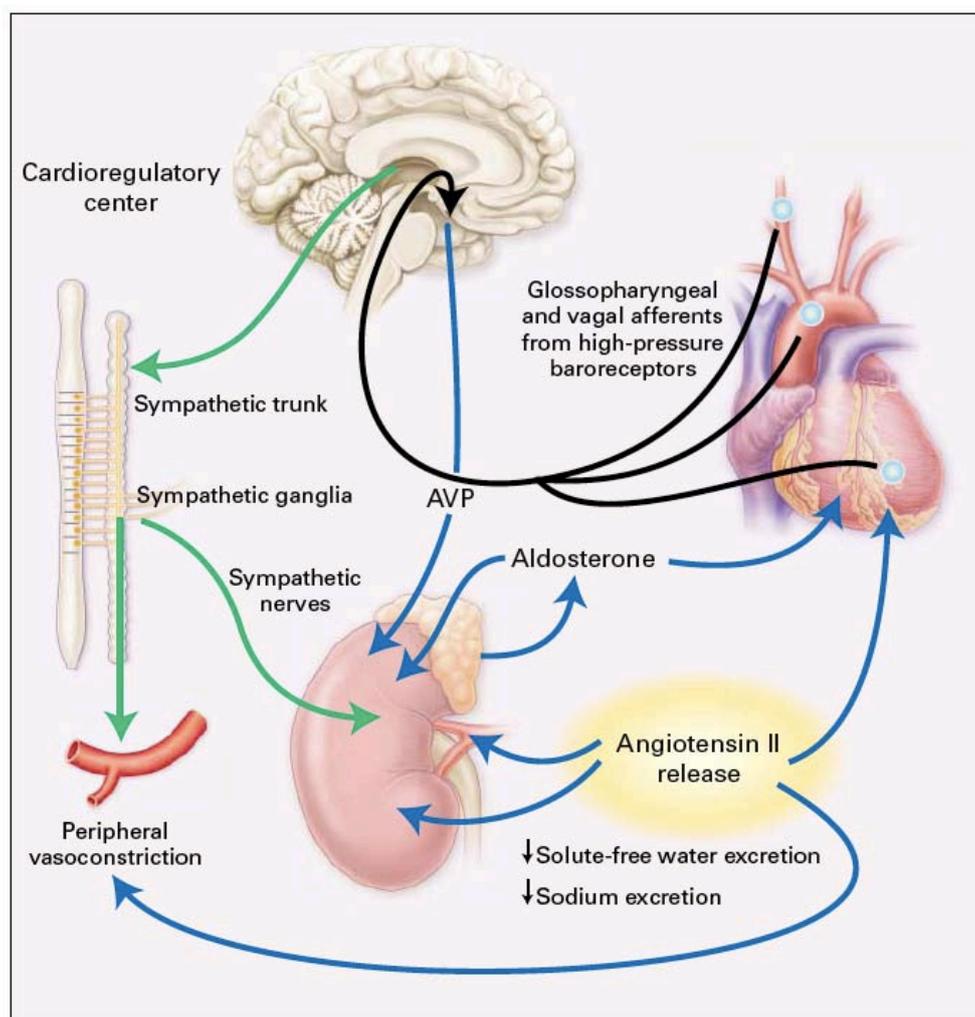


Figure 2 : Systèmes d'adaptation neuro-hormonaux et insuffisance cardiaque

La baisse de charge au niveau des barorécepteurs du ventricule gauche, des sinus carotidiens et de l'arche aortique génère un signal afférent qui stimule les centres cardio-régulateurs au niveau du cerveau, résultant en l'activation des voies efférentes du système nerveux sympathique. L'activation sympathique stimule le relargage d'arginine-vasopressine au niveau rénal ainsi que la vasoconstriction périphérique et rénale et la production d'angiotensine II. L'angiotensine II provoque une vasoconstriction et le relargage d'aldostérone à partir des cortico-surrénales, augmentant la réabsorption de sodium et participant au remodelage ventriculaire.

AVP : arginine-vasopressine

Extrait de Schrier et coll., N Eng J Med 1999 [15]

I.A.4 Les autres hormones vasoconstrictrices

Au cours de l'IC, l'interaction complexe entre système nerveux autonome et mécanismes d'autorégulation locaux tend à préserver la circulation cérébrale et cardiaque au dépend de la circulation cutané, musculaire, digestive et rénale. Ces

mécanismes de régulation de la circulation locale passent par une importante vasoconstriction d'organe. L'effort, en obligeant le maintien de la pression de perfusion au niveau musculaire, contribue à l'hypoperfusion rénale.

Le plus puissant stimulus de la vasoconstriction périphérique est le SNS via la libération de NA. D'autres vasoconstricteurs contribuent au maintien de l'homéostasie circulatoire, tels que l'AT₂, l'ET, le neuropeptide Y (NPY), l'urotensine II, le thromboxane A₂ et l'AVP. Conjointement à l'activation du SNS, l'augmentation de la concentration des hormones vasoconstrictrices contribue à la vasoconstriction artériolaire nécessaire au maintien de la pression de perfusion et, avec la vasoconstriction veineuse, au maintien de la pré-charge ventriculaire améliorant les performances myocardiques par la loi de Starling [13].

I.A.4.a L'endothéline

Il existe trois types d'ET (ET-1, ET-2 et ET-3), tous de puissants vasoconstricteurs. Principalement relargués par les cellules endothéliales, les ET peuvent aussi être synthétisés et relargués par d'autres types cellulaires comme les cardiomyocytes. Avec une expression ubiquitaire, l'ET-1 est le principal isoforme des ET. Au moins deux sous-types de récepteurs (type A et B) ont été identifiés au niveau du myocarde : le récepteur de type A favorise la vasoconstriction, la prolifération et l'hypertrophie cellulaire, la fibrose et l'augmentation de la contractilité myocardique alors que le récepteur de type B est impliqué dans la clairance de l'ET-1 et le relargage de monoxyde d'azote (NO) et prostacycline, hormones vasodilatatrices (voir chapitre I.B).

I.A.4.b Le neuropeptide Y

Le NPY est un peptide vasoconstricteur qui est relargué avec la NA des terminaisons nerveuses sympathiques. Le NPY provoque une vasoconstriction périphérique via son récepteur Y₁ localisé sur la partie post-jonctionnelle de la jonction neuro-effectrice sympathique au niveau des vaisseaux sanguins. Par ailleurs, le NPY potentialise les effets vasoconstricteurs d'autres messagers extracellulaires dont les agonistes α -adrénergiques et l'AT₂, et inhibe la libération d'acétylcholine des terminaisons nerveuses du système parasympathique au niveau du cœur.

Le rôle précis du NPY dans l'IC n'est pas connu.

I.A.4.c L'urotensine II

L'urotensine II (U2) est le plus puissant peptide cardiostimulateur identifié à ce jour. L'U2 exerce ses effets via le récepteur à l'urotensine augmentant le tonus vasculaire et la contractilité atriale et ventriculaire. L'U2 a une action trophique et/ou mitogénique sur les cellules musculaires lisses, les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques et son action vasoactive dépend de l'espèce et du lit vasculaire. L'U2 exerce un effet vasodilatateur dose-dépendant chez les sujets sains alors qu'elle exerce un effet vasoconstricteur dose-dépendant chez les sujets en IC, suggérant un rôle dans l'augmentation du tonus vasculaire périphérique dans l'IC [17].

I.B Les systèmes neuro-hormonaux de contre-régulation

La vasoconstriction neuro-hormonale est à l'origine de l'activation de mécanismes de contre-régulation vasodilatateurs dont les peptides natriurétiques, le monoxyde d'azote (NO), la bradykinine, l'adrénomédulline, l'apeline et les prostaglandines vasodilatatrices PGI₂ et PGE₂, avec pour objectif de contrer les effets délétères de la vasoconstriction neuro-hormonale [13].

I.B.1 Les peptides natriurétiques

L'un des plus importants systèmes de contre-régulation neuro-hormonaux est représenté par le système des peptides natriurétiques. Ce système est constitué de cinq peptides de structure similaires nommés *atrial natriuretic peptide* (ANP), urodilantine (un iso-forme de l'ANP), *brain natriuretic peptide* (BNP), peptide natriurétique de type C (CNP) et *dendroaspis natriuretic peptide* (DNP). L'ANP est produit principalement au niveau des oreillettes cardiaques, alors que le BNP est produit principalement au niveau des ventricules. Dans les conditions physiologiques, ANP et BNP fonctionnent comme des hormones natriurétiques, relarguées en réponse à l'augmentation du stress pariétal atrial et ventriculaire favorisé par la rétention sodée. D'autres facteurs neuro-hormonaux tels que l'AT2 ou

l'ET-1, ou physiologique tels que l'âge, le sexe ou la fonction rénale jouent également un rôle dans leur régulation. ANP et BNP ont des fonctions physiopathologiques sensiblement différentes : alors que l'ANP est sécrété dans des conditions d'augmentation aiguë du stress pariétal atrial, le BNP est sécrété dans des conditions d'augmentation chronique du stress pariétal ventriculaire et atrial [18]. L'action des peptides natriurétiques s'exerce par une liaison à trois types de récepteurs : le récepteurs A qui lie préférentiellement ANP et BNP, le récepteur B qui lie préférentiellement le CNP, entraînant tous deux natriurèse, vasorelaxation, inhibition de la rénine et de l'aldostérone, inhibition de la fibrose et augmentation de la relaxation cardiaque, et le récepteur C, servant à la clairance des peptides natriurétiques. Les peptides natriurétiques sont dégradés par l'endopeptidase neutre, exprimée au niveau de multiples tissus où elle est co-localisée avec l'ECA.

Les peptides natriurétiques ont donc un rôle majeur dans la diminution de la charge cardiaque via l'augmentation de l'excrétion hydro-sodée et l'inhibition du SRAA. Les peptides natriurétiques ont par ailleurs un rôle anti-hypertrophique et anti-fibrosant indépendant de leur effet sur la pression artérielle [19].

1.B.2 La voie du monoxyde d'azote

Le radical libre monoxyde d'azote (NO) est produit au niveau de l'endothélium par trois isoformes de la *nitric oxide synthase* (NOS), NOS₁, NOS₂ et NOS₃, tous présents au niveau du cœur. NOS₁ est retrouvée au niveau des tissus de conduction cardiaque et du réticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes. NOS₂ est une forme inductible normalement absente du myocarde mais synthétisée dans l'ensemble des cellules cardiaques en réponse aux cytokines pro-inflammatoires. NOS₃ est exprimée au niveau de l'endothélium coronaire, de l'endocarde et dans le sarcolemme et les membranes des T-tubules des cardiomyocytes. Le NO active une guanylate cyclase aboutissant à la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui va activer une cascade de signalisation intracellulaire via l'activation de protéines kinases G. En conditions physiologiques, la libération continue de NO par l'endothélium vasculaire aboutit à une vasodilatation périphérique via une relaxation des cellules musculaires lisses médiée par la GMPc, et contrebalance les effets des agents vasoconstricteurs périphériques permettant une vasodilatation appropriée en réponse à l'exercice. Dans l'IC, il existe une perte

de la réponse vasodilatatrice médiée par l'endothélium qui contribue à l'excès de vasoconstriction périphérique.

L'effet du NO sur le myocarde est complexe. Le NO module l'activité de plusieurs canaux calciques clés impliqués dans le couplage excitation – contraction et dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

I.B.3 La bradykinine

Les kinines sont des agents vasodilatateurs dérivés de précurseurs protéiques inactifs nommés kininogènes via l'action protéolytique d'enzymes appelées kallikréines. L'action biologique des kinines est médiée par deux récepteurs B₁ et B₂. La plupart des effets cardiovasculaires sont exercés par le récepteur B₂, largement distribué au niveau des tissus, se liant à la bradykinine et à la kallidine. La stimulation du récepteur B₂ aboutit à une vasodilatation médiée par l'activation de la NOS₃, de la phospholipase A2 et de l'adenylyl cyclase. La bradykinine jouerait un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire dans l'insuffisance cardiaque. La bradykinine est dégradée par l'ECA qui produit également l'AT2, expliquant en partie les effets bénéfiques des IEC dans l'IC [20].

I.B.4 L'adrénomédulline

L'adrénomédulline est un acide aminé vasoactif qui est retrouvé en grande quantité dans l'oreillette et les glandes surrénale et hypophysaire mais en quantité moindre dans le ventricule, le rein et le réseau vasculaire. L'adrénomédulline se lie à de nombreux RCPG dont le *calcitonin receptor-like* et un récepteur spécifique. Ces récepteurs sont présents dans de multiples tissus et cellules tels que l'endothélium et les cellules musculaires lisses vasculaires où ils exercent un effet compensateur dans l'IC en limitant les effets délétères de la vasoconstriction périphérique. Dans l'IC, l'adrénomédulline permettrait de diminuer la pression artérielle et les pressions de remplissage ventriculaires, d'améliorer la fonction rénale et de diminuer les taux plasmatique d'aldostérone [21].

I.B.5 L'apeline

L'apeline est un peptide vasoactif, ligand endogène des RCPG de type APJ. Au niveau du système cardiovasculaire, l'apeline aboutit à une vasodilatation et une diminution de la pression artérielle médiée par le NO libéré par l'endothélium, et à une puissante action inotrope positive sans stimulation de l'hypertrophie des cardiomyocytes. L'apeline a également un effet diurétique via l'inhibition de l'AVP. Les taux d'apeline sont significativement abaissés dans l'IC et sont restaurés après traitement par antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II (ARAII) ou par resynchronisation cardiaque.

I.B.6 Conclusion

La mise en jeu des systèmes d'adaptation neuro-hormonaux fait de l'IC une pathologie circulatoire impliquant un effet systémique, essentiellement axé autour de la vasoconstriction et de la rétention hydro-sodée, et un effet local, sur le muscle cardiaque lui-même, sous la forme du remodelage ventriculaire qui entretient le déclin de la fonction pompe du myocarde.

I.C Le remodelage ventriculaire

Le remodelage ventriculaire, fruit des modifications de la contrainte ventriculaire et de l'activation des systèmes d'adaptations neuro-hormonaux, est un élément central dans la progression de l'IC. L'histoire naturelle de l'IC montre que le remodelage ventriculaire est directement lié à la future détérioration des performances myocardiques, expliquant l'évolution progressive de la maladie et son association à une dégradation du pronostic [22].

Le remodelage ventriculaire se caractérise par une modification de la géométrie et de l'architecture du ventricule, une altération du couplage excitation – contraction (EC), une hypertrophie des cardiomyocytes et une modification des éléments non-myocytaires du muscle cardiaque.

I.C.1 Les modifications de la géométrie et de l'architecture du ventricule

La plupart des modifications structurelles du myocarde au cours du remodelage ventriculaire vont contribuer à l'aggravation de l'IC. Deux modèles de remodelage myocardique surviennent en réponse à la surcharge hémodynamique. Dans la surcharge barométrique comme l'hypertension artérielle ou la sténose aortique, le remodelage se fait sur un mode dit « concentrique » se caractérisant par une augmentation de l'épaisseur myocardique au dépend de la cavité ventriculaire via l'addition de sarcomères en parallèle aboutissant à l'augmentation de l'épaisseur des cardiomyocytes. On parle alors d'hypertrophie concentrique du myocarde. Dans la surcharge volumétrique comme dans les valvulopathies régurgitantes, l'augmentation de la contrainte diastolique aboutit à un allongement des cardiomyocytes via l'addition de sarcomères en série, à l'origine d'un remodelage dit « excentrique » se manifestant par une dilatation ventriculaire et un amincissement pariétal. On parle alors d'hypertrophie excentrique du myocarde (Figure 4). L'évolution naturelle de l'IC au travers du remodelage ventriculaire aboutit à une hypertrophie excentrique. L'amincissement pariétal, associé à l'augmentation de la post-charge induite par la dilatation ventriculaire est à l'origine d'une discordance entre la post-charge et la capacité contractile de la paroi expliquant la dysfonction myocardique et la chute du débit cardiaque. Par ailleurs, l'évolution du remodelage vers une modification globale de l'architecture du ventricule sous la forme d'une sphéricisation, aboutit à l'augmentation de la contrainte pariétale radiale qui accroît le déficit énergétique des cardiomyocytes (Figure 3). Cette augmentation de la contrainte pariétale entretient l'expression de l'AT2, l'ET et le *tumor necrosis factor* (TNF) ainsi que les voies de signalisation de l'hypertrophie [22].

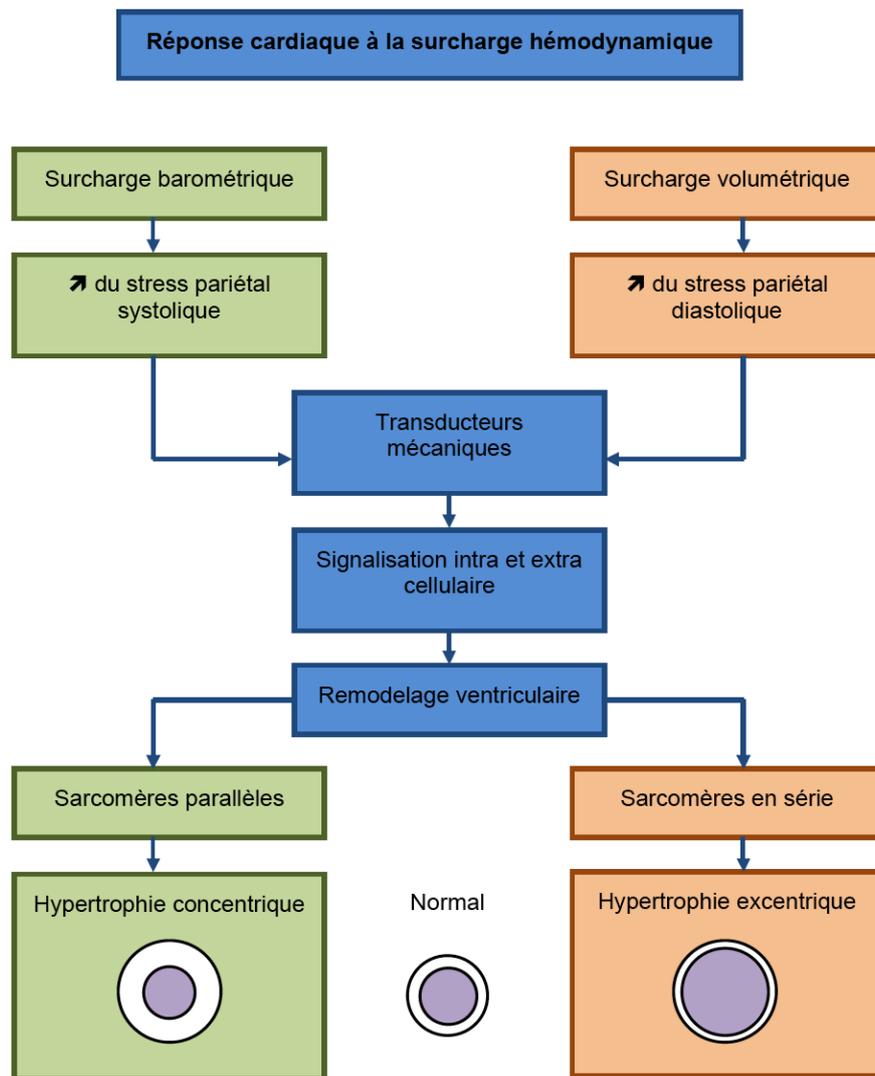


Figure 3 : Modèle de remodelage ventriculaire en fonction du type de surcharge imposée au ventricule

Dans la surcharge barométrique comme l'hypertension artérielle ou la sténose aortique, l'augmentation de la contrainte pariétale systolique aboutit à l'addition de sarcomères en parallèle résultant en une augmentation de l'épaisseur des cardiomyocytes et en une hypertrophie concentrique.

Dans la surcharge volumétrique comme dans les valvulopathies régurgitantes, l'augmentation de la contrainte pariétale diastolique aboutit à l'addition de sarcomères en série résultant en une augmentation de la longueur des cardiomyocytes et en une hypertrophie excentrique.

A partir de Mann, Braunwald's Heart Disease, 8^{ième} édition, 2008 [13]

I.C.2 L'altération du couplage excitation – contraction

Le couplage EC renvoie à l'ensemble des cascades biologiques qui font suite au potentiel d'action myocytaire et aboutissent à la contraction puis la relaxation du myocarde. Au cours de l'IC, le myocyte développe un allongement de son potentiel d'action à l'origine d'une diminution de la contractilité et d'une altération de la relaxation. Cette prolongation du potentiel d'action se manifeste par une diminution du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire au cours de la dépolarisation par un phénomène de ralentissement du relargage à partir de l'appareil contractile intracellulaire. Ces perturbations ioniques sont à l'origine des troubles de la contraction et de la relaxation observés au cours de l'IC. Parallèlement, les modifications de concentration et/ou de niveau de phosphorylation de protéines clefs dans la régulation intracellulaire du Ca^{2+} jouent un rôle important dans la dysfonction contractile des cardiomyocytes dans l'IC [23].

I.C.2.a Le réticulum sarcoplasmique

Parmi les acteurs intervenants dans l'altération de l'homéostasie calcique au cours de l'IC, les altérations protéiques et fonctionnelles du réticulum sarcoplasmique (RS) prennent une place importante, avec un rôle central pour la sarco/endoplasmique réticulum calcium ATPase-2A (SERCA2A) dans l'altération du couplage EC. La diminution de l'activité de SERCA2A jouerait un rôle important dans la pathogénèse de l'IC, par la réduction de la réabsorption calcique du RS à l'origine d'un défaut de stockage du Ca^{2+} par le RS et d'une diminution globale des taux de Ca^{2+} transitant dans le cardiomyocyte [23].

I.C.2.b Les canaux calciques de type-L

L'IC s'accompagne d'une réduction de l'expression et d'une augmentation de la phosphorylation des canaux calciques de type-L. Les canaux calciques de type-L s'ouvrent au cours de la dépolarisation membranaire durant la phase ascendante du potentiel d'action, permettant un influx calcique participant à la phase de plateau du potentiel d'action et à l'élévation des concentrations intracellulaires en Ca^{2+} . Les anomalies de canaux calciques de type-L observées au cours de l'IC seraient à

l'origine d'une diminution de l'influx Ca^{2+} intracellulaire et d'altérations du relargage du Ca^{2+} par le RS [23].

I.C.2.c L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Dans les conditions physiologiques, le Ca^{2+} pénètre dans le myocyte à partir du milieu extracellulaire grâce à un important gradient électrochimique. Avec un potentiel de repos de -80 mV et une concentration normale en Na^+ intracellulaire l'énergie du gradient électrochimique sodique est suffisante pour extraire environ 20 % du Ca^{2+} intracytoplasmique via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Dans l'IC, l'expression et l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est augmentée, compensant la diminution de réabsorption de Ca^{2+} secondaire à la diminution de l'activité de SERCA2A. Au cours de l'IC, ce mécanisme de compensation s'altère, ne permettant pas de maintenir l'homéostasie calcique intracellulaire [13].

I.C.3 L'hypertrophie des cardiomyocytes

Le remodelage ventriculaire s'accompagne d'une hypertrophie cardiaque pathologique qui se caractérise par une hypertrophie des cardiomyocytes et de profondes modifications de la matrice extracellulaire (MEC). Ces altérations du tissu myocardique sont à l'origine, outre d'une dysfonction myocardique, d'une perturbation du métabolisme énergétique cardiaque qui entretient la déchéance myocardique.

I.C.3.a La signalisation hypertrophique

Les stimuli à l'origine de l'hypertrophie des cardiomyocytes peuvent être divisés en signalisation biomécanique ou signalisation neuro-hormonale, incluant l'ensemble des hormones, cytokines, chemokines et facteurs de croissances impliqués dans les systèmes d'activation neuro-hormonaux qui participent à la physiopathologie de l'IC. La signalisation biomécanique intervient en réponse à l'augmentation de la contrainte pariétale induite par la dysfonction cardiaque et les modifications architecturales qui accompagnent le remodelage ventriculaire. Elle met en jeu un appareil sensitif intracellulaire impliquant les intégrines, récepteurs transmembranaires liants la MEC au cytosquelette. La signalisation neuro-hormonale

implique une série de récepteurs soit couplés à une protéine G hétérotrimérique, soit possédants un domaine tyrosine kinase, soit un domaine sérine/thréonine kinase intracellulaires. L'ensemble de ces récepteurs convergent vers un nombre limité de circuits intracellulaires de signal/transduction à l'origine de la croissance cellulaire. Ces circuits intracellulaires sont à l'origine de l'hypertrophie des cardiomyocytes via la modification de l'expression du programme génétique [24]. Les principales voies de signalisation intracellulaires coordonnant la réponse hypertrophique sont présentées dans la figure 4.

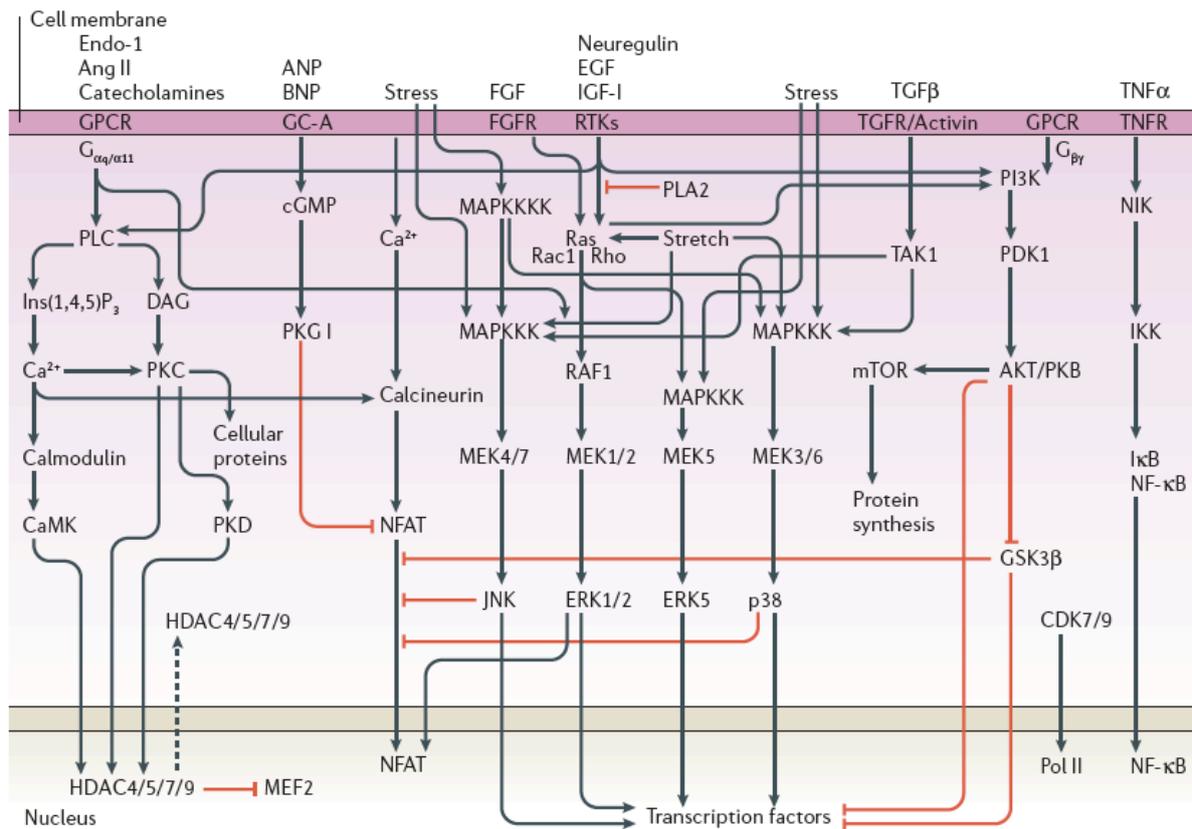


Figure 4 : Schéma des voies de signalisation intracellulaires actuellement connues qui coordonnent la réponse hypertrophique du myocarde

La signalisation qui intervient au niveau de la membrane cellulaire est représentée dans la partie supérieure (bande rose). La signalisation des kinases intracellulaires est représentée dans la partie centrale (rose clair). La signalisation qui intervient au niveau du noyau est représentée dans la partie inférieure (marron).

Extrait de Heineke et coll., *Molecular Cell Biology*, 2006 [24]

I.C.3.a.i L'activation des récepteurs couplés à la protéine G

Les RCPG jouent un rôle crucial dans le remodelage ventriculaire en médiant la réponse à la plupart des systèmes d'activation neuro-hormonaux mis en jeu au cours de l'IC. Ainsi, l'AT2, l'ET-1 et les catécholamines endogènes comme l'adrénaline et la NA, se lient à des récepteurs à sept domaines transmembranaire qui vont participer à l'hypertrophie des cardiomyocytes en se couplant à des protéines G hétérotrimériques du sous-groupe $G_{\alpha_q/\alpha_{11}}$. Leur couplage à la phospholipase $C\beta$ est à l'origine de la production de diacylglycerol, ligand intracellulaire de la protéine kinase C qui induit son activation et la production d'inositol-1,4,5-triphosphate. L'accumulation intracellulaire d'inositol-1,4,5-triphosphate est à l'origine d'une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire à partir du réticulum sarcoplasmique. Ces modifications des concentrations calciques intracellulaires vont médier la signalisation hypertrophique via l'activation de la voie calcineurine - *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) ou l'activation de la voie calmoduline – *histone deacetylases* (HDAC).

I.C.3.a.ii La voie des *mitogen activated protein kinases* (MAPK)

La voie des MAPK consiste en une série d'activations successives de kinases aboutissant à la phosphorylation et à l'activation des kinases p38 et des *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) qui vont phosphoryler une multitude de cibles intracellulaires, dont certains facteurs de transcription, à l'origine de la reprogrammation de l'expression génétique cardiaque. En fin de chaîne d'activation, ERK 1 et 2 sont phosphorylées et activées par les *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal receptor-regulated kinase* (MEK) 1 et 2. Les kinases p38 sont activées par les MAPK kinases (MKK) 6 et 3, et les JNK sont activées par les MKK 4 et 7 [24]. *In vivo*, la voie de signalisation MEK1-ERK1/2 induit l'hypertrophie des cardiomyocytes via l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NFAT, suggérant une interaction avec la voie hypertrophique calcineurine – NFAT [25]. Cependant, si toutes ces voies semblent mener à une réponse hypertrophique, les travaux animaux suggèrent que les voies MEK-ERK seraient à l'origine d'une hypertrophie concentrique « adaptative », alors que les voies MKK-p38 et MKK-JNK seraient à l'origine d'une hypertrophie excentrique « maladaptative » [24].

La cascade de signalisation des MAPK est initiée au niveau des cardiomyocytes par pratiquement tous les agonistes hypertrophiques connus via les RCPG, les récepteurs tyrosine kinases, les récepteurs sérine/thréonine kinases, les récepteurs couplés aux cytokines et l'augmentation de la contrainte pariétale, et joue un rôle important dans la survie myocytaire [19, 26].

I.C.3.a.iii La voie calcineurine – NFAT

La calcineurine est une protéine phosphatase sérine/thréonine Ca^{2+} -dépendante dimérique activée par liaison à la calmoduline lors de l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . La calcineurine activée se lie aux facteurs de transcription de la famille des NFAT, à l'origine de leur translocation nucléaire, aboutissant à l'expression génique des gènes pro-hypertrophiques. Les facteurs de transcription NFAT sont nécessaires et suffisants à l'apparition d'une hypertrophie des cardiomyocytes, en faisant le premier effecteur de la calcineurine dans le cœur [27]. La voie calcineurine – NFAT est contrôlée par des kinases spécifiques capables de phosphoryler directement le domaine N-terminal régulant NFAT, antagonisant la translocation nucléaire et diminuant l'expression des gènes de l'hypertrophie. Ainsi, les kinases *glycogen synthase kinase-3 β* , p38 et JNK peuvent induire la phosphorylation des NFAT dans le cardiomyocyte, régulant ainsi la signalisation de l'hypertrophie [28-30]. La voie calcineurine – NFAT a été identifiée comme une voie majeure de signalisation dans l'hypertrophie maladaptative.

I.C.3.a.iv La voie des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) – AKT

Les PI3K sont une famille d'enzymes qui présentent une activité kinase et qui sont associées aux signaux de croissance, de survie et de prolifération cellulaire. Elles peuvent être activées par des récepteurs tyrosine kinase tel que le récepteur à l'*insulin-like growth factor – I* (IGF-I) mais également des RCPG.

Les ligands du récepteur à l'IGF-I activent les PI3K du groupe IA (PI3K α) qui vont convertir les lipides membranaires plasmiques phosphatidylinositol-4,5-biphosphate en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate activant ainsi les autres voies de signalisation de la membrane plasmique. Les PI3K sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. Certains RCPG spécifiques peuvent activer les PI3K du groupe IB (PI3K γ) via le recrutement de la sous-unité catalytique p110 γ [31]. La sous-unité catalytique p110 α

participerait à la réponse hypertrophique physiologique [32] alors que la sous-unité p110 γ interviendrait dans la réponse hypertrophique pathologique observée au cours du remodelage ventriculaire [33, 34].

L'activation des PI3K aboutit au recrutement des kinases AKT/protéine kinase B (PKB) et de la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) au niveau du sarcolemme. Leur rapprochement au niveau membranaire va permettre à la PDK1 de phosphoryler et d'activer les kinases AKT/PKB [35]. La voie de signalisation AKT/PKB interviendrait ainsi dans la croissance physiologique du cardiomyocyte via la sous-unité catalytique p110 α des PI3K [36], permettant à court terme une hypertrophie compensatrice sans dysfonction systolique mais aboutissant à plus long terme à une hypertrophie excentrique avec dysfonction systolique [37].

L'un des principaux médiateurs de la voie PI3K – AKT est la *glycogen synthase kinase-3 β* (GSK-3 β) qui régule négativement la transcription des gènes de l'hypertrophie comme GATA4, β -caténine, c-Myc et NFAT. Les kinases AKT/PKB vont inhiber GSK-3 β , aboutissant à l'hypertrophie du cardiomyocyte via l'augmentation de la transcription des gènes de l'hypertrophie [35].

Les kinases AKT/PKB via l'activation de mTOR, un autre médiateur, peuvent également augmenter la synthèse protéique par deux voies de signalisation faisant intervenir soit l'activation de la p70/85 S6 kinase-1 (S6K-1), soit la p54/56 S6K2 qui vont augmenter la biosynthèse ribosomale et la translation protéique [38].

I.C.3.a.v La voie des histone deacetylases (HDAC)

L'une des autres voies impliquées dans l'hypertrophie des cardiomyocytes fait intervenir l'altération de l'expression génique via le remodelage de la chromatine, impliquant les HDAC de classe II. La plupart des voies de signalisation de l'hypertrophie régulent les HDAC de classe II. Ainsi, la signalisation pro-hypertrophique active des kinases de type PKD ou PKC, ou la *calmodulin-dependent kinase* (CaMK), aboutissant à la phosphorylation des HDAC et à leur activation, résultant à leur translocation nucléaire. Dans le noyau, les HDAC de classe II vont réguler l'expression des gènes centraux dans le contrôle de la croissance cellulaire via leur interaction avec certains facteurs de transcription comme le *myocyte enhancer factor-2* (MEF-2) [24].

I.C.3.b Réexpression du programme génétique foetal

L'hypertrophie des cardiomyocytes se manifeste par une modification du phénotype myocytaire secondaire à la réexpression d'une série de gènes normalement non exprimés après la naissance comme la *beta-myosin heavy chain* (β -MHC), les peptides natriurétiques et l' α -actinine. Cette réexpression du programme génétique foetal s'accompagne d'une diminution de l'expression d'un certain nombre de gènes normalement exprimés dans le cœur adulte. Les stimuli participants à la reprogrammation génétique du cardiomyocyte au cours de l'IC incluent la contrainte mécanique, les systèmes neuro-hormonaux comme l'AT2 et la NA, les cytokines de l'inflammation comme le TNF et l'IL-6, certains peptides et facteurs de croissance comme l'ET, et les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces stimuli s'exercent au niveau local, au sein du myocarde, par un mécanisme autocrine/paracrine et au niveau systémique, par un mécanisme endocrine [13].

La réexpression du programme génétique foetal permet la synthèse coordonnée des protéines nécessaires à l'augmentation de la taille des cardiomyocytes et à l'ajustement de la demande énergétique en réponse à l'hypertrophie qu'elle induit [19].

La réexpression du programme génétique foetal contribuerait également à la dysfonction contractile des cardiomyocytes au cours de l'IC en modifiant l'activité des ATPases impliquées dans le fonctionnement de l'appareil contractile. Ainsi, le remplacement de l'isoforme adulte α de la *myosin heavy chain* (MHC) ayant une forte activité ATPase par son isoforme foetale β à faible activité ATPase participerait à la dysfonction contractile du myocyte [13]. Parallèlement, l'altération de l'expression et/ou de l'activité des protéines régulatrices de l'appareil contractile participerait au déclin des fonctions contractiles du myocyte au cours de l'insuffisance cardiaque. Ainsi, les changements d'isoformes de la *myosin light chain*, de la troponine-I et de la troponine-T seraient à l'origine d'une diminution de la tension active maximale des myofilaments et d'une altération de la réponse à la surcharge du ventricule dans les stades évolués de l'IC [39].

I.C.3.c Modifications de l'architecture du cardiomyocyte

Le stade précoce de l'hypertrophie des cardiomyocytes se manifeste morphologiquement par une augmentation du nombre de myofibrilles et de

mitochondries, et par une augmentation de la taille des mitochondries et du noyau (Figure 5A). A ce stade, le cardiomyocyte est augmenté en taille mais son architecture intracellulaire est préservée. Au fur et à mesure de l'évolution de l'hypertrophie, le nombre de mitochondries augmente et de nouvelles structures contractiles viennent s'ajouter dans la cellule (Figure 5B). Progressivement apparaît une désorganisation cellulaire avec une majoration de l'augmentation de la taille des noyaux avec le développement d'une membrane lobulée s'accompagnant d'un déplacement des myofibrilles adjacentes et perte de l'organisation normale en bandes Z (Figure 5C). Le stade évolué de l'hypertrophie des cardiomyocytes se caractérise par une perte des structures contractiles (myocytolyse) à l'origine d'une profonde altération de l'organisation en bandes Z et de l'architecture normale en parallèle du sarcomère, et d'une dilatation et augmentation de la tortuosité des tubules T (Figure 5D) [13].

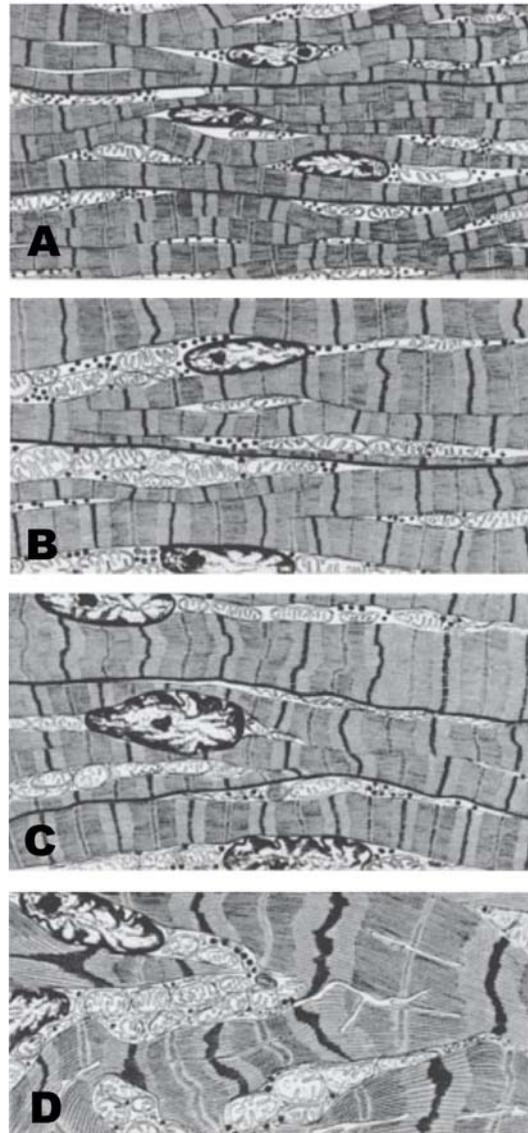


Figure 5 : Evolution de l'hypertrophie des cardiomyocytes au cours du remodelage ventriculaire

A : Le premier stade de l'hypertrophie est caractérisé morphologiquement par une augmentation du nombre de myofibrilles et de mitochondries, associé à un élargissement de la mitochondrie et du noyau. Le cardiomyocyte est alors plus épais mais l'organisation cellulaire est préservée.

B : A un stade plus avancé, l'augmentation de la taille et du nombre des organelles comme la mitochondrie et l'addition irrégulière d'éléments contractiles à la périphérie de la cellule aboutit à des anomalies d'organisation et de contour cellulaire.

C : Le stade suivant se caractérise par une désorganisation plus marquée de la cellule avec l'augmentation de la taille et du caractère polylobé du noyau, déplaçant la myofibrilles et rompant l'organisation physiologique en bandes en Z.

D : Au dernier stade d'hypertrophie se caractérise par une perte des éléments contractiles du cardiomyocyte avec une perte de l'architecture en bandes en Z, une désorganisation sévère de la disposition en parallèle des sarcomères et une augmentation de la tortuosité des tubules T.

D'après Ferrans, Hospital Practice, 1983 [40]

Ces modifications cellulaires se caractérisent à l'échelle de l'organe par l'apparition d'une hypertrophie pathologique, concentrique ou excentrique, en fonction du type de surcharge imposée au myocarde (Figure 6).

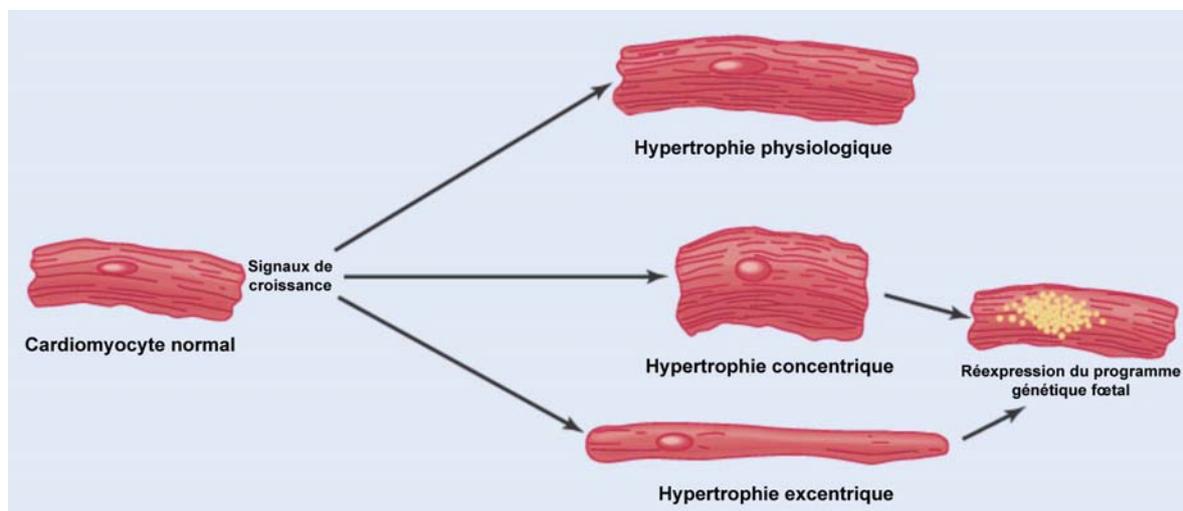


Figure 6 : Architecture des cardiomyocytes en réponse à la surcharge hémodynamique

En cas de surcharge barométrique, l'augmentation du stress pariétal systolique aboutit à une addition de sarcomères en parallèle et à l'augmentation de l'épaisseur du cardiomyocyte.

En cas de surcharge volumétrique, l'augmentation du stress pariétal diastolique aboutit à une addition de sarcomères en série et à l'augmentation de la longueur du cardiomyocyte.

Seule l'hypertrophie pathologique (concentrique et excentrique) s'accompagne d'une réexpression du programme génétique fœtal.

A partir de Hunter et coll., N Eng J Med, 1999 [41]

La perte de l'intégrité du cytosquelette et de ses liens avec le sarcomère et la MEC participe également à la dysfonction contractile du cardiomyocyte.

I.C.4 La régulation de la matrice extracellulaire

Les fibroblastes cardiaques représentent plus de 90 % des cellules non myocytaires dans le cœur et sont responsables de la sécrétion de la majorité des composants de la MEC comme les fibres de collagène de type I, III et IV, la laminine, et la fibronectine. En réponse à la contrainte pariétale et/ou à l'activation neuro-hormonale, une partie des fibroblastes va réaliser une conversion phénotypique en myofibroblaste caractérisé par l'expression de l' α -actine des muscles lisses et une augmentation de l'activité sécrétrice. Les myofibroblastes vont migrer autour de la

zone agressée où ils seront responsables de la sécrétion et de l'alignement des fibres de collagène, jouant un rôle majeur dans la formation de la cicatrice du site agressé. L'ensemble des molécules responsables de l'activation des myofibroblastes n'est pas connu, mais de nombreuses neuro-hormones comme l'AT2 ou l'aldostérone ; cytokines comme l'ET, le *transforming growth factor-béta* (TGF- β) ou la cardiotrophine, exprimés dans l'IC, sont capables d'activer les myofibroblastes. L'utilisation des IEC, des β -bloquants et des ARA2 est associée à une diminution de la fibrose myocardique [13].

Les modifications de la MEC constituent une part essentielle des phénomènes d'adaptation qui surviennent au cours du remodelage ventriculaire. La MEC du myocarde est composée d'un réseau de fibres de collagène entourant les cardiomyocytes, de protéoglycanes et glycosaminoglycanes, et de molécules de signalisation biologiquement actives. La majorité des fibres de collagène au niveau du cœur sont les fibres de type I et III avec un ratio de type I sur type III de l'ordre de 1,3:1 à 1,9:1. L'organisation myocardique des fibres de collagène de type I et III assure l'intégrité structurelle des cardiomyocytes adjacents et est essentielle dans le maintien des myofibrilles au sein du cardiomyocyte via l'interaction entre le collagène, les intégrines et le cytosquelette (Figure 7).

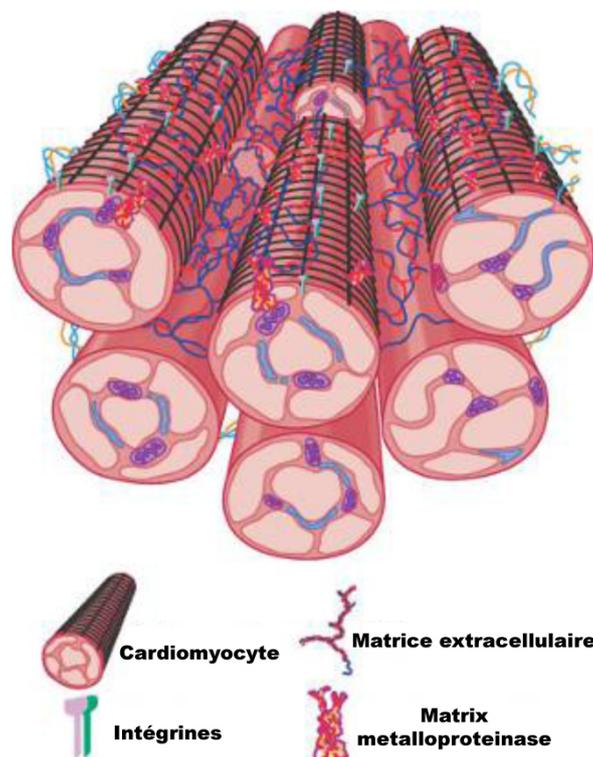


Figure 7 : Relations entre fibres de collagène de la matrice extracellulaire et cardiomyocytes

Les cardiomyocytes sont interconnectés par un réseau complexe de fibres de collagène et de protéines de la matrice comme la fibronectine. Le cardiomyocyte adhère à la matrice via une famille de protéines transmembranaires appelées intégrines qui participent à la signalisation intracellulaire.

A partir de Mann, Braunwald's Heart Disease, 8^{ième} édition, 2008 [13]

Au cours du remodelage ventriculaire, les modifications de la synthèse, de la dégradation et de la jonction des fibres de collagène aboutissent à la perte du support liant les cardiomyocytes [42]. L'IC s'accompagne d'une augmentation progressive de la densité cardiaque en collagène (Figure 8) avec une augmentation quantitative en collagène de type I, III, IV et VI, en fibronectine, en laminine et en vimentine avec une chute du ratio collagène de type I sur type III. Ces modifications quantitatives s'accompagnent d'une perte des liens de collagènes et de la connexion entre le réseau de collagène et les cardiomyocytes résultant en une profonde altération de la structure et de la fonction ventriculaire. L'accumulation de collagène peut survenir autour des artères coronaires intramurales ou des artérioles, réalisant une fibrose périvasculaire, ou au niveau de l'interstitium, réalisant une fibrose interstitielle, indépendamment de la perte cellulaire en cardiomyocytes. L'accumulation de fibrose peut aussi survenir sous une forme cicatricielle, en

réponse à la perte cellulaire, réalisant une fibrose de remplacement, mécanisme d'adaptation à la perte du parenchyme nécessaire à l'intégrité structurelle du cœur. Cette augmentation de la fibrose myocardique est à l'origine d'une augmentation de la rigidité pariétale résultant en une diminution de la contraction et de la relaxation myocardiques. La fibrose myocardique participe également à la survenue d'arythmies atriales et ventriculaires qui contribuent à la mort subite dans l'IC.

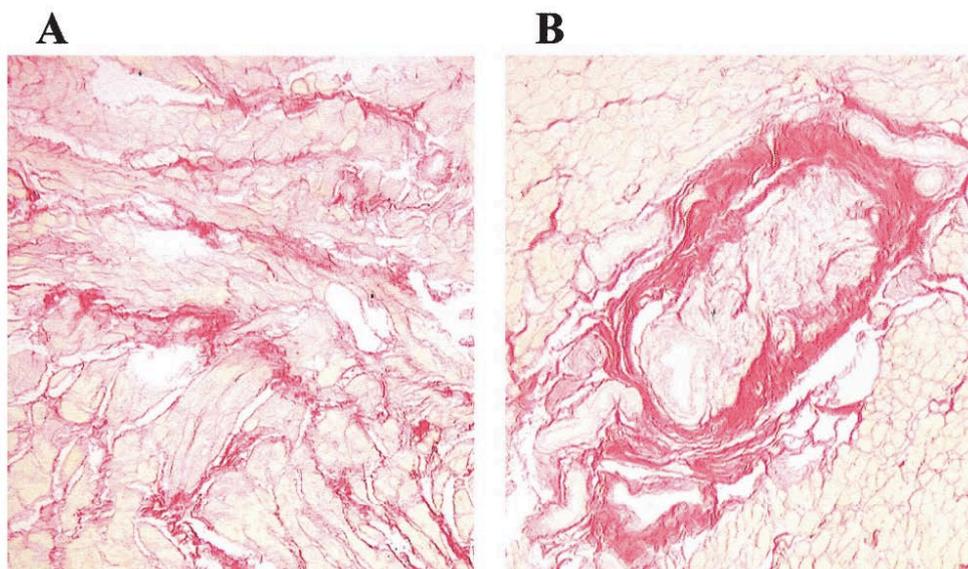


Figure 8 : Fibrose myocardique au cours du remodelage ventriculaire

Coupes histologiques de cœurs humains montrant la fibrose interstitielle (A) et périvasculaire (B) au cours du remodelage ventriculaire (coloration au rouge Sirius).

Extrait de Lôpez et coll., Hypertension 2001 [43]

Si la matrice de collagène au sein du myocarde a longtemps été considérée comme un complexe relativement statique, il est maintenant reconnu que ces protéines structurales peuvent avoir un renouvellement rapide. En effet, le remodelage ventriculaire s'accompagne d'une activation de toute une famille d'enzymes lytiques du collagène regroupées sous le terme de *matrix metalloproteinases* (MMP). Les MMP sont des protéases dépendantes du zinc qui jouent un rôle important dans le remodelage ventriculaire physiologique et dans divers processus pathologiques comme l'inflammation, l'invasion tumorale et l'apparition de métastases. Les MMP sont sécrétés sous forme de zymogènes inactifs, activés par clivage. Les MMP sont classées en sous-groupes en fonction de leur affinité de substrat et/ou de structure incluant les collagénases comme la MMP-1 et la MMP-13, les stromelysines comme la MMP-3 et les gélatinases comme la MMP-2 et la MMP-9. Une fois activées, les MMP sont capables de dégrader

l'ensemble des composants de la MEC. Les mécanismes d'activation des MMP restent encore mal connus, mais laissent supposer un rôle du TNF et des autres cytokines et facteurs de croissance exprimés dans l'IC. La biologie du remodelage de la MEC dans l'IC semble plus complexe que la simple présence ou absence de MMP activées, faisant intervenir des glycoprotéines appelées *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMP) capables de réguler l'activation des MMP en s'y liant, les empêchant de dégrader la MEC. La famille des TIMP compte quatre sous-types : TIMP-1, -2, -3, et -4, tous exprimés de façon constitutionnelle dans le cœur par les fibroblastes et les cardiomyocytes. Au cours de l'IC, l'activité de la majorité des MMP est augmentée, à l'exception de celle de la MMP-1. La perte de l'inhibition médiée par les TIMP pourrait favoriser l'activation persistante des MMP, favorisant la protéolyse de la MEC et la dilatation ventriculaire [44].

I.C.5 Le stress oxydant

Les ERO sont le produit final normal du métabolisme aérobie. Au niveau cardiaque, les sources d'ERO comprennent la mitochondrie, la xanthine oxydase, la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et les monoamines oxydases (MAO). Les ERO peuvent moduler l'activité de toute une variété de protéines intracellulaires et de voies de signalisation, incluant les principales protéines impliquées dans le couple excitation – contraction myocardique et les voies de signalisation de la croissance cellulaire. Le « stress oxydant » survient lorsque la production d'ERO dépasse la capacité tampon des systèmes de défense antioxydants, aboutissant à un excès d'ERO au sein de la cellule. Au niveau cardiaque, la manganèse superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase semblent être les plus puissants systèmes antioxydants pour le contrôle des niveaux myocardiques en superoxyde et peroxyde d'hydrogène. L'IC s'accompagne d'une augmentation du niveau de stress oxydant aux niveaux systémique et myocardique. L'apparition du stress oxydant au niveau cardiaque serait due à une diminution des capacités anti-oxydantes et/ou une augmentation de la production d'ERO, secondaire à la déformation mécanique du myocarde, la stimulation neuro-hormonale impliquant AT2, aldostérone, agonistes adrénergiques et ET-1, et la libération des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF et l'interleukine-1 (IL-1) [45]. Ainsi, au niveau des cardiomyocytes, les ERO sont de puissants messagers intracellulaires médiateurs de différentes fonctions cellulaires en fonction de leur

concentration, telles que la prolifération, l'hypertrophie, la différenciation, l'apoptose et la nécrose (Figure 9) [46].

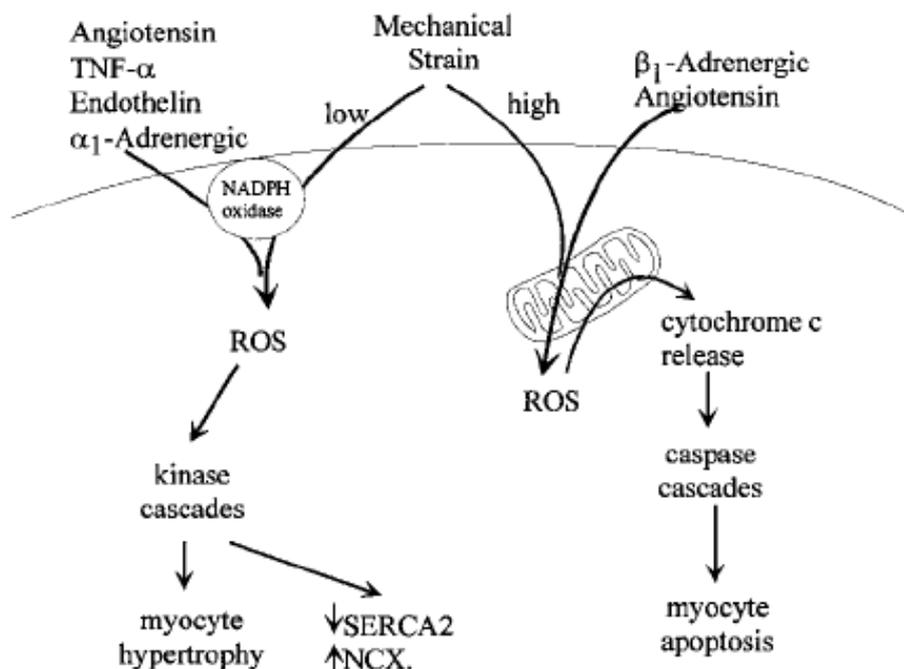


Figure 9 : Effets des espèces réactives de l'oxygène sur le cardiomyocyte

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent induire l'hypertrophie des cardiomyocytes via l'activation de cascades de kinases comme les *mitogen activated protein kinases* (MAPK). Les ERO peuvent altérer l'activité et l'expression des protéines couplées au Ca^{2+} dont SERCA2A et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ aboutissant à l'altération de la contractilité myocardique. Les ERO mitochondriaux peuvent également induire l'apoptose par relargage de cytochrome c à partir de la mitochondrie, nécessaire à l'activation de la cascade des caspases.

ROS : reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène) ; TNF : tumor necrosis factor ; SERCA2A : Sarco/endoplasmique réticulum calcium ATPase-2A

Extrait de Sawyer et coll., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002 [47]

I.C.6 L'inflammation

Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF et l'IL-1 contribuent au remodelage progressif du myocarde au cours de l'IC. Ces molécules sont produites au sein même du myocarde par les cellules résidentes incluant fibroblastes et cardiomyocytes, en réponse directe à une agression myocardique. Le rôle primaire de ces molécules est d'initier la restauration du myocarde agressé, mais leur libération prolongée ou à haute concentration est suffisante pour reproduire l'ensemble du phénotype observé au cours de l'IC, en provoquant les mêmes effets délétères sur les cardiomyocytes et non-cardiomyocytes, et sur la MEC. Ce

parallélisme d'action s'expliquerait par une interaction étroite entre cytokines pro-inflammatoires et SRAA, avec un lien de régulation réciproque. La constatation d'une diminution des concentrations de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 laisse penser que la balance inflammatoire joue un rôle important dans la progression du remodelage ventriculaire au cours de l'IC [48].

I.C.7 La perte des cardiomyocytes

Au cours du remodelage ventriculaire, la perte progressive des cardiomyocytes, par nécrose, apoptose ou autophagie contribue à la progression de la dysfonction cardiaque et à l'entretien du remodelage ventriculaire [13].

I.C.7.a La nécrose

La nécrose cellulaire myocardique survient au cours des agressions aiguës du cardiomyocyte, de l'ischémie, de l'exposition aux toxiques, de l'infection et de l'inflammation. L'activation neuro-hormonale peut aussi aboutir à la nécrose myocytaire. La nécrose serait sept fois supérieure à l'apoptose dans l'IC, avec une disparité en fonction du genre [49]. La rupture membranaire de la cellule accompagnant la nécrose est à l'origine d'une libération du contenu intracellulaire provoquant une intense réaction inflammatoire aboutissant à l'afflux de granulocytes, macrophages et à la sécrétion de collagène par les fibroblastes au sein de la zone agressée.

I.C.7.b L'apoptose

Au cours du remodelage ventriculaire, l'apoptose pourrait être initiée de façon inappropriée, résultant en une perte accidentelle de cardiomyocytes. L'apoptose est présente dans le cœur au cours de l'insuffisance cardiaque. L'ensemble des mécanismes d'adaptation neuro-hormonaux initiés au cours de l'IC sont capables d'activer l'apoptose *in vitro*. Si la place de l'apoptose dans le cœur défaillant est difficile à préciser, les données de la littérature suggèrent une place importante dans la physiopathologie de l'IC [50, 51].

I.C.7.c L'autophagie

La perte des cardiomyocytes au cours du remodelage ventriculaire peut également se faire par autophagie [52]. L'autophagie correspond la dégradation d'une partie du cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes et regroupe plusieurs voies de dégradation lysosomales des constituants cellulaires, essentielles à l'homéostasie cellulaire.

I.D Conclusion

Issue d'un événement aigu ou chronique aboutissant à la baisse des performances du myocarde, l'IC est maintenant admise comme une pathologie systémique autour d'une boucle mettant en jeu le remodelage ventriculaire et les systèmes d'adaptation neuro-hormonaux. Cette boucle d'auto-entretien fait intervenir différents systèmes biologiques dont la compréhension permettra de prévenir l'aggravation progressive de la maladie, au travers de nouvelles cibles thérapeutiques, comme l'ont démontré les IEC [53] et les β -bloquants [54-58].

L'étude des amines biogènes dans l'IC et le remodelage ventriculaire a permis de mettre en évidence une augmentation des taux circulants en sérotonine [59, 60]. Le rôle physiologique de la sérotonine dans l'organisme et particulièrement au niveau du système cardiovasculaire laisse penser que la sérotonine pourrait participer au remodelage ventriculaire, au même titre que les autres systèmes d'activation neuro-hormonaux.

II Le système sérotoninergique

La sérotonine est une molécule ubiquitaire, présente aussi bien dans le règne animal que végétal. Bien qu'elle soit synthétisée par des cellules spécialisées dans des zones anatomiques restreintes, sa présence dans la circulation sanguine, et l'expression de ses multiples récepteurs et de son transporteur au sein de tous les organes, font que cette monoamine influence toutes les fonctions physiologiques, de la régulation des fonctions cardiovasculaire, respiratoire, gastro-intestinale, aux fonctions contrôlées par le SNC.

II.A Le métabolisme de la sérotonine

II.A.1 Biosynthèse, stockage et libération de la sérotonine

Dans le SNC ou à la périphérie, la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est synthétisée dans les cellules sérotoninergiques, exclusivement à partir de l'acide aminé essentiel L-tryptophane (L-trp), apporté uniquement par l'alimentation. Absorbé par l'intestin, le L-trp est véhiculé par la circulation générale avant de pénétrer dans les tissus. La sérotonine est synthétisée en deux étapes (Figure 10) : le L-trp est hydroxylé par la tryptophane hydroxylase (TPH) en 5-hydroxytryptophane (5-HTP), précurseur immédiat de la sérotonine. L'hydroxylation du L-tryptophane est l'étape limitante de cette biosynthèse. Le 5-HTP est ensuite décarboxylé en 5-hydroxytryptamine (5-HT) ou sérotonine par une enzyme ubiquitaire, la décarboxylase des acides aminés aromatiques (*Aromatic Amino acid Decarboxylase*, AADC), également exprimée par les neurones catécholaminergiques.

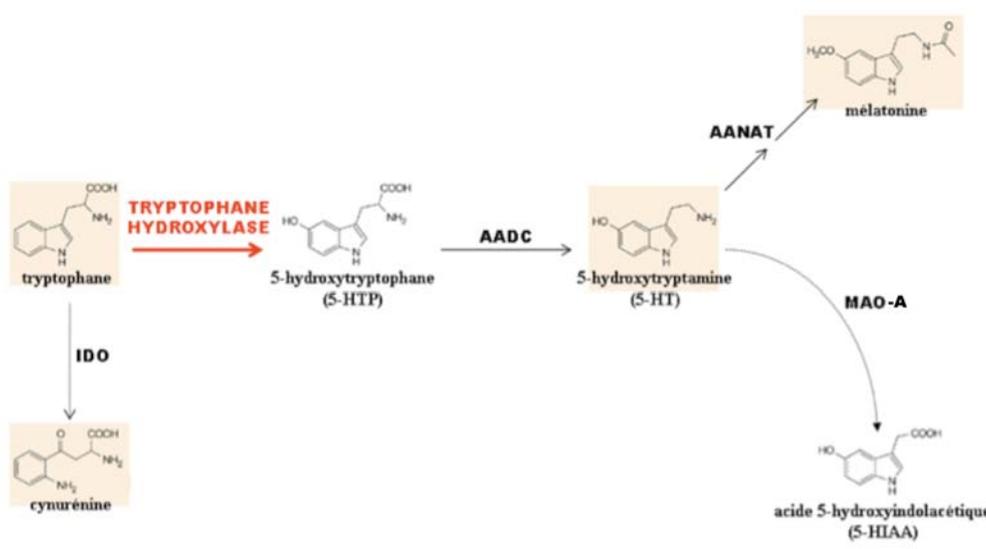


Figure 10 : Voies de synthèse et de dégradation de la sérotonine

AADC: hydroxylase des acides aminés aromatiques ; AANAT: N-acétyltransférase des acides aminés aromatiques; MAO-A : monoamine oxydase – A ; IDO : indoleamine-2,3-dioxygénase.

D'après de Rang et coll., Rang & Dale's pharmacology 2003 [61]

Le devenir de la sérotonine ainsi formée dépend ensuite de sa localisation.

Dans le SNC, la sérotonine est accumulée dans des vésicules synaptiques de stockage des neurones sérotoninergiques par un système de transport antiport proton/sérotonine commun aux monoamines, assuré par le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT. La 5-HT peut ensuite être libérée par exocytose au niveau des terminaisons sérotoninergiques, à la suite d'une dépolarisation membranaire.

Dans la glande pinéale, glande endocrine impliquée dans les phénomènes d'adaptation aux changements de la photopériode, la sérotonine est convertie en mélatonine, molécule clef de la régulation du rythme circadien.

Enfin, à la périphérie, la sérotonine est synthétisée au niveau des cellules entérochromaffines du tube digestif où elle est libérée dans la circulation portale avant d'être stockée au niveau hépatique dans les plaquettes sanguines qui constituent son réservoir principal.

II.A.2 L'inactivation de la sérotonine (recapture et catabolisme)

Une fois libérée, la sérotonine se fixe sur des récepteurs spécifiques, responsables de ses effets physiologiques. Cette activité est limitée dans le temps et

en intensité par deux processus d'inactivation qui assurent ainsi l'élimination de l'amine et permettent de réguler finement sa concentration dans l'espace extracellulaire : un mécanisme de recapture et un mécanisme de dégradation enzymatique.

II.A.2.a La recapture de la sérotonine : le transporteur de la sérotonine

Le mécanisme de recapture de la sérotonine met en jeu un système de transport actif assuré par une protéine membranaire spécifique, le transporteur de la sérotonine : le 5-hydroxytryptamine transporteur (5-HTT). Sa fonction principale est de limiter l'interaction de la sérotonine avec ses cibles, en la transférant de l'espace extracellulaire au compartiment cytoplasmique où elle pourra être soit dégradée, soit recyclée dans les vésicules de sécrétion (vésicules synaptiques des terminaisons sérotoninergiques, granules denses de sécrétion des plaquettes sanguines).

Le 5-HTT est une protéine à 12 domaines transmembranaires appartenant à la famille des transporteurs Na^+/Cl^- dépendants. Le transport de la sérotonine se fait en même temps que celui des ions Na^+ et Cl^- et nécessite la liaison des trois composés au 5-HTT (Figure 11A). Le 5-HTT subit ensuite une série de changements conformationnels qui empêche l'entrée de molécules supplémentaires et expose le site de liaison au cytoplasme (Figure 11B). Après la libération des ions Na^+ et Cl^- et de la sérotonine à l'intérieur de la cellule (Figure 11C) les ions K^+ intracellulaires sont capables de se lier au 5-HTT (Figure 11D). Le 5-HTT subit de nouveaux changements de conformation qui empêchent la liaison d'ions K^+ supplémentaires et exposent le site de liaison au milieu extracellulaire. La libération du K^+ dans le milieu extracellulaire termine le cycle (Figure 11E).

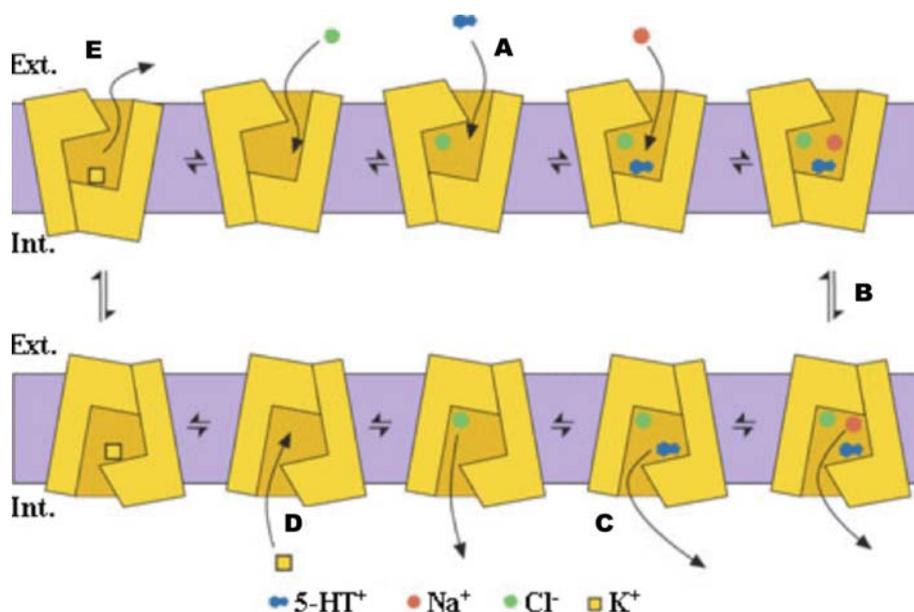


Figure 11 : Mécanisme du transport de la sérotonine par son transporteur 5-HTT

Ext. : milieu extracellulaire ; Int. : milieu intracellulaire

Extrait de Rudnick et coll., Journal of Membrane Biology 2007 [62]

La séquence en acides aminés de la protéine 5-HTT purifiée présente des sites consensus de phosphorylation par les protéines kinases A et C, et par la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline dépendante. L'activité du 5-HTT dépend de son état de phosphorylation [62].

Dans le SNC, le 5-HTT est localisé dans la membrane plasmique des neurones sérotoninergiques, tant au niveau des corps cellulaires situés dans les noyaux du raphé, que de leurs fibres et leurs terminaisons [63].

A la périphérie, le 5-HTT est localisé dans la membrane plasmique des plaquettes sanguines, permettant ainsi l'internalisation de la sérotonine dans les granules denses de sécrétion. La sérotonine ainsi internalisée est libérée lors de l'agrégation plaquettaire [64, 65]. Le 5-HTT est également exprimé dans de nombreux tissus tels que les poumons, le cœur ou les intestins ainsi que dans plusieurs types cellulaires comme les cellules épithéliales, les fibroblastes, les neurones du système nerveux périphérique ou les cellules musculaires lisses.

II.A.2.b La dégradation enzymatique de la sérotonine : la monoamine oxydase – A

La dégradation enzymatique de la sérotonine est effectuée par les monoamines oxydases (MAO) qui sont de deux types, MAO-A et MAO-B. Ces deux enzymes sont présentes au niveau de la membrane externe des mitochondries, dans de nombreux types cellulaires à la fois dans le SNC et à la périphérie. Elles sont responsables de la désamination oxydative des amines biogènes, dont la sérotonine, et conduisent à la production de peroxyde d'hydrogène, espèce réactive de l'oxygène, et de 5-hydroxyindole acétaldéhyde, lui-même oxydé par une aldéhyde déshydrogénase pour former l'acide 5-hydroxyindoacétique (5-HIAA), métabolite principal et inactif de la sérotonine excrété dans les urines.

Les MAO possèdent des affinités différentes pour leurs substrats et des inhibiteurs spécifiques. La sérotonine est préférentiellement dégradée par la MAO-A ($K_m=137 \pm 24\mu\text{M}$), de même que la noradrénaline et l'adrénaline. La MAO-B, quant à elle, désamine préférentiellement la dopamine, la β -phényléthylamine et la benzylamine. La MAO-B ne semble intervenir dans le catabolisme de la sérotonine que lorsque sa concentration est élevée dans le cytoplasme des cellules ($K_m=1093 \pm 20\mu\text{M}$) [66, 67].

Dans le SNC, les MAO participent à la régulation et au maintien des niveaux des neurotransmetteurs monoaminergiques (noradrénaline, dopamine, sérotonine). La localisation des MAO ne correspond pas toujours à la localisation de leurs substrats préférentiels. Ainsi, les neurones sérotoninergiques expriment la MAO-B, qui n'utilise normalement pas la sérotonine comme substrat, du fait de sa faible affinité pour l'amine. Les MAO sont également présentes dans certains neurones non-monoaminergiques [68-70]. Dans ces neurones, la sérotonine et les catécholamines agiraient plutôt comme des facteurs trophiques pour le développement neuronal ou seraient impliquées dans la libération ou le stockage d'autres neurotransmetteurs.

Dans les tissus périphériques, les MAO désaminent les monoamines qui agissent de façon endocrine ou paracrine. Elles peuvent être co-exprimées, comme dans le foie humain ou être spécifiquement exprimées, comme la MAO-A dans le placenta ou la MAO-B dans les plaquettes sanguines [71]. Elles jouent également un rôle important de détoxification dans le foie, les intestins et les poumons [72].

II.A.3 Les récepteurs de la sérotonine

Au moins 14 récepteurs de la sérotonine sont actuellement dénombrés. Sur la base de leurs homologues de séquences protéiques et de structures tertiaires, 7 classes de récepteurs 5-HT ont été définies (5-HT₁ à 5-HT₇), représentant ainsi l'une des familles les plus complexes de récepteurs aux neurotransmetteurs [73].

A l'exception des récepteurs sérotoninergiques de classe 3 qui appartiennent à la superfamille des récepteurs ionotropiques, les récepteurs sérotoninergiques des six autres classes sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui appartiennent à la famille des RCPG. Selon leur mécanisme effecteur préférentiel, ces récepteurs sont divisés en 4 sous-types différents (Figure 12) : les récepteurs couplés aux protéines G_i, qui inhibent l'adénylate cyclase (5-HT₁) ; les récepteurs couplés aux protéines G_q, qui activent la phospholipase C (5-HT₂) ; les récepteurs formant des canaux ioniques (5-HT₃) ; et les récepteurs couplés aux protéines G_s, qui activent l'adénylate cyclase (5-HT_{4/6/7}). Le couplage des récepteurs 5-HT₅ reste encore incertain (activateur ou inhibiteur de l'adénylate cyclase).

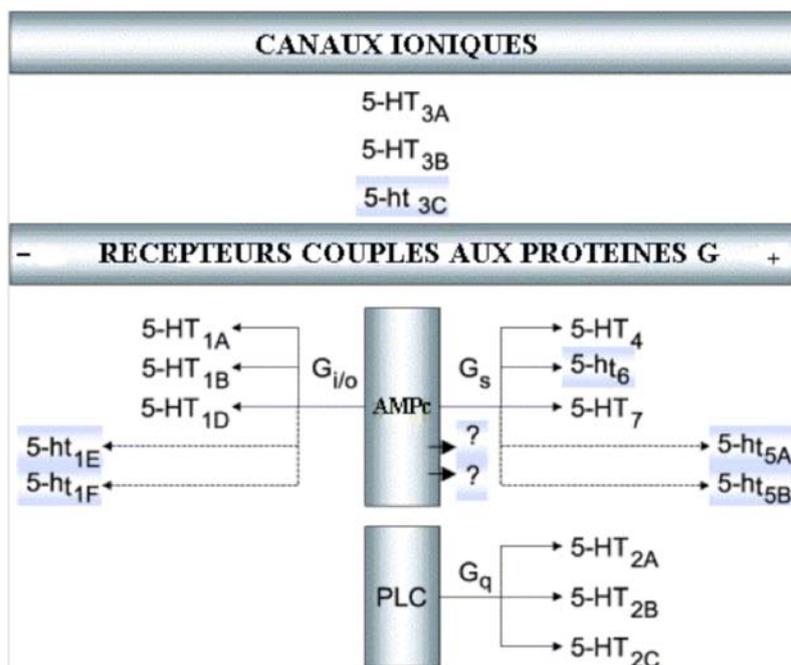


Figure 12 : Classification actuelle des récepteurs à la sérotonine et principales voies de signalisation

La fonction des récepteurs représentés sur fond bleu n'a pas encore été clairement identifiée dans un système natif.

- : couplage négatif ; + : couplage positif.

Extrait de Hoyer et coll., Pharmacology Biochemistry and Behavior 2002 [73]

La diversité des récepteurs sérotoninergiques est, de plus, augmentée par des modifications post-transcriptionnelles de certains gènes, comme l'épissage alternatif ou l'édition [74]. Enfin, la variété des récepteurs sérotoninergiques est encore accrue par la capacité de certains d'entre eux à former des homo- (5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄) ou des hétéro-dimères (5-HT_{1B/1D}) [75-79].

II.B Fonctions physiologiques et physiopathologiques de la sérotonine

II.B.1 Dans le système nerveux central

Dans le SNC, les fonctions physiologiques de la sérotonine sont nombreuses et complexes. Cette pluralité s'explique non seulement par la très large innervation

de l'ensemble du SNC par les projections sérotoninergiques mais également par l'existence d'au moins 14 récepteurs distincts de ce neuromédiateur (Figure 12). La sérotonine est impliquée dans de nombreuses fonctions vitales comme le contrôle du cycle veille/sommeil [80], l'activité motrice [81], le stress [82], la neurogenèse [83], la thermorégulation [84], la prise alimentaire [85], la nociception [86], les régulations endocrines [87] et neurovégétatives telles que le contrôle du rythme cardiaque et de la pression artérielle [88], ainsi que le comportement sexuel [89]. La sérotonine joue également un rôle dans la cognition [90].

Outre son rôle avéré dans le contrôle de l'humeur [91], la sérotonine intervient dans les mécanismes de régulation neurobiologique qui sous-tendent les émotions. Le dysfonctionnement du système sérotoninergique est impliqué dans certains troubles anxieux [92]. La sérotonine est également impliquée dans les troubles obsessionnels compulsifs [93], le comportement suicidaire [94], l'agressivité et l'impulsivité [95] et l'alcoolisme [96].

La dépression et les dérèglements de la prise alimentaire sont également des troubles du SNC pour lesquels un dysfonctionnement du système sérotoninergique a été largement décrit [97].

II.B.2 Dans les intestins

Le bol alimentaire qui arrive dans la lumière intestinale exerce une pression sur la muqueuse qui entraîne la sécrétion de la sérotonine par les cellules entérochromaffines. La sérotonine entre dans la *lamina propria*, où ses premières cibles sont les projections nerveuses des neurones primaires afférents (Figure 13). Ils sont de deux types : les neurones extrinsèques, activés par les récepteurs 5-HT₃, qui transmettent les sensations de nausées et d'inconfort intestinal au SNC, et les neurones intrinsèques, activés par les récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT₄. Les neurones intrinsèques cholinergiques localisés dans la sous-muqueuse initient les réflexes péristaltique et de sécrétion, tandis que les neurones intrinsèques myentériques, dont font partie les neurones sérotoninergiques, initient les contractions musculaires.

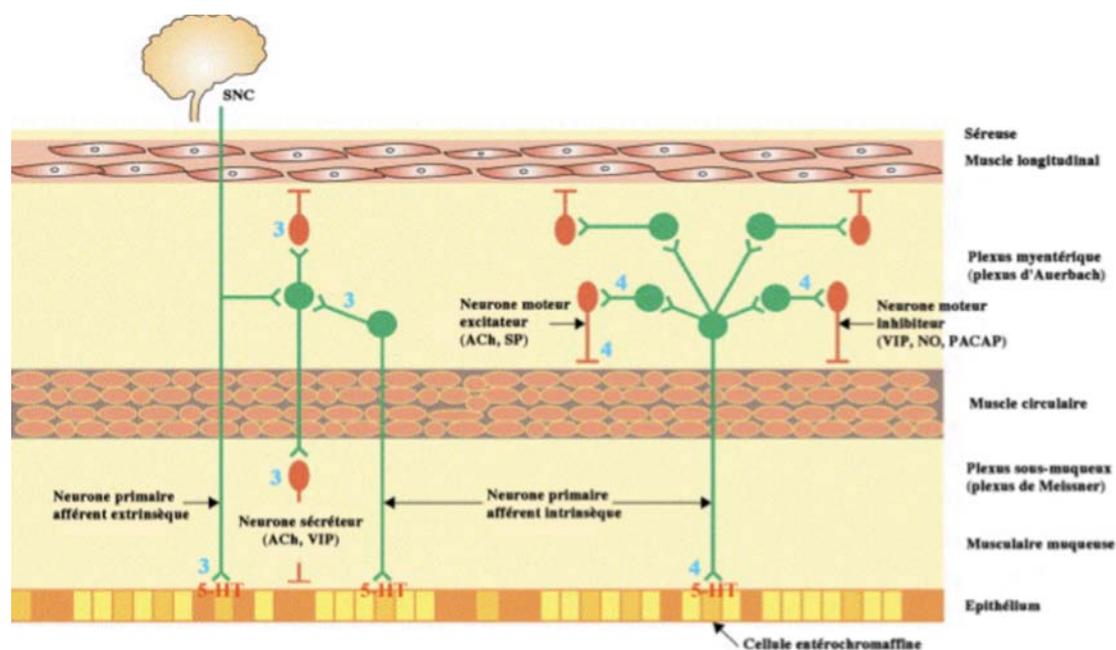


Figure 13 : Mode d'action de la sérotonine dans l'intestin

3 : récepteur 5-HT₃ ; 4 : récepteur 5-HT₄ ; ACh: acétylcholine ; VIP, vasoactive intestinal peptide ; SP: substance P ; NO: monoxyde d'azote ; PACAP : *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*.

Extrait de Talley et coll., Lancet 2001 [98]

La sérotonine sécrétée au sein du plexus myentérique par les neurones myentériques sérotoninergiques régule la neurotransmission intestinale. La sérotonine participe ainsi à l'initiation du réflexe péristaltique. Elle joue également un rôle dans ce réflexe, directement en tant que neurotransmetteur.

Les entérocytes, qui ne sont ni des neurones, ni des cellules sérotoninergiques (et ne synthétisant pas la sérotonine) expriment le transporteur 5-HTT. Ils finalisent l'action de la sérotonine en permettant sa capture et son élimination de l'espace interstitiel [99].

Un dérèglement du système sérotoninergique, soit au niveau du taux de sérotonine, ou encore au niveau de l'expression des principaux récepteurs sérotoninergiques intestinaux (5-HT₃, 5-HT₄) ou du 5-HTT pourrait être impliqué dans syndrome du colon irritable [100]. Le rôle joué par la sérotonine dans la physiologie normale des intestins laisse penser que des perturbations, mêmes mineures, du système sérotoninergique pourraient avoir des répercussions importantes sur la motilité et les sécrétions intestinales.

La libération massive de sérotonine par les tumeurs carcinoïdes serait à l'origine des cardiopathies carcinoïdes se caractérisant par des lésions valvulaires du cœur droit. Les tumeurs carcinoïdes résultent de la prolifération lente de cellules neuroendocrines [101, 102] et sont localisées dans le système gastro-intestinal dans 90 % des cas. Le développement de métastases et la libération massive dans le système porte de sérotonine et d'autres substances vasoactives (histamine, tachykinines, prostaglandines) pourrait expliquer la formation de plaques de tissu fibreux atteignant principalement les valves du cœur droit du fait de leur localisation en amont du filtre pulmonaire, riche en MAO-A permettant la dégradation de la sérotonine [103].

II.B.3 Dans l'hémostase primaire

La sérotonine synthétisée par les cellules chromaffines intestinales est sécrétée dans la circulation portale où elle est capturée au niveau hépatique par les plaquettes sanguines, ou thrombocytes, qui l'internalisent dans la cellule et la stockent dans les granules denses de sécrétion, via le 5-HTT et le VMAT₂ respectivement. Les plaquettes expriment à leur surface un seul récepteur sérotoninergique, le récepteur 5-HT_{2A} [104].

Les plaquettes sanguines ont pour fonction d'assurer l'hémostase, qui doit être rapide et localisée lors d'une lésion vasculaire. Trois processus se mettent en marche pour prévenir la perte sanguine : 1) l'hémostase primaire, qui comprend les étapes de spasme vasculaire, d'adhésion et d'activation plaquettaires, et qui ferme la brèche vasculaire par la formation d'un clou plaquettaire ; 2) la coagulation du sang qui consolide le premier thrombus en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges ; 3) la fibrinolyse qui permet la destruction des caillots ou la limitation de leur extension.

La sérotonine intervient lors de la première étape d'hémostase primaire. La paroi des vaisseaux sanguins est tapissée d'une monocouche de cellules endothéliales qui assurent son intégrité et qui n'autorisent ni l'activation des plaquettes, ni le processus de coagulation. Dès lors qu'une brèche vasculaire est formée, les plaquettes adhèrent aux protéines sous-endothéliales mises à nu par l'intermédiaire de leurs récepteurs membranaires glycoprotéiques spécifiques. Les protéines sous-endothéliales sont le collagène ou encore le facteur de von

Willebrand, qui sont également trouvées dans le plasma sanguin ainsi que dans les granules α des plaquettes. L'adhésion plaquettaire va induire leur changement de forme. Les plaquettes, normalement discoïdes, deviennent sphériques et forment des pseudopodes qui leur permettent de mieux adhérer entre elles et au substrat. Une première couche monocellulaire de plaquettes se constitue. Les plaquettes adhérentes sont activées, libèrent le contenu de leurs granules et recrutent d'autres plaquettes circulantes. Les granules denses contiennent de l'adénosine triphosphate (ATP), de l'adénosine diphosphate, du Ca^{2+} et de la sérotonine. Les granules α , quant à eux, contiennent des protéines pro-agrégantes dont le fibrinogène, ou le facteur de von Willebrand. Les glycoprotéines de surface IIb/IIIa subissent une modification conformationnelle qui leur permet de fixer le fibrinogène en présence de calcium. L'agrégation plaquettaire se fait ainsi, grâce au fibrinogène qui établit des ponts entre les plaquettes, créant un premier thrombus fragile (agrégation réversible). Grâce à la libération des enzymes et du contenu granulaire des plaquettes, le caillot se solidifie (agrégation irréversible), constituant le clou plaquettaire.

Les plaquettes « *collagen and thrombin activated platelets* » (COAT) sont une sous-population de plaquettes activées par le collagène et la thrombine, et qui expriment à leur surface une forte proportion des facteurs contenus dans les granules α avec la particularité d'être fixés à la membrane avec une très grande affinité [105, 106]. Une des caractéristiques portées par toutes les protéines α -granulaires fixées à la membrane des plaquettes COAT est d'être des substrats des transglutaminases (TGases). Ces dernières catalysent la formation calcium-dépendante de ponts peptidiques entre des résidus glutamine d'une séquence peptidique (donneur de groupements acyle) et des résidus lysine (donneur de groupements amine) ou des monoamines : c'est le phénomène de transamidation. Le composant donneur du groupement amine pour la réaction de transamidation à la surface des plaquettes COAT est la sérotonine, libérée en grande quantité par les plaquettes activées (Figure 14) [107]. Les interactions multiples des protéines α -granulaires avec les molécules de surface des plaquettes stabilisent le réseau de protéines pro-agrégantes à la surface des plaquettes COAT et augmentent ainsi l'agrégation plaquettaire.

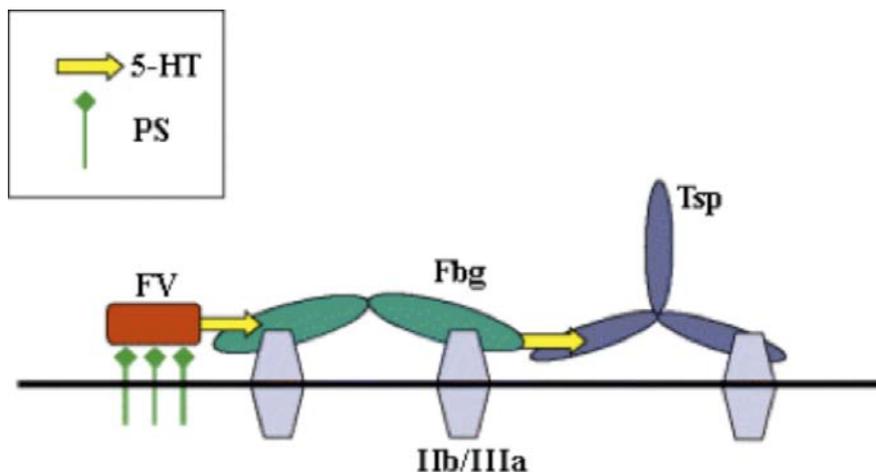


Figure 14 : Rôle de la sérotonine dans la formation des plaquettes COAT

Les protéines pro-coagulantes se lient à leurs récepteurs traditionnels : le facteur V à la phosphatidylsérine et le fibrinogène aux glycoprotéines IIb/IIIa.

Les protéines des granules α , ici le facteur V et le fibrinogène, sont liées de façon covalente à la surface des plaquettes COAT par l'intermédiaire d'une réaction de transglutamination initiée par la sérotonine (flèches jaunes).

Le fibrinogène et la thrombospondine possèdent des sites de liaison qui reconnaissent la sérotonine conjuguée. Sur cette figure, la tête de la flèche jaune est liée aux sites de liaison de la sérotonine du fibrinogène et de la thrombospondine.

5-HT : sérotonine ; Fbg : fibrinogène ; FV : facteur V ; PS : phosphatidylsérine ; Tsp : thrombospondine.

Extrait de Dale, Journal of Thrombolysis and Haemostasis 2005 [106]

La sérotonine intervient aussi dans l'hémostase primaire via un mécanisme de signalisation intracellulaire responsable de l'exocytose des granules α plaquettaires (Figure 15) [108].

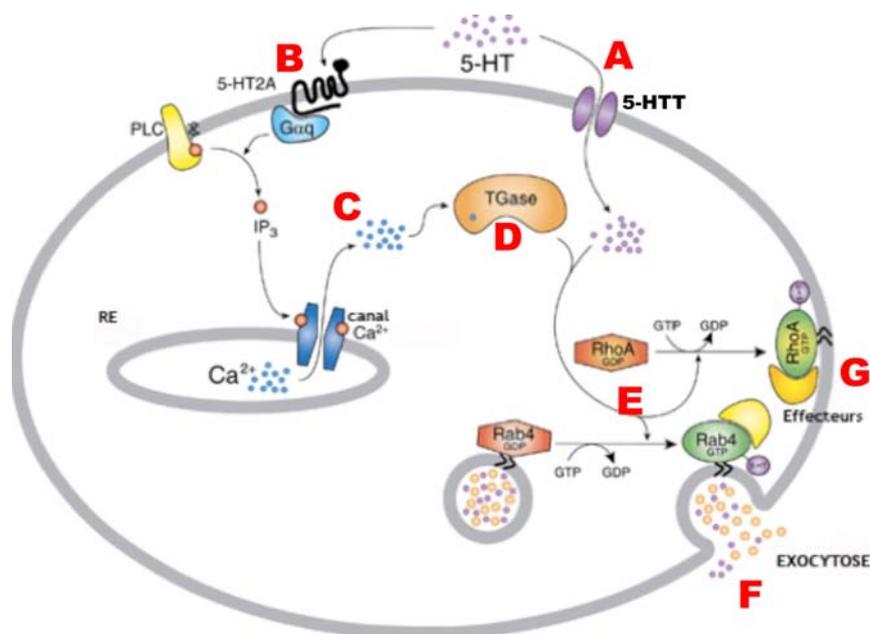


Figure 15 : Exocytose des granules α plaquettaire induite par la sérotonine durant le processus d'agrégation plaquettaire

5-HT : sérotonine ; 5-HT_{2A} : récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine ; 5-HTT : transporteur de la sérotonine ; GDP : Guanosine diphosphate ; GTP : Guanosine triphosphate ; IP₃ : inositol triphosphate ; PLC : phospholipase C, RE : réticulum endoplasmique ; TGase : transglutaminase.

Extrait de Walther et coll., Cell 2003 [108]

La sérotonine activement importée dans le cytoplasme plaquettaire par son transporteur le 5-HTT (Figure 15A), est normalement stockée dans les granules denses de sécrétion. La stimulation du récepteur 5-HT_{2A} couplé aux protéines G_{αq} (Figure 15B) aboutit à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Figure 15C). Les transglutaminases sont activées par le Ca²⁺ (Figure 15D) et utilisent la sérotonine pour transamider les petites protéines G RhoA et Rab4 (Figure 15E), les rendant ainsi constitutivement actives car incapables d'hydrolyser le GTP en GDP. L'activation des GTPases RhoA et Rab4 aboutit à des réarrangements du cytosquelette et à l'exocytose des granules α . Le contenu des granules α est déversé dans la circulation sanguine (Figure 15F) ou est lié de façon covalente aux glycoprotéines de la membrane plasmique (Figure 15G). Ce mécanisme, appelé « sérotonylation », fait intervenir à la fois le récepteur 5-HT_{2A} et le transporteur 5-HTT. Il pourrait être initié plus largement par toutes les monoamines, comme l'histamine ou les catécholamines, et donc correspondre à un mécanisme général de "monoaminylation" [108].

II.B.4 Dans le système cardiovasculaire

Les effets physiologiques de la sérotonine sur le système cardiovasculaire sont multiples : bradycardie ou tachycardie, hypotension ou hypertension, vasoconstriction ou vasodilatation. Ces effets multiples sont dus à la présence de sérotonine à la fois dans le SNC et à la périphérie (Figure 16).

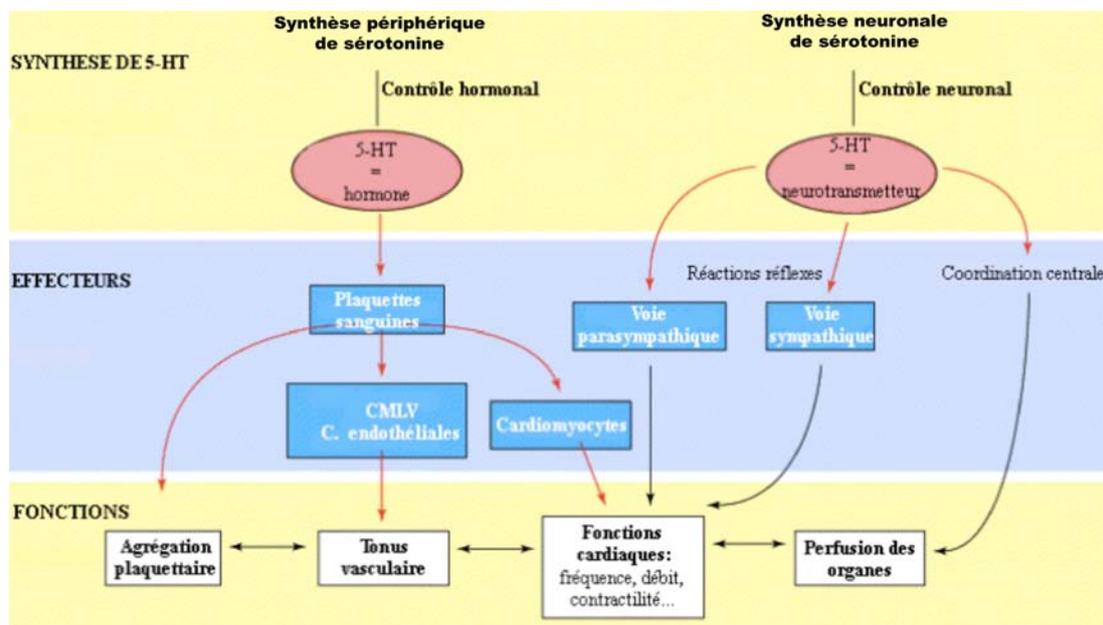


Figure 16 : Régulation du système cardiovasculaire par la sérotonine

La régulation cardiovasculaire comprend deux niveaux de contrôle : un contrôle hormonal qui fait intervenir des substances vaso-actives comme la sérotonine ; et un contrôle neuronal qui fait intervenir une régulation centrale et des réactions réflexes via les systèmes sympathiques et parasympathiques.

D'après Cote et coll., Trends in Molecular Medicine 2004 [109]

Certains effets résultent de l'action de la sérotonine dans le SNC qui peut alors participer à la régulation des voies réflexes sympathiques ou parasympathiques. D'autres effets résultent de l'action locale de la sérotonine périphérique sur les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules cardiaques (cardiomyocytes et fibroblastes) ou encore sur les plaquettes sanguines.

II.B.4.a La régulation cardiovasculaire centrale par la sérotonine

Le contrôle des fonctions cardiovasculaires par le système nerveux se fait essentiellement à partir du centre cardiovasculaire logé dans le bulbe rachidien (Figure 17).

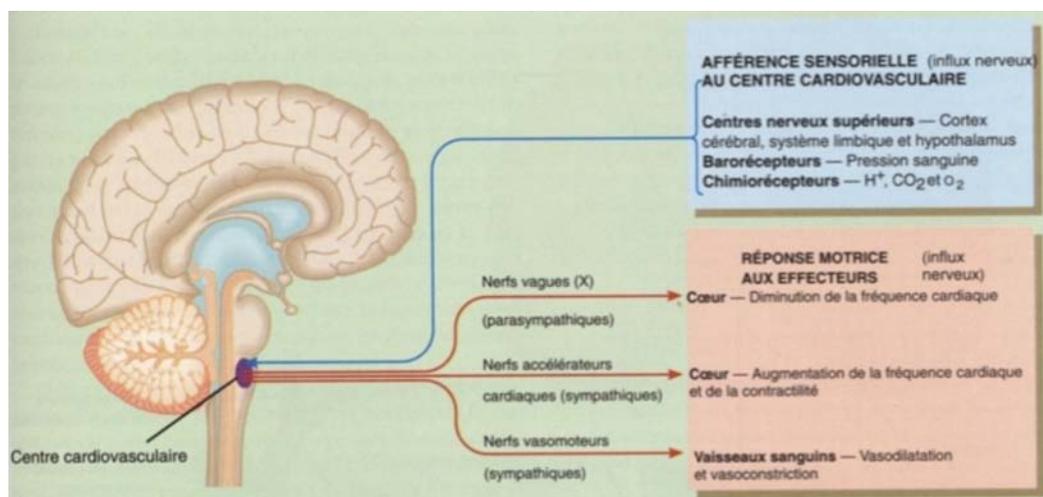


Figure 17 : Contrôle des fonctions cardiovasculaires par le centre cardiovasculaire

Le centre cardiovasculaire reçoit des afférences des régions supérieures du cerveau, des barorécepteurs et des chimiorécepteurs. Il engendre des réponses vers les divisions sympathique et parasympathique du système nerveux autonome.

D'après Tortora et coll., Principles of Anatomy and Physiology 1994 [110]

Le centre reçoit des afférences sensorielles des régions cérébrales comme le cortex, le système limbique ou l'hypothalamus, et engendre des réponses cardiovasculaires par l'intermédiaire du système nerveux autonome. Ce dernier, qui comprend les divisions sympathiques et parasympathiques, ainsi que les nerfs accélérateurs cardiaques et vasomoteurs régule l'activité des muscles lisses, du muscle cardiaque et de certaines glandes.

Le système parasympathique contrôle les activités qui permettent la conservation et le rétablissement de l'énergie corporelle pendant les périodes de repos ou de récupération. Le système sympathique, quant à lui, prépare le corps aux situations d'urgence. Il est surtout relié aux processus qui entraînent une dépense d'énergie. Lorsque l'organisme est en homéostasie, la fonction principale du système sympathique est de combattre suffisamment les effets parasympathiques pour permettre le maintien des fonctions qui nécessitent de l'énergie. La stimulation du cœur par le système sympathique augmente la fréquence cardiaque et la

contractilité. Les influx sympathiques atteignent le cœur par l'intermédiaire des nerfs accélérateurs cardiaques (Figure 17). La stimulation parasympathique du cœur, transmise par le nerf vague (X), abaisse la fréquence cardiaque. Ainsi, le contrôle du cœur par le système nerveux autonome résulte d'influences opposées, celle du système sympathique, stimulatrice, et celle du système parasympathique, inhibitrice. Par ailleurs, le centre cardiovasculaire envoie continuellement des influx au muscle lisse des parois des vaisseaux sanguins par l'intermédiaire des nerfs vasomoteurs sympathiques (Figure 17). Le contrôle de la vasomotricité des vaisseaux sanguins par le système nerveux autonome dépend exclusivement de la division sympathique.

Les voies sérotoninergiques centrales innervent certaines zones impliquées dans la régulation du système cardiovasculaire [111]. Il apparaît que les effets des voies sérotoninergiques sont multiples, excitateurs ou inhibiteurs du système sympathique. Ils dépendent du site exact d'administration de la sérotonine, dans le SNC, de l'espèce animale considérée, du statut anesthésique des animaux, et également des récepteurs sérotoninergiques mis en jeu, qui sont au nombre de trois : les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} et 5-HT₃.

II.B.4.a.i Les récepteurs 5-HT_{1A}:

Des études pharmacologiques ont démontré que l'injection d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} provoque une inhibition sympathique centrale et une augmentation du tonus vagal chez la plupart des espèces étudiées. Les aires cérébrales majeures impliquées dans cette sympatho-inhibition sont la moelle ventro-latérale rostrale et le tegmentum latéral [111, 112].

II.B.4.a.ii Les récepteurs 5-HT_{2A}:

L'injection centrale d'un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT₂ couplée à l'inhibition périphérique des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} induit une profonde sympatho-excitation et une augmentation de la pression artérielle systémique. Comme pour les récepteurs 5-HT_{1A}, l'aire majeure responsable de l'excitation sympathique après stimulation du récepteur 5-HT₂ est la moelle ventro-latérale rostrale [111, 113, 114].

II.B.4.a.iii Les récepteurs 5-HT₃:

Ils sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire périphérique, et donc de la pression artérielle. L'activation de ces récepteurs situés au niveau des terminaisons afférentes vagales entraîne une bradycardie et une diminution de la pression artérielle [114]. Chez l'homme et chez l'animal, la stimulation des récepteurs 5-HT₃ des terminaisons vagales contribuerait à la sensation de douleur cardiaque suite à une ischémie myocardique [115, 116].

II.B.4.b La régulation cardiovasculaire périphérique du système sérotoninergique

Outre son rôle dans l'hémostase primaire, l'internalisation de la sérotonine dans les plaquettes sanguines a également pour but de protéger l'organisme de ses effets vaso-actifs puissants, et de sa toxicité connue. Le plasma sanguin contient donc des taux très faibles de sérotonine puisque sa concentration est de l'ordre de quelques nanomoles par litre [117], tandis que sa concentration plaquettaire est de l'ordre de plusieurs micromoles par litre [118, 119]. Ainsi, la sérotonine qui n'est pas internalisée dans les plaquettes est rapidement métabolisée par la MAO-A dans les poumons et dans le foie. Aussi, différents phénomènes pathologiques comme l'inflammation, l'ischémie-reperfusion, la thrombose ou l'hypertension, vont être à l'origine d'une activation plaquettaire aiguë ou chronique et d'un relargage massif de la sérotonine source de puissants effets vasculaires et cardiaques.

II.B.4.b.i La sérotonine dans la physiologie vasculaire

Les vaisseaux sanguins possèdent les propriétés importantes d'élasticité et de contractilité, indispensables à la régulation de leur tonus. La contractilité des vaisseaux est assurée par les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires qui sont des cellules hautement différenciées, contractiles, quiescentes et en général insensibles aux facteurs mitogènes. Les cellules endothéliales qui tapissent la lumière des vaisseaux sanguins participent également à la régulation du tonus vasculaire car ils libèrent d'importants médiateurs chimiques de la vasoconstriction et de la vasodilatation, tels que le NO, l'ET, l'AT₂, mais également la sérotonine.

La sérotonine régule le tonus vasculaire par l'intermédiaire de cinq de ses récepteurs et de son transporteur, exprimés à la fois au niveau des cellules

endothéliales vasculaires et des CML (Figure 18) [120]. Les cellules endothéliales vasculaires expriment les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, et en moindre proportion 5-HT₄. Les CML, quant à elles, expriment les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇, et dans certains cas particuliers 5-HT_{2B}. Le niveau d'expression de chacun des récepteurs dépend très largement de l'espèce et du tissu étudié.

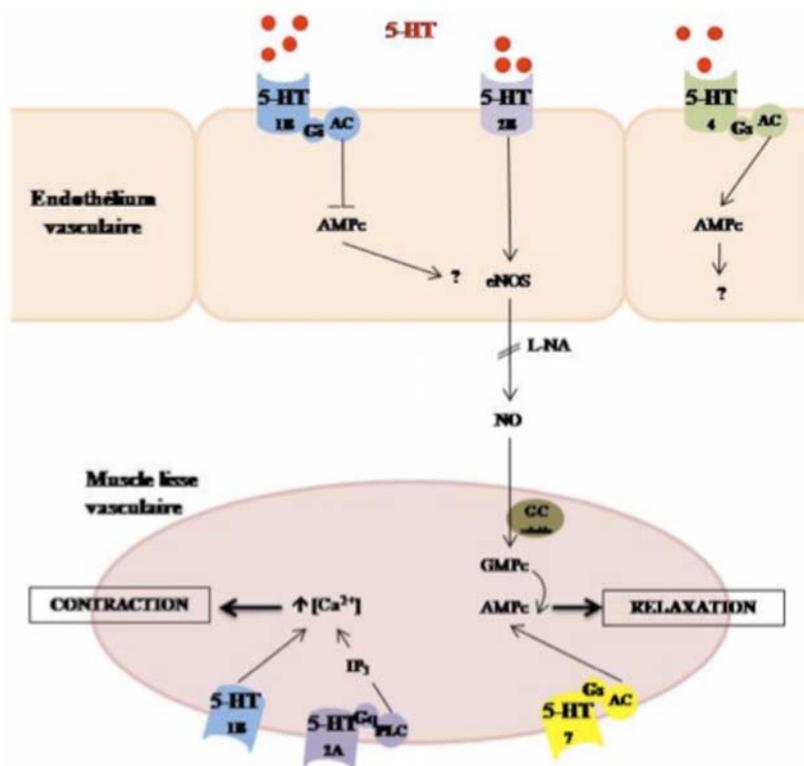


Figure 18 : Régulation du tonus vasculaire par la sérotonine

Extrait de Ullmer et coll., FEBS Letter 1995 [120]

L'activation des récepteurs sérotoninergiques présents à la surface des cellules endothéliales induit une vasodilatation, tandis que la stimulation par la sérotonine des CML produit une vasoconstriction (Figure 18).

Des modifications des niveaux de sérotonine circulante et/ou de l'expression de ses récepteurs vasculaires et de son transporteur sont à l'origine d'importants remodelages anatomiques des vaisseaux et de graves pathologies fonctionnelles telles que l'hypertension artérielle pulmonaire ou systémique [121, 122].

II.B.4.b.ii La sérotonine dans la physiologie cardiaque

La sérotonine jouerait un rôle important dans l'embryologie cardiaque fœtale via son récepteur 5-HT_{2B}, impliqué dans les mouvements morphogénétiques cardiaques dès le 8^{ième} jour embryonnaire [123, 124].

Dans le cœur adulte, les deux actions physiologiques de la sérotonine sont la régulation de la fréquence et de la contractilité cardiaque. Le rôle de la sérotonine au niveau cardiaque dépend des récepteurs activés. Parmi les 14 récepteurs à la sérotonine identifiés, 4 ont été détectés au niveau du cœur (récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT₄) mais deux populations (5-HT_{2A/2B} et 5-HT₄) sont exprimées au niveau du myocarde, les récepteurs 5-HT_{1B} étant préférentiellement localisés au niveau des artères pulmonaires et des artères coronaires (Figure 19).

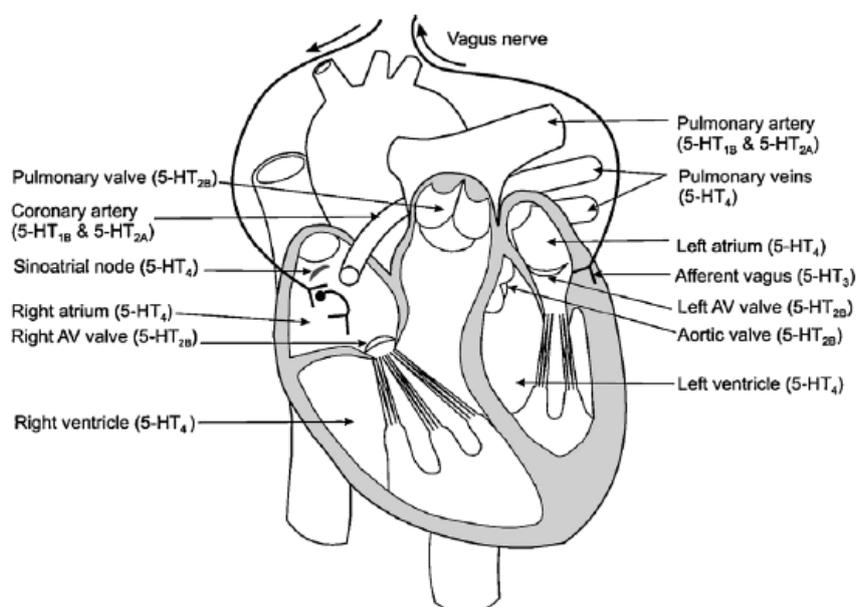


Figure 19 : Localisation des récepteurs sérotoninergiques dans le cœur humain

Extrait de Kaumann et coll., Pharmacology & Therapeutics [125]

Chez l'homme, les effets de la sérotonine au niveau du muscle cardiaque font intervenir principalement la signalisation du récepteur 5-HT₄. Le récepteur 5-HT₄ est essentiellement impliqué dans le contrôle de l'activité électrique et de la contractilité cardiaque [126], sans véritable rôle trophique sur le myocarde. L'administration de sérotonine par voie intraveineuse provoque bradycardie [127] ou tachycardie [128-130]. L'activation des récepteurs 5-HT₄ auriculaires par la sérotonine permettrait d'augmenter la contractilité myocardique en accélérant la

relaxation [131-133]. L'activation des récepteurs 5-HT₄ exprimés au niveau des trabécules des oreillettes et au niveau du myocarde serait la cause d'effets arythmogènes [134, 135]. Chez les patients en fibrillation atriale chronique, l'isoforme 5-HT_{4B} est surexprimé au niveau des oreillettes [135]. Les récepteurs 5-HT₄ sont également exprimés dans les ventricules cardiaques humains [136] où leur fonction est plus difficile à mettre en évidence. Le récepteur 5-HT₄ est couplé positivement à l'adénylate cyclase via une protéine G_s ; et son activation entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. Dans les ventricules, l'AMPc est hydrolysé par les phosphodiésterases (PDE), estompant ainsi l'effet de l'activation du récepteur ventriculaire 5-HT₄. L'utilisation d'un inhibiteur non spécifique des PDE confirme le rôle inotrope positif de la sérotonine, associée à une accélération de la relaxation et à une arythmie de contraction ventriculaire [137].

Le rôle de la sérotonine dans l'IC et particulièrement dans le remodelage ventriculaire est abordé dans le chapitre III.

II.C Conclusion

Le rôle physiologique de la sérotonine au niveau du système cardiovasculaire, et son parallélisme d'action avec les autres monoamines telle que la NA, laissent penser que le système sérotoninergique pourrait participer à l'aggravation de l'IC, au même titre que les autres systèmes d'adaptation neuro-hormonaux, en intervenant dans le remodelage ventriculaire. En effet, chez l'homme, l'IC et le remodelage ventriculaire s'accompagnent d'une augmentation des taux circulants de sérotonine [59, 60].

III La sérotonine et le remodelage ventriculaire

Les voies d'actions de la sérotonine au niveau cardiaque passent par deux mécanismes : l'un récepteur-dépendant, l'autre récepteur-indépendant, empruntant la voie du transporteur de la sérotonine puis de son enzyme de dégradation, la monoamine oxydase-A [138].

III.A Les effets récepteur-dépendants

Le rôle de la sérotonine au niveau cardiaque dépend des récepteurs activés. Trois récepteurs à la sérotonine sont retrouvés au niveau du cœur (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT₄). Leur expression dépend cependant de l'espèce considérée.

III.A.1 Récepteur 5-HT₄ et remodelage ventriculaire

Chez l'homme, les transcrits du récepteur 5-HT₄ retrouvés dans les ventricules sont augmentés d'un facteur 4 dans l'IC, suggérant un rôle de ce récepteur dans le remodelage ventriculaire [137].

Chez le rat, la sérotonine exerce des effets inotrope et lusitrope positifs chez les animaux souffrant d'IC post-infarctus. Ces effets de la sérotonine sont médiés par son récepteur 5-HT₄ et sont observés exclusivement chez les rats ayant développé une IC, avec une ampleur similaire à celle induite par la stimulation des récepteurs β 1-adrénergiques dans l'IC [139]. Cette similarité d'action entre les deux systèmes renforce le rôle potentiel du système sérotoninergique dans le remodelage ventriculaire et offre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Par ailleurs, de nombreux travaux suggèrent que la sérotonine pourrait contribuer indirectement au remodelage ventriculaire en stimulant la biosynthèse d'aldostérone [140] via son récepteur 5-HT₄ [125], confirmant la probable interaction du système sérotoninergique avec les autres systèmes d'adaptation neuro-hormonaux mis en jeu au cours de l'IC [141].

Chez la souris, la signalisation sérotoninergique cardiaque est assez différente de celle décrite chez l'homme ou chez le rat, en partie parce que le récepteur 5-HT₄ n'y est pas exprimé. Parmi les récepteurs sérotoninergiques murins, les récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2A} semblent particulièrement impliqués dans le remodelage ventriculaire.

III.A.2 Récepteur 5-HT_{2B} et remodelage ventriculaire

L'inactivation génétique du récepteur 5-HT_{2B} provoque des anomalies du développement cardiaque qui induisent une létalité embryonnaire et néonatale partielle qui survient vers le 10^{ème} jour de développement [142]. Cette première phase de létalité conduit à la mort *in utero* de 30% des embryons. Durant la première semaine de vie postnatale, une seconde phase de létalité affecte 30% des souriceaux nouveau-nés. L'étude histologique de la couche compacte du myocarde des embryons 5-HT_{2B}^{-/-} à 10 jours montre une différenciation prématurée des cellules trabéculaires qui formeront le myocarde, affectant ainsi l'organisation des sarcomères. La différenciation précoce s'accompagne d'un défaut de prolifération et de migration des cellules trabéculaires, conduisant à l'hypoplasie des ventricules dont les parois se trouvent très amincies. La rupture de ces parois est sans doute la cause de cette létalité.

La sérotonine, en stimulant le récepteur 5-HT_{2B}, est impliquée dans la structure et la fonction des cardiomyocytes adultes. En effet, les souris 5-HT_{2B}^{-/-} qui survivent présentent à l'âge adulte des caractéristiques morphologiques, moléculaires et biochimiques similaires à celles de patients souffrant de cardiomyopathie dilatée (CMD) [143].

Les animaux mutants présentent à l'âge de 6 semaines une CMD qui se caractérise par une réduction de 24% de la masse ventriculaire cardiaque, une dilatation ventriculaire gauche accompagnée d'un amincissement des parois ventriculaires (Figure 20). Ces anomalies morphologiques, d'abord identifiées par une analyse histologique ont été confirmées par échocardiographie chez des souris âgées de 19 semaines.

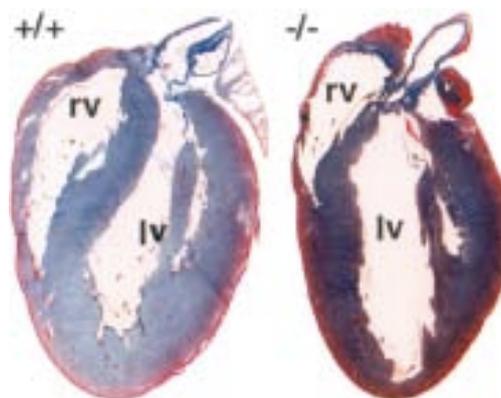


Figure 20 : Cardiomyopathie dilatée développée par les souris 5-HT_{2B}^{-/-}
Coupes sagittales représentatives du cœur adulte d'un souris 5-HT_{2B}^{+/+} vs. 5-HT_{2B}^{-/-}.
VD : ventricule droit ; VG : ventricule gauche. Barre d'échelle : 200µM.
D'après Nebigil et coll., Circulation 2001 [144]

La fraction de raccourcissement du ventricule gauche, reflet de la fonction systolique du ventricule gauche, est significativement diminué chez les mâles 5-HT_{2B}^{-/-}, démontrant ainsi un défaut de contractilité [143, 145]. Ce défaut est lié à la diminution significative des N-cadhérines, molécules d'adhésion, et à la présence de disques intercalaires anormaux entre les cardiomyocytes de ces souris. Par ailleurs, l'analyse biochimique de marqueurs de souffrance cardiaque couramment utilisés en pathologie humaine tels que la *creatin kinase muscle brain* (CK-MB) ou la troponine I cardio-spécifique, a montré une augmentation du taux de ces marqueurs dans le sérum des souris 5-HT_{2B}^{-/-} par rapport aux souris sauvages.

Pourtant, la CMD induite par la délétion du gène du récepteur 5-HT_{2B} n'est pas compensée par un phénomène de type hypertrophique, comme observé au cours du remodelage ventriculaire. Aussi, les souris 5-HT_{2B}^{-/-} ne réexpriment pas le programme génétique fœtal, stigmata habituel du mécanisme hypertrophique [143].

En revanche, la surexpression du récepteur 5-HT_{2B} spécifiquement dans les cardiomyocytes entraîne le développement d'une cardiomyopathie hypertrophique (CMH) chez les souris transgéniques [144]. Les parois ventriculaires gauches sont alors épaissies, sans que les paramètres hémodynamiques (contractilité cardiaque, pression artérielle et fréquence cardiaque) ne soient altérés. Les caractéristiques morphologiques de la CMH sont confirmées par la réexpression du programme génétique fœtal. Enfin, le cœur des souris transgéniques présente un nombre

anormalement élevé de mitochondries ainsi qu'une augmentation de l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase et de la cytochrome c oxydase, enzymes associées au métabolisme mitochondrial [144].

Le rôle du récepteur 5-HT_{2B} dans le remodelage ventriculaire semble intervenir préférentiellement au niveau des fibroblastes cardiaques. En effet, l'invalidation génétique ou pharmacologique du récepteur 5-HT_{2B} chez la souris empêche en partie le développement de l'hypertrophie cardiaque provoquée par perfusion chronique d'isoprénaline (agoniste β -adrénergique). L'augmentation attendue du taux plasmatique de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α , normalement sécrétées par les fibroblastes cardiaques dans ce modèle de remodelage ventriculaire, n'est pas retrouvée chez les souris invalidées génétiquement ou pharmacologiquement pour ce récepteur. Par son action sur la libération des médiateurs de l'inflammation par les fibroblastes cardiaques, le récepteur 5-HT_{2B} est indispensable au développement du remodelage ventriculaire induit par la stimulation β adrénergique [141].

III.A.3 Récepteur 5-HT_{2A} et remodelage ventriculaire

Les travaux réalisés chez le rat sur un modèle d'IC chronique après infarctus du myocarde (IDM) retrouvent une augmentation de la transcription du récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine dans les muscles papillaires des rats en IC. Pourtant, cette surexpression du récepteur 5-HT_{2A} ne participe pas à l'augmentation des réponses inotrope et lusitrope positives induites par la sérotonine qui seraient médiées par le récepteur 5-HT₄, laissant supposer un rôle potentiel dans le remodelage ventriculaire, indépendant des effets sur la contraction et la relaxation [139]. En revanche, dans un modèle d'IC aiguë après IDM, la réponse inotrope à la sérotonine serait médiée à parts égales par ses deux récepteurs 5-HT₄ et 5-HT_{2A}. Dans ce modèle, l'effet inotrope positif médié par le récepteur 5-HT₄ emprunterait une voie AMPc-dépendante, par couplage à la protéine G_s, comme cela est observé pour les récepteurs adrénergiques (β 1 et β 2). L'effet inotrope positif médié par le récepteur 5-HT_{2A} emprunterait une voie AMPc-indépendante, par couplage à la protéine G_q, de manière identique aux récepteurs α 1-adrénergiques [146]. Des travaux plus récents ont montrés dans un modèle de surcharge barométrique que la réponse inotrope positive induite par la sérotonine était proportionnelle à l'hypertrophie myocardique et augmentée avec l'apparition d'une dysfonction systolique. Cette réponse inotrope

positive à la sérotonine serait médiée par son récepteur 5-HT_{2A} en phase hypertrophique et par son récepteur 5-HT₄ en phase d'IC [147]. Ces résultats démontrent la plasticité d'adaptation du système sérotoninergique au cours des différentes phases du remodelage ventriculaire qui accompagnent l'IC.

Pourtant, peu de données sont disponibles sur le rôle du récepteur 5-HT_{2A} dans le remodelage ventriculaire et l'insuffisance cardiaque, indépendamment de ses effets inotropes.

III.B Les effets récepteurs-indépendants

III.B.1 Transporteur de la sérotonine et remodelage ventriculaire

Le rôle physiologique du 5-HTT est d'extraire la sérotonine du milieu circulant pour en limiter les effets récepteurs-dépendants sur la cellule. Ainsi, au niveau du cœur, le 5-HTT prédomine au niveau des cellules endothéliales vasculaires et endocardiques où il permet, en internalisant la sérotonine dans la cellule, de limiter l'exposition des cellules résidentes cardiaques. Aussi, les souris déficientes pour le 5-HTT développent une cardiopathie dilatée hypokinétique caractérisée par la présence d'une fibrose myocardique périvasculaire et valvulaire [148].

Les précédents travaux du laboratoire ont montré qu'en internalisant la sérotonine et en l'exposant à son enzyme de dégradation, la MAO-A, le 5-HTT participait à une voie d'action récepteur-indépendante ayant un effet trophique sur le myocarde.

III.B.2 Monoamine oxydase-A et remodelage ventriculaire

La MAO-A, isoforme des MAO prédominant au niveau des ventricules, représente une importante source d'ERO au niveau cardiaque [149]. L'IC et l'hypertrophie myocardique s'accompagnent d'une augmentation de l'expression génique de la MAO-A [150].

Les précédents travaux du laboratoire ont montré que la MAO-A pouvait médier l'hypertrophie induite par la sérotonine sur les cardiomyocytes de rat [151]. Les données récentes suggèrent que la concentration de sérotonine serait l'un des

facteurs influençant le passage d'un effet récepteur-dépendant à un effet récepteur-indépendant [138].

III.B.2.a MAO-A et hypertrophie

In vitro, la MAO-A participe au développement d'une hypertrophie des cardiomyocytes par de faibles doses de sérotonine (1 – 5 μ M) [151]. La sérotonine, internalisée dans le cardiomyocyte de rat, est dégradée par la MAO-A, source d'ERO activant les kinases ERK hypertrophiantes (Figure 21).

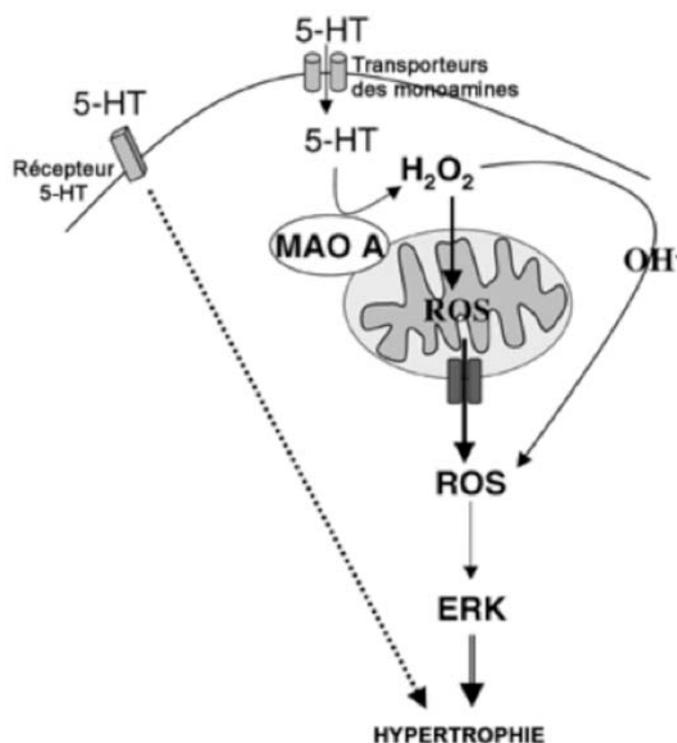


Figure 21 : Mécanismes d'action de la sérotonine menant à l'hypertrophie des cardiomyocytes

La sérotonine, internalisée dans le cardiomyocyte par un transporteur spécifique des monoamines, est dégradée par la monoamine oxydase-A mitochondriale. La déamination produit de l' H_2O_2 dont la transformation en espèce réactive de l'oxygène active les kinases hypertrophiantes ERK. Par ailleurs, la sérotonine a également un rôle hypertrophiant par l'intermédiaire de ses récepteurs exprimés par les cardiomyocytes, dont le récepteur $5-HT_{2A}$.

5-HT : sérotonine ; ERO : espèce réactive de l'oxygène ; MAO-A : monoamine oxydase-A.

Extrait de Bianchi *et coll.*, *Faseb J.* 2005 [152]

Dans cette étude, l'inhibition des récepteurs $5-HT_{2A}$ et $5-HT_{2B}$ diminuait la réponse hypertrophique de 30 %. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle

l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par la sérotonine impliquerait un double mécanisme mettant en jeu les récepteurs et la MAO-A, tous deux nécessaires à une réponse maximale. Des travaux antérieurs réalisés sur les CML des vaisseaux pulmonaires ont montrés l'activation conjointe des deux voies d'action convergeant vers l'activation des kinases ERK1/2. Ainsi, la voie récepteur-dépendante induirait la phosphorylation des kinases ERK et les ERO générées par la MAO-A permettraient leur translocation dans le noyau [153]. Dans le domaine de l'hypertension artérielle pulmonaire, plusieurs travaux ont montré que la présence conjointe des récepteurs et du transporteur de la sérotonine était nécessaire à l'apparition de la maladie [154-156].

Par ailleurs, les ERO ont été impliqués dans l'expression et la signalisation de certains RCPG au niveau du cœur, comme les récepteurs à la dopamine [157], les récepteurs β -adrénergiques [158] et les récepteurs AT1 [159].

III.B.2.b MAO-A et apoptose

Les précédents travaux du laboratoire ont montré que les effets apoptotiques de fortes doses de sérotonine (10 μ M) sur le cardiomyocyte de rat étaient entièrement médiés par la MAO-A, à l'origine d'une cascade apoptotique impliquant le cytochrome C, l'augmentation de la protéine pro-apoptotique Bax et la diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [152]. La protection des cardiomyocytes de l'apoptose par le récepteur 5-HT_{2B}, en prévenant du clivage des pro-caspases, expliquerait les effets opposés des voies récepteurs-dépendantes et récepteurs-indépendantes [160]. L'augmentation des taux circulants de sérotonine pourrait être à l'origine d'une désensibilisation et d'une diminution des récepteurs de la sérotonine, expliquant leur faible implication dans la réponse aux fortes doses de sérotonine.

In vivo, l'activation plaquettaire secondaire aux mécanismes d'ischémie-reperfusion expliquerait les fortes doses de sérotonine retrouvée dans l'espace interstitiel et contribuant à l'extension de la lésion [161]. Les travaux du laboratoire ont montré que la MAO-A, via la production d'ERO en réponse à l'internalisation cellulaire de la sérotonine, intervenait de façon centrale dans la taille de la zone infarctée après ischémie-reperfusion [152].

III.C Conclusion

Les mécanismes d'action de la sérotonine dans le contrôle de la croissance et la mort des cardiomyocytes impliquent une double voie : l'une classique dépendante des récepteurs de la sérotonine ; l'autre, atypique, dépendante de l'internalisation cellulaire de la sérotonine par son transporteur puis de sa dégradation par la MAO-A. Ces deux voies d'action agiraient de façon synergique dans la signalisation de la croissance et la survie des cardiomyocytes, en fonction des concentrations en sérotonine. Ainsi, de faibles concentrations en sérotonine favoriseraient une signalisation récepteur-dépendante pro-hypertrophiante, alors que de fortes concentrations favoriseraient une signalisation récepteur-indépendante pro-apoptotique, centrée sur l'activation de la MAO-A (Figure 22) [138].

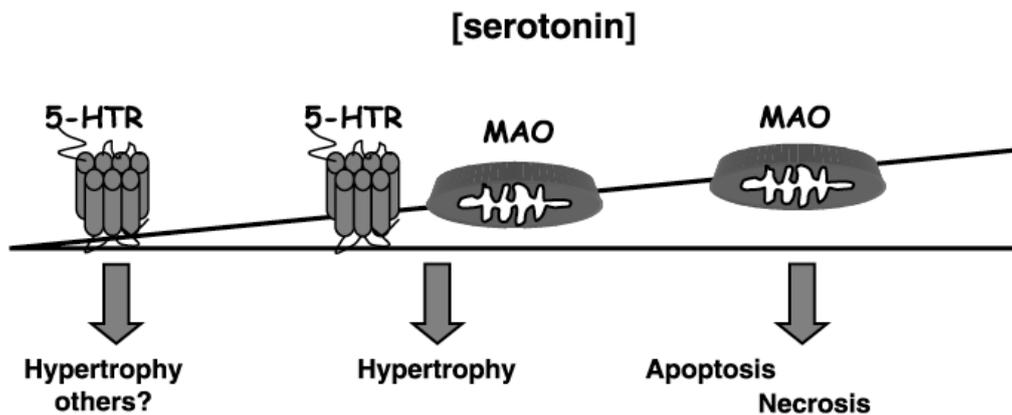


Figure 22 : Effets hypothétiques des concentrations de sérotonine sur le passage d'une voie de signalisation récepteur-dépendante à une voie dépendante de la monoamine oxydase

5-HTR : récepteurs à la sérotonine, MAO : monoamine oxydase

D'après Mialet-Perez et coll., Journal of Neuronal Transmission 2007 [138]

Pourtant, si la participation des deux voies de signalisation dans la croissance et la survie des cardiomyocytes semble bien établie, leur rôle dans le remodelage ventriculaire et les cellules médiatrices de leurs effets sont encore mal définis.

IV Objectifs de la thèse

L'objectif de nos travaux a été de préciser le rôle de la MAO-A et de son substrat principal, la sérotonine, dans le remodelage ventriculaire par une approche *in vivo*.

Dans une première étude de recherche fondamentale, nous avons étudié l'influence de la MAO-A sur le myocarde en conditions physiologiques et pathologiques. Pour ce travail, nous avons caractérisé le phénotype cardiaque de souris déficientes pour la MAO-A en conditions physiologiques et en conditions de surcharge barométrique induite par une sténose aortique.

Dans une deuxième étude de recherche fondamentale, issue des résultats de la première, nous nous sommes intéressés au rôle du récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine dans le remodelage ventriculaire. Pour ce travail, nous avons étudiés l'effet d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A} sur la réponse hypertrophique et la transition vers la dysfonction systolique du ventricule secondaire à la surcharge barométrique induite par une sténose aortique chez la souris.

Dans une troisième étude s'appuyant sur les résultats de nos précédents travaux, nous avons mis en place un protocole clinique afin d'étudier le rôle de la sérotonine dans la réponse ventriculaire au rétrécissement aortique chez l'homme. Ce travail de recherche clinique, consiste à doser les concentrations en sérotonine sanguine et plasmatique, ainsi que celle de son métabolite et à quantifier l'activation plaquettaire dans trois groupes de patients porteurs de rétrécissement aortique avec différents niveaux de réponse ventriculaire, et un groupe contrôle. Ce projet de recherche clinique a eu l'accord du Comité de Protection des Personnes et a été financé par la région Midi-Pyrénées.



**Travaux de recherche
fondamentale : *Première étude***

**GENETIC DELETION OF MAO-A PROMOTES SEROTONIN-
DEPENDENT VENTRICULAR HYPERTROPHY BY PRESSURE
OVERLOAD**

Olivier Lairez, Denis Calise, Pascale Bianchi, Catherine Ordener, Odile Spreux-Varoquaux, Céline Guilbeau-Frugier, Ghislaine Escourrou, Isabelle Seif, Jérôme Roncalli, Nathalie Pizzinat, Michel Galinier, Angelo Parini, et Jeanne Mialet-Perez

Journal of Molecular and Cellular Cardiology, avril 2009 [162]

Avant-propos

L'objectif de ce travail a été de préciser l'influence de la MAO-A sur le cœur *in vivo* en conditions basales et en conditions de charge. Cette étude a été réalisée à partir de souris génétiquement déficientes en MAO-A (TG8) que possède le laboratoire, jusqu'alors utilisées pour l'étude de l'influence de la MAO-A sur le comportement [163]. Jusqu'à présent, le rôle *in vivo* de la MAO-A dans le remodelage ventriculaire n'avait jamais été exploré. La place centrale de la MAO-A, tant dans la régulation des taux de sérotonine que dans la signalisation redox induite par son métabolite, le peroxyde d'hydrogène, laisse pourtant supposer qu'elle puisse jouer un rôle important dans la régulation du système sérotoninergique au cours du remodelage ventriculaire.

Notre travail a donc consisté à réaliser le phénotypage cardiaque fonctionnel et histomorphologique des souris TG8 en conditions basales et sur cœur soumis à une surcharge barométrique par sténose aortique.

Introduction

Serotonin (5-HT) is a neurohormone participating in a wide range of physiological functions. The role and mechanisms of action of 5-HT have been extensively investigated in the central nervous system. However, its role in cardiovascular regulation is still not well understood. In periphery, 5-HT is synthesized by enterochromaffin cells of the intestine. It is secreted into the blood and taken up by platelets, which constitute the richest reservoir of 5-HT in the periphery. Following platelets activation, 5-HT is released into the blood to activate specific serotonin receptors expressed in target tissues.

The potential role of 5-HT in cardiac function, as well as its involvement in cardiovascular disorders has generated considerable interest in recent years. In particular, the need for balanced levels of 5-HT to maintain normal cardiovascular activities has been highlighted in different experimental models and clinical studies. In humans, an important raise in blood 5-HT occurs in carcinoid syndromes, which is responsible for valvular heart disease and cardiac failure [164]. Moreover, increase in

plasma 5-HT following infusion in the rat, or by genetic deletion of 5-HT transporter in mice, is responsible for valvular fibrosis and ventricular dysfunction [103, 148]. Altogether, these studies indicate that deregulation in peripheral 5-HT levels provokes adverse effects on the heart. However, no direct evidence has been made concerning the consequences of increased 5-HT levels on the onset and progression of cardiac hypertrophy in response to excessive hemodynamic load.

The mechanism of action of 5-HT in the heart is complex and may involve different subtypes of receptors. In particular, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors present in the myocardium have been described as potential targets for 5-HT induced hypertrophy, along with 5-HT₄ receptors, which are re-expressed in some experimental models of heart failure [139, 144, 147, 165].

One of the key points controlling 5-HT concentrations in individuals is the serotonin-degrading enzyme monoamine oxidase A (MAO-A). MAOs are mitochondrial enzymes subdivided into two major forms, A and B, based on substrate specificity, genetic criteria and inhibition by synthetic compounds [166]. MAO-A preferentially degrades 5-HT whereas MAO-B has a higher affinity for phenylethylamine (PEA). Neurochemical phenotype of MAO-A deficient patients demonstrated significant increase in circulating levels of 5-HT with no modifications in plasma levels of noradrenaline and adrenaline [167]. This is not surprising since catecholamines can be oxidized both by MAO-A and MAO-B, as well as additional pathways such as catechol-o-methyltransferase (COMT) [167]. MAO-A activity is present in cardiac tissues from rats, mice and humans [149, 168, 169]. Interestingly, cardiac MAO-A expression increases with ageing, a situation frequently associated with cardiac failure. In addition, gene expression profiling by micro-array revealed that MAO-A was upregulated in multiple forms of hypertrophy induced by high salt-diet, myocardial infarction and aortic banding [149, 150, 170].

To our knowledge, it is unknown whether MAO-A plays a protective role against deleterious effects of 5-HT in the heart. Thus, the current study was undertaken to ascertain the potential effects of MAO-A inactivation on peripheral 5-HT, and to explore its phenotypic consequences in the model of pressure overload induced by aortic banding.

Materials and methods

Materials

Ketanserin, Inactin, Isoflurane, Clorgyline, Deprenyl and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (L'isle d'Abeau Chesnes, France), unless indicated. M100907 [R-(+)-a-(2,3-dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl-4-piperidinemethanol] was a generous gift from Sanofi-Aventis (Paris, France). Radiochemicals ([¹⁴C]serotonin and b[¹⁴C]phenylethylamine) were from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France).

Experimental Animals

Mice were housed in a pathogen-free facility and handled in accordance with the procedures outlined in Council Directive 86/609/EEC. The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institute of Health (NIH publication N°. 85-23, revised 1996). We used males of the Tg8 strain of MAO-A knock-out (KO) mice and their WT C3H/HeOuj controls. An insertional deletion in the MAO-A locus occurred following DNA injection into a 1-cell embryo of the C3H/HeOuj inbred strain [163]. Tg8 MAO-A KO breeders were obtained from the CDTA-CNRS animal facilities (Orléans, France) and C3H/HeOuj breeders were purchased from Charles River labs, L'Arbresle, France.

Ascendant aortic banding.

10-week-old male mice were anesthetized with isoflurane (4%), ventilated, and the left thorax was opened at the second intercostal space. Aortic constriction was performed by ligating the ascending aorta using a 7-0 Prolene suture under a dissecting microscope. For this purpose, two knots of a 1.5 mm distance (26-gauge needle circumference) were made on the thread which was carefully introduced around the ascendant aorta. Both knots were tight together to perform aortic constriction. Age-matched animals underwent identical surgical procedure except for ligation of the aorta (sham-operated mice). Mice were treated for 4 weeks with the 5-HT_{2A} receptor antagonist ketanserin (1 mg/kg/day in 10% DMSO), M100907 (0.1 mg/kg/day, dissolved in a minimum volume of 0.01 N hydrochloric acid, further diluted to its final concentration using 0.9% saline, and adjusted to pH 7.5) or vehicle (10% DMSO), administered with 0.2-ml Alzet mini-osmotic pumps (Charles River labs, L'Arbresle, France) placed intraperitoneally.

Echocardiography

Animals were anesthetized with 2% isoflurane and examined with non invasive echocardiography (echocardiograph Vivid 7 ultrasound, GE) four weeks after surgery. Cardiac ventricular dimensions were measured on M-mode images at least 5 times for the number of animals indicated.

Histomorphology

Ventricles were incubated in Carnoy's fixative solution (Ethanol 60%, chloroform 30%, acetic acid 10%), embedded in paraffin and transversally sectioned. Interstitial fibrosis was evaluated by picric acid Sirius red staining for total collagens [171]. The positively stained (red) fibrotic area was measured and expressed as percent of total area using the Explora Nova Software (La Rochelle, France) as described [172]. Cardiomyocytes cross-sectional area was evaluated using image analysis software (SigmaScan Pro, SSI) after coloration with eosin-hematoxylin (\approx 150 cells counted per heart).

Mean arterial Pressure

Mice were anesthetized with Inactin. Arterial pressure was measured during 15 min with a Gould pressure transducer joined to a polyethylene catheter (PE 50) inserted into left femoral artery.

Real-time quantitative PCR

Extraction of RNA from cardiac ventricles was performed using column affinity purification (Qiagen, Courtaboeuf, France). First-strand cDNA was synthesized using the superscript II RT-PCR system (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) with random hexamers. Negative controls without reverse transcriptase were made to verify the absence of genomic DNA contamination. Real-time PCR was performed in an ABI prism 7000 system (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) in 96-well plates. A 1/10 dilution of cDNA (5 ml) from RT reaction was mixed with specific primers (Tableau 3) and SYBR green mix (Eurogentec, Angers, France). Among 16 housekeeping genes, HPRT gene was chosen for normalization by the 2DCT method based on its stability in the model of aortic banding (GeNorm tool).

| Name | Identification | PRIMERS |
|--------------------|----------------|---|
| ANF | Nppa | 5'-AGAGTGGGCAGAGACAGCAA-3' 5'-AAGGCCAAGACGAGGAAGAAG-3' |
| α -MHC | Myh6 | 5'-CCACTTCTCCTTGGTCCACTATG-3' 5'-ACAAACCCACCACCGTCTCA-3' |
| β -MHC | Myh7 | 5'-AGGTGGCTCCGAGAAAGGAA-3' 5'-TGAGCCTTGGATTCTCAAACGT-3' |
| α -SK-actin | Acta1 | 5'-TACCACCGGCATCGTGTG-3' 5'-CCAGGTCCAGACGCATGAT-3' |
| Collagen III | Col3a1 | 5'-ACGTAGATGAATTGGGATGCAG-3' 5'-GGGTTGGGCAGTCTAGTG-3' |
| 5-HT _{2A} | Htr2a | 5'-CTGGACCGCTACGTGGCTAT-3' 5'-TATGGTCCACACCGCAATGA-3' |
| 5-HT _{2B} | Htr2b | 5'-CTCCCACTGGCCCTGTGT-3' 5'-ATAGCGGTCCAGGAAATGG-3' |
| 5-HT ₄ | Htr4 | 5'-GGCCATCTTGGGCAACCT-3' 5'-AAGGCGAGAGACACAATGAAATAGT-3' |
| HPRT | Hprt1 | 5'-TCAGTCAACGGGGACATAAA-3' 5'-GGGGCTGTACTGCTTAACCAG-3' |

Tableau 3 : Primer séquences

Assays of 5-HT

Assays for 5-HT were performed with specific and sensitive high pressure liquid chromatography (HPLC) methods with coulometric detection.

Ventricular tissues were dissected, rinsed in saline (NaCl 0.9 %), transversally cut, wiped on absorbing paper to remove excessive blood and snap frozen in liquid nitrogen. For analysis, tissues were homogeneously grinded in HClO₄ (0.1 M) with ascorbic acid (0.3 mM) and centrifuged at 12000 g for 5 min. Supernatant (50 ml) was injected into the chromatographic system, as previously described [173]. The minimum quantifiable level was 0.025 ng/mg tissue for 5-HT.

Whole-blood samples were obtained on orbital sinus from anesthetized mice (Isoflurane 4%). Samples were mixed with serum albumine 4% and N-methyl-5-HT as an internal standard. Then, 0.5 ml of 0.6 M sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer and 8 ml of an organic phase containing dichloro-methane and N-butanol (75:25 v/v) were added. The mixture was homogenized and the organic layer was transferred into a tube containing KH₂PO₄ 0.1 M (pH 2.3). After centrifugation, 50 ml of the aqueous solution was injected into the chromatographic system, as described [174].

Assays of MAO activity

Mice ventricular tissues were homogenized in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) supplemented with protease inhibitors. Crude extracts of proteins (80 mg) were incubated at 37°C for 20 min, in the presence of 400 mM of [¹⁴C]serotonin or 100 mM of b[¹⁴C]phenylethylamine to measure MAO-A and MAO-B activities, respectively [149]. To define non specific activities, MAO-A inhibitor clorgyline and MAO-B inhibitor deprenyl were used (0.1 mM). The reaction was ended by the addition of 0.1 mL of HCl, 4N at 4°C. The reaction product was extracted (efficiency 92%) with 1 mL of ethyl acetate/toluene (v/v), and the radioactivity contained in the organic phase was counted in a liquid scintillation spectrometer.

Western blot

Ventricular homogenates in RIPA Buffer (25 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) were electrophoresed through 10% Tris/glycine gels and transferred to PVDF. Membranes were blocked in 5% nonfat dried milk in 0.1% Tween 20 in TBS (0.05 M Tris Base, 0.9% NaCl, pH 8.4) for 1 hour at room temperature. 5-HT_{2A} receptor expression was monitored with monoclonal antibody, clone G186-1117 (BD Biosciences, France). Tubulin expression was analyzed with monoclonal anti- β -tubulin antibody (Millipore, Molsheim, France). The proteins were visualized using a horseradish peroxidase-linked secondary antibody and ECL detection (Covalab, Lyon, France). Protein concentrations were determined by the copper bicinchoninic acid method (Perbio Science, Brebières, France).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical comparison of the data was performed using the t-test for comparison between two groups or one-way analysis of variance and the post hoc Tukey test for comparison of more than two groups. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Characterization of cardiac MAO activities, cardiac 5-HT receptors and whole-blood 5-HT in MAO-A KO mice

MAO activities were determined in cardiac tissues using ¹⁴C-5-HT and ¹⁴C-bPEA as selective substrates for MAO-A and MAO-B, respectively. Consistent with

previous studies [168, 175], we found that both isoforms are present in the murine heart with a greater expression for MAO-B than MAO-A (Figure 23A, B). As expected, MAO-A activity was undetectable in the hearts from MAO-A KO animals. Moreover, as previously demonstrated in the brain, no compensatory up-regulation of MAO-B activity was observed in the heart [176]. To evaluate the consequence of MAO-A invalidation on the accumulation of its selective substrate, we measured whole-blood 5-HT concentrations using HPLC (Figure 23C). MAO-A KO mice displayed a significant increase in whole-blood 5-HT compared to WT mice. Modifications in serotonin receptor mRNAs were evaluated by real-time PCR in ventricular tissues. 5-HT_{2A} mRNA expression was increased in KO mice whereas 5-HT_{2B} mRNA levels remained unchanged (Figure 23D, E). 5-HT₄ receptor mRNA was not detectable in ventricle tissues from WT and MAO-A KO mice (data not shown). In order to confirm the modifications in 5-HT_{2A} expression at the protein level, we performed immunoblot experiments on ventricular samples (Figure 23F, G). Densitometric analysis demonstrated significant increase in 5-HT_{2A} receptors in ventricles from MAO-A KO mice. In conclusion, mice with deletion of MAO-A display increased levels of peripheral 5-HT and overexpression of 5-HT_{2A} receptors in the heart.

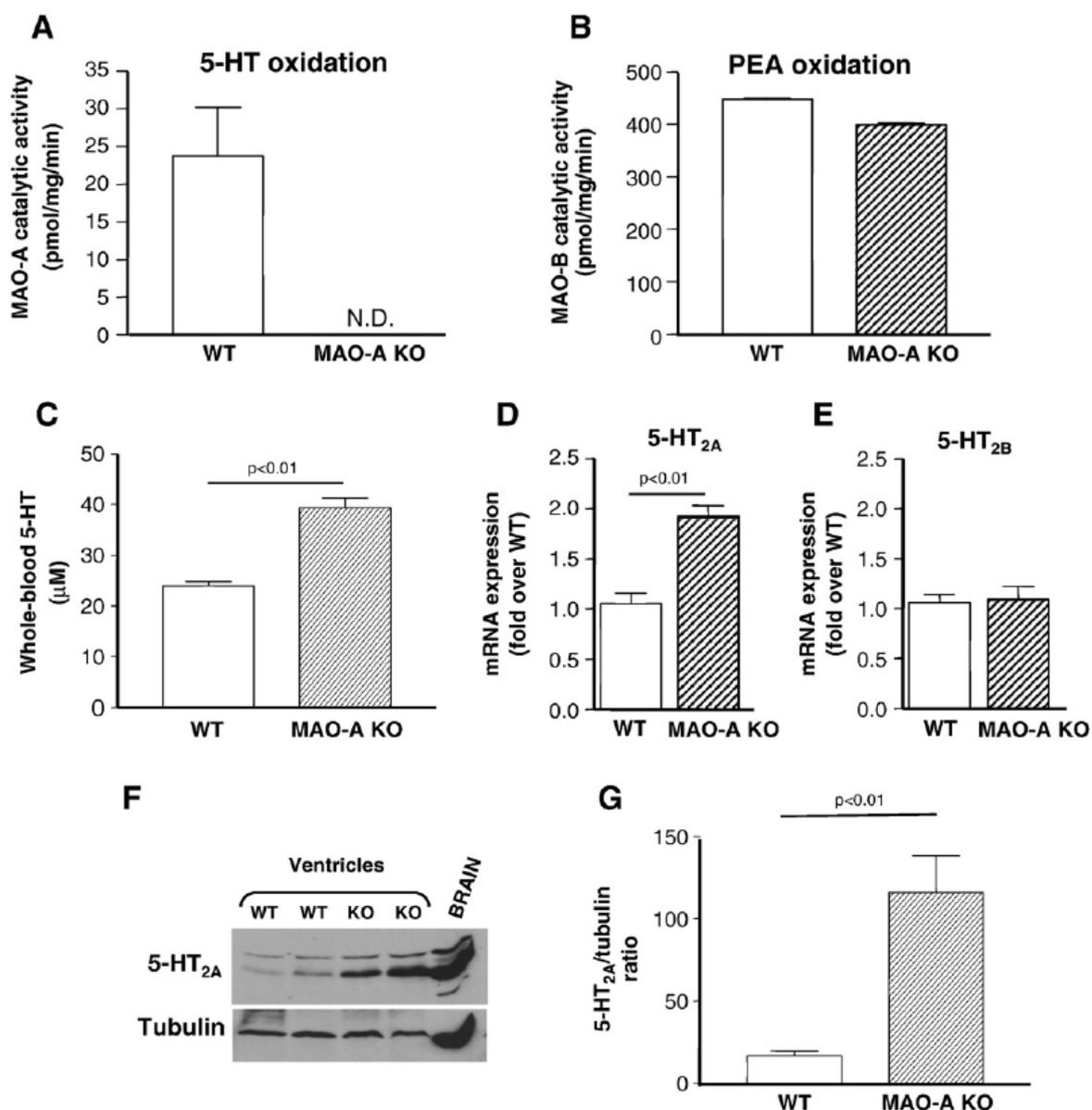


Figure 23 : Characteristics of MAO-A KO mice

(A, B) MAO-A activity was determined using 400 mM ^{14}C -5-HT as a specific substrate and MAO-B activity using 100 mM ^{14}C -bPEA. Results are expressed as difference between total and non-specific activities, the latter being defined in the presence of selective inhibitors clorgyline (10^{-7} M) and deprenyl (10^{-7} M) for MAO-A and MAO-B, respectively.

(C) Determination of whole-blood 5-HT in WT and MAO-A KO mice by HPLC (N=5-7).

(D, E) mRNA expression of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors in the ventricles from WT and KO mice by real-time PCR. Results are expressed as fold over WT (N=5).

(F) Western-blot on ventricular samples from WT and KO mice with anti-5-HT_{2A} (upper panel) or anti-b-tubulin (lower panel) antibodies. Brain homogenate serves as a positive control. Densitometric analysis is shown in

(G) (N=4). *p*, t-test between WT and KO mice. N.D.: Not Detectable.

Increased hypertrophic response to aortic banding in MAO-A KO mice

To assess the consequences of peripheral increase in 5-HT on pressure-overload hypertrophy, we used a model of ascendant aortic banding in mice.

Cardiac function and morphology were analyzed by non-invasive echocardiography (Tableau 4). At baseline, we observed left ventricular dilatation in MAO-A KO mice without modifications in fractional shortening (FS) compared to age-matched WT. In addition, heart rate was lower in MAO-A KO mice. To assess the possible modifications in arterial pressure due to MAO invalidation, we realized invasive catheter measures of arterial pressure. No change was evident in KO mice compared to WT mice (Tableau 4).

Following 4 weeks of aortic banding, a significant increase in interventricular septum thickness (IVST) and posterior wall thickness (PWT) was observed in both WT and KO animals, which is a consequence of pressure-overload hypertrophy (Tableau 4). Interestingly, increases in IVST and PWT were more pronounced in KO animals compared to WT animals (IVST, 1.03 ± 0.02 vs 0.91 ± 0.02 mm, $p=0.0002$; PWT, 1.01 ± 0.03 vs 0.93 ± 0.02 mm, $p=0.02$, in banded KO vs banded WT, respectively). No statistical differences in terms of fractional shortening (FS) were observed (Tableau 4).

| | WT | | MAO-A KO | |
|--------------------------------|------------------|-------------------|---------------------|------------------------|
| | Sham | Banded | Sham | Banded |
| No. of animals | 7 | 9 | 7 | 7 |
| IVST (mm) | 0.71 ± 0.02 | $0.91 \pm 0.02^*$ | 0.69 ± 0.01 | $1.03 \pm 0.02^{*,\S}$ |
| DPWT (mm) | 0.75 ± 0.02 | $0.93 \pm 0.02^*$ | 0.71 ± 0.03 | $1.01 \pm 0.03^{*,\S}$ |
| LVEDD (mm) | 3.84 ± 0.08 | 3.80 ± 0.07 | $4.12 \pm 0.08^\#$ | 4.00 ± 0.13 |
| LVESD (mm) | 2.84 ± 0.07 | 2.72 ± 0.06 | $3.13 \pm 0.08^\#$ | 2.88 ± 0.11 |
| FS (%) | 26.1 ± 1.2 | $28.7 \pm 0.7^*$ | 23.1 ± 1.4 | $28.3 \pm 1.5^*$ |
| Rate bpm | 428.2 ± 12.9 | 408.5 ± 20.2 | $368.0 \pm 18.5^\#$ | 353.9 ± 13.0 |
| Mean arterial pressure (mm Hg) | 82.5 ± 3.6 | ND | 83.5 ± 3.2 | ND |

Tableau 4 : Echocardiographic and Mean Arterial Pressure measurements in WT and KO mice after aortic banding

IVST: Interventricular septum thickness; PWT: posterior wall thickness; LVEDD and LVESD: left-ventricular end-diastolic and end-systolic dimensions, respectively; FS: fractional shortening.

*: $p < 0.05$ banded versus sham-operated mice; #: $p < 0.05$ sham KO versus sham WT mice; §: $p < 0.05$ banded KO versus banded WT mice; ND: Non Determined.

Morphometric analysis in post-mortem animals demonstrated that heart/body weight (HW/BW) ratios were significantly higher in KO-banded animals than WT-banded animals (5.7 ± 0.2 vs 4.8 ± 0.2 mg/g, respectively, $p=0.004$) (Tableau 5). Similarly, ventricle/body weight (VW/BW) ratios were also higher in KO-banded animals than WT-banded animals (4.5 ± 0.1 vs 3.9 ± 0.2 mg/g, respectively, $p=0.006$). We did not observe significant changes in body weight when comparing WT (35.2 ± 0.7 g) and KO (33.1 ± 1.5 g) mice. Next, we performed specific measurements of cardiomyocyte cross-sectional areas on transverse sections of the hearts (Figure 24A, B). Again, we found a greater increase in cardiomyocytes size in KO-banded animals compared to WT-banded animals (455 ± 34 vs 369 ± 13 μm^2).

| | Wild-type | | KO MAO-A | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|----------------|--------------------|
| | Sham | Banded | Sham | Banded |
| No. of animals | 8 | 8 | 6 | 8 |
| Body weight, g | 36.1 ± 1.3 | 35.2 ± 0.7 | 33.2 ± 1.5 | 33.1 ± 1.5 |
| Heart weight, mg | 144 ± 7 | $170 \pm 5^*$ | 143 ± 2 | $187 \pm 8^*$ |
| Ventricles weight, mg | 115 ± 4 | $138 \pm 4^*$ | 120 ± 3 | $149 \pm 7^*$ |
| Lung weight, mg | 174 ± 18 | 179 ± 12 | 146 ± 10 | $185 \pm 11^*$ |
| Heart wt/body wt, mg/g | 4.0 ± 0.1 | $4.8 \pm 0.1^*$ | 4.3 ± 0.2 | $5.7 \pm 0.2^{*§}$ |
| Ventricles wt/body wt, mg/g | 3.2 ± 0.1 | $3.9 \pm 0.2^*$ | 3.7 ± 0.1 | $4.5 \pm 0.1^{*§}$ |
| Lung wt/body wt, mg/g | 4.8 ± 0.4 | 5.1 ± 0.3 | 4.5 ± 0.5 | 5.7 ± 0.5 |

Tableau 5 : Morphometric analysis in WT and KO mice

*: $p < 0.05$ banded versus sham-operated mice; §: $p < 0.05$ banded KO versus banded WT mice.

Modification of genes involved in cardiac remodeling was evaluated by real-time RT-PCR (Figure 24C). At baseline, MAO-A KO mice underwent some cardiac remodeling with increased expression of ANF, bMHC, and a tendency for decreased expression of aMHC. In banded animals, deletion of MAO-A resulted in greater expression of ANF, aSK-actin and b-MHC compared to WT banded animals. Expression of a-MHC was not statistically different. This feature is typical of a foetal gene program activated during cardiac remodeling in rodents. Taken together, these data show that MAO-A deletion produces exacerbation of pressure-overload-induced cardiac hypertrophy in mice.

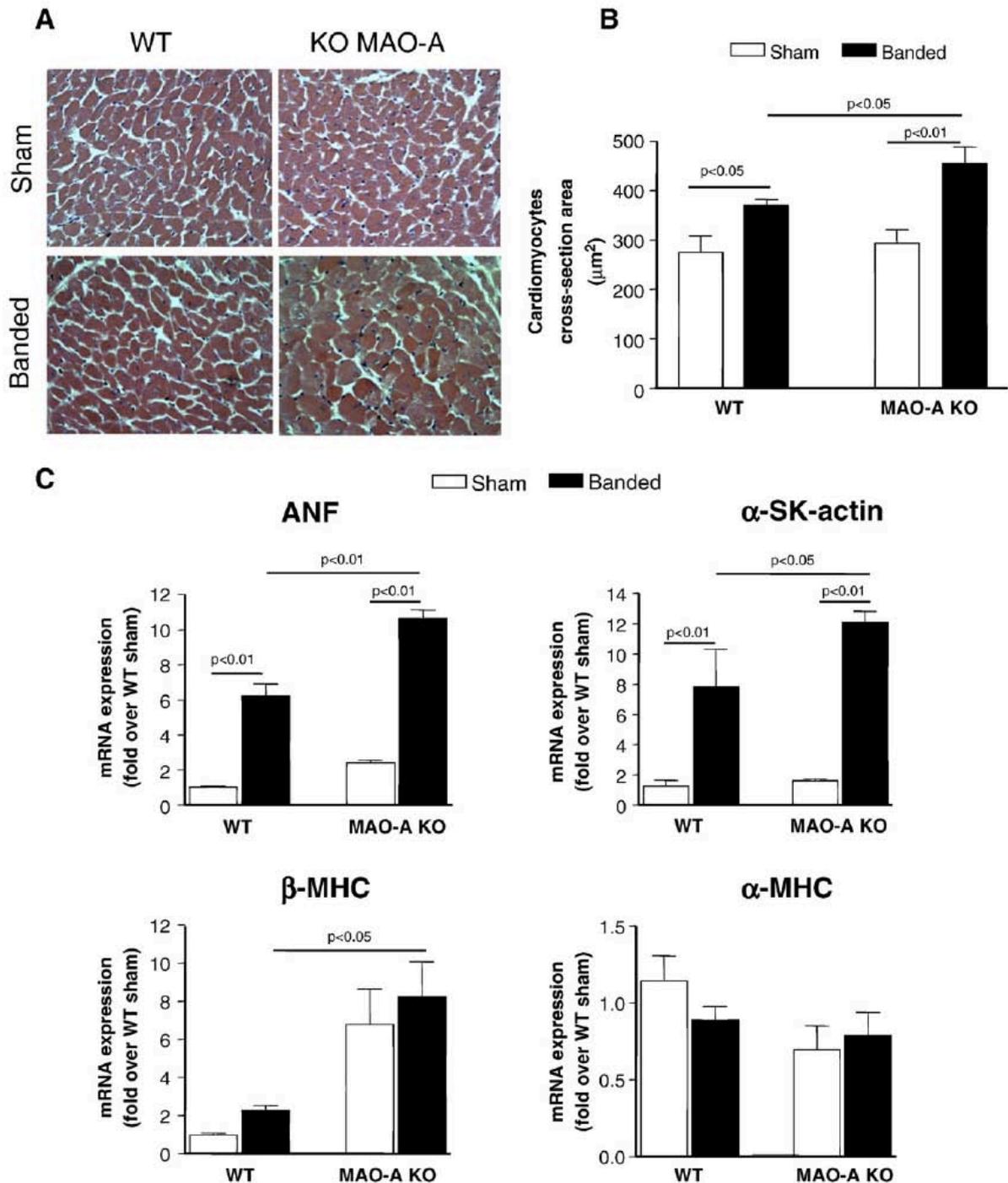


Figure 24 : Measurements of cardiac hypertrophy induced by aortic banding in WT and MAO-A KO mice

(A, B) Cardiomyocytes cross-section areas determined on hematoxylin-eosin stained sections (N=5) using SigmaScan Pro (~150 cells/heart) with representative image on the left panel (x400 magnitude).

(C) Real-time PCR in ventricles from KO and WT mice (N=5). Expression of the gene of interest is normalized to HPRT by the method of 2DCT, and results are expressed as fold over WT mice. *p*, one-way analysis with post hoc Tukey test.

Increased fibrosis in response to aortic banding in MAO-A KO mice.

To analyze the impact of 5-HT accumulation on ventricular fibrosis, whole heart collagen was stained with Sirius red and expressed in percent of myocardial area (Figure 25A, B). At baseline, whole heart collagen staining with Sirius red was significantly elevated in KO ($3.9 \pm 0.8\%$ of myocardial area) compared to WT animals ($1.4 \pm 0.3\%$) ($p < 0.05$) (Figure 25B) whereas collagen III mRNA remained unchanged (Figure 25C). After aortic banding, MAO-A KO mice displayed enhanced fibrosis compared to WT mice as demonstrated by Sirius red staining (Figure 26A, B) and collagen III expression by real-time PCR (Figure 26C).

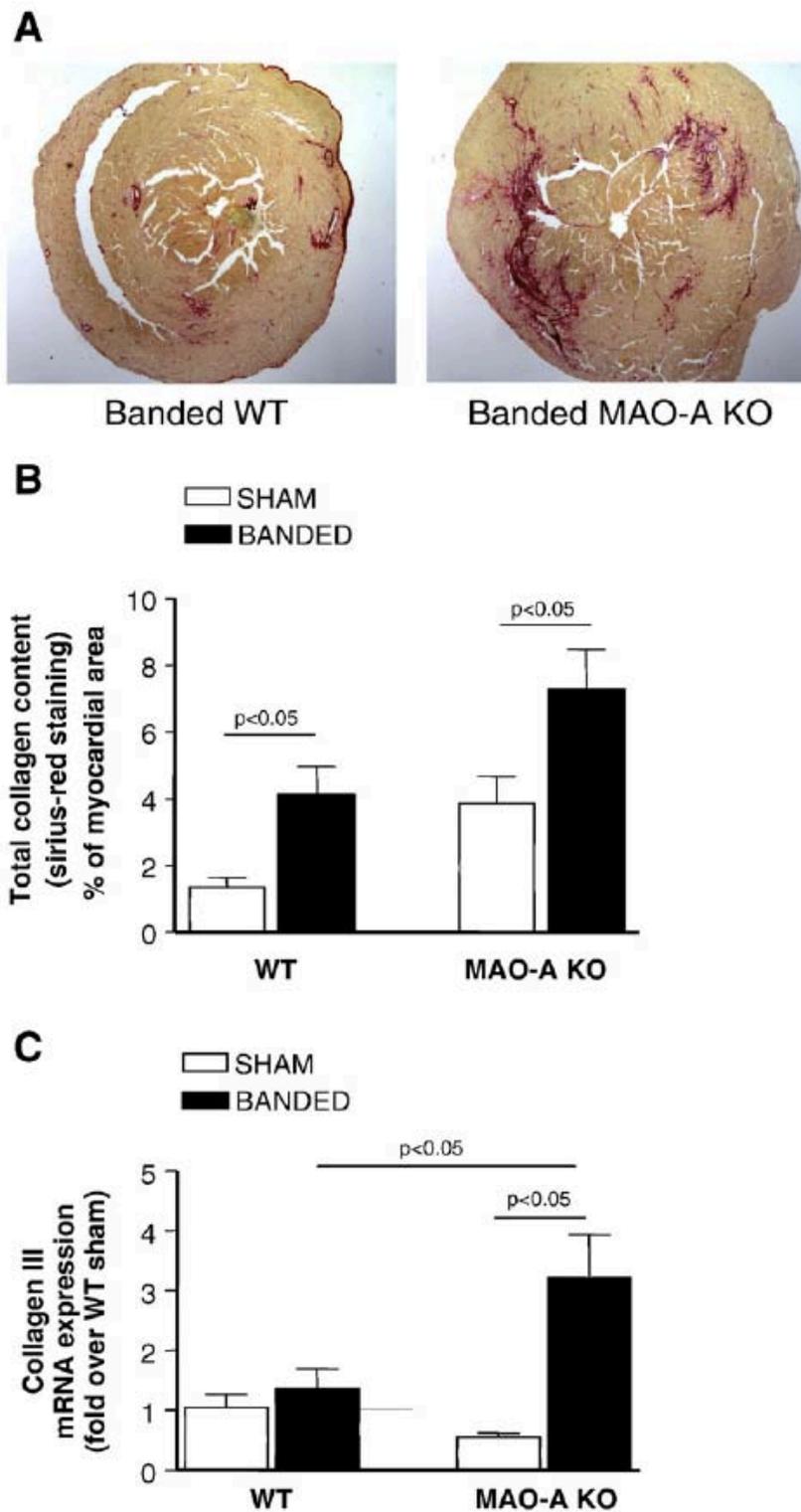


Figure 25 : Myocardial fibrosis in WT and MAO-A KO mice

(A, B) Collagen contents on paraffin sections from WT and MAO-A KO mice stained with Sirius-red. Images were obtained with 200X magnification scale. Collagen content was analyzed with Explora Nova Mosaic Software and expressed as percent of myocardial area. Mean data \pm s.e.m. from 5 hearts is shown in (B). Representative image is shown in (A).

(C) Collagen III mRNA expression by real-time PCR expressed as fold over WT sham mice (N=5). *p*, one-way analysis with post hoc Tukey test.

Based on previous experimental models that demonstrated valvular fibrosis associated with 5-HT administration in the rat [103], we performed histological examination of the valves in KO mice. Analysis of aortic valves with Masson's trichrome did not reveal any changes in the morphology or collagen content (data not shown).

Effect of pressure overload on cardiac serotonin levels and serotonin receptors expression

We evaluated changes in 5-HT concentrations in banded WT and KO hearts by HPLC. Six weeks after aortic banding, cardiac 5-HT concentrations were unchanged in WT mice whilst they were significantly increased in MAO-A KO mice (0.49 ± 0.01 vs 0.39 ± 0.03 ng/mg tissue in banded and sham KO hearts, respectively, $p = 0.01$) (Figure 26A). Interestingly, at baseline, we observed a 1.9 fold increase in cardiac 5-HT in MAO-A KO mice, which is very close to the difference observed in whole-blood 5-HT (Figure 23C). Serotonin receptor mRNAs were measured in aortic-banded and sham-operated mice. As depicted in figure 4B, 5-HT_{2A} mRNA expression remained elevated in MAO-A KO mice after aortic banding, and was higher than that of WT mice. No significant differences in any of the four groups were observed for 5-HT_{2B} mRNA expression (Figure 26B).

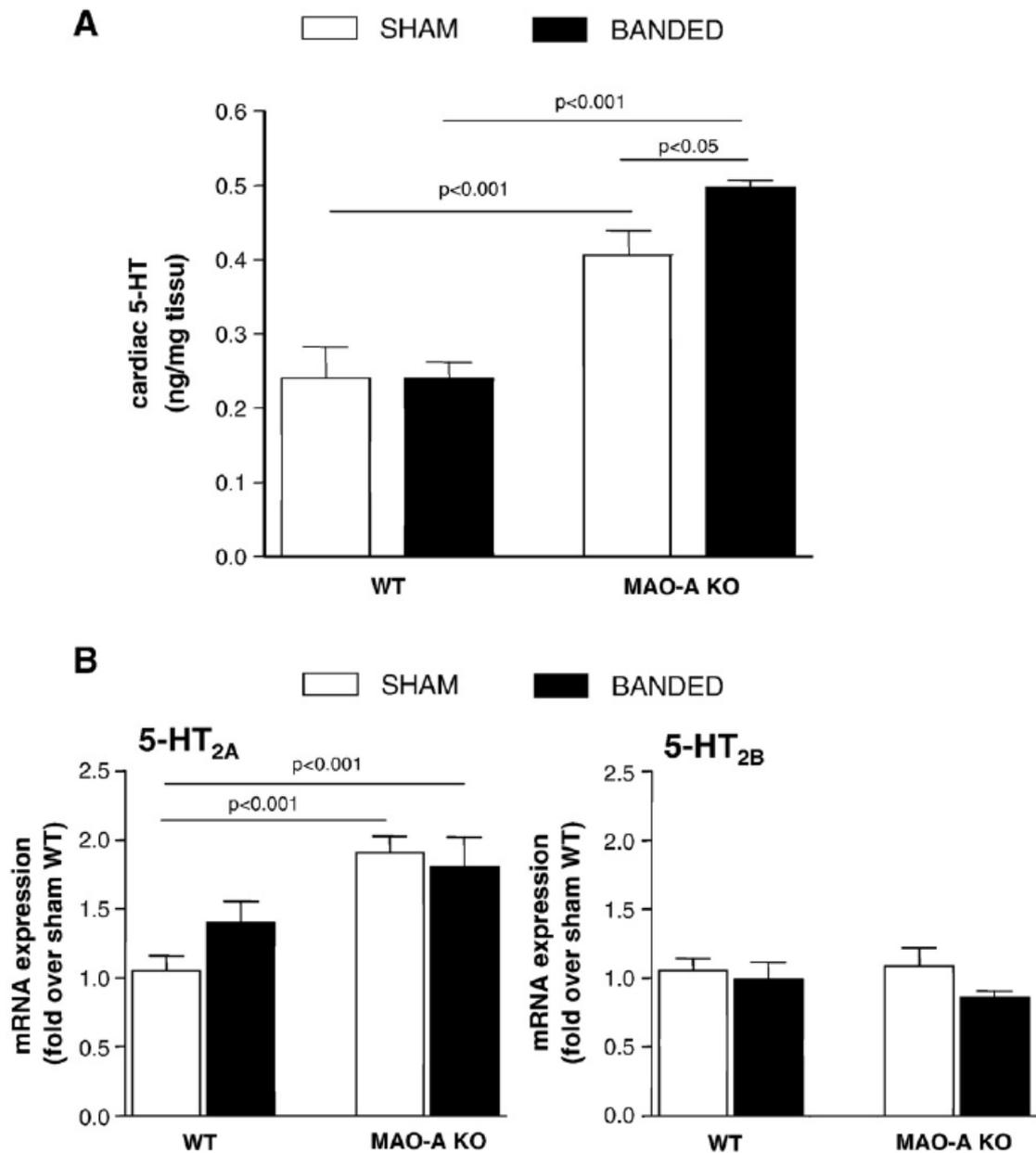


Figure 26 : Cardiac 5-HT levels and 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} mRNA expression after aortic banding in WT and KO mice

(A) Cardiac 5-HT concentrations measured by HPLC in ventricles from WT and MAO-A KO mice, after aortic banding or sham-operation.

(B) 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} mRNA expression by real-time PCR expressed as fold over WT sham mice (N=5).

p, one-way analysis with post hoc Tukey test.

Role of serotonin receptor antagonists in pressure overload-hypertrophy

RT-PCR experiments indicated that 5-HT_{2A} but not 5-HT_{2B} receptors were upregulated in cardiac tissues from MAO-A KO mice at baseline and after aortic banding (Figure 26B). In order to better understand the role of these receptors and to demonstrate the importance of 5-HT in cardiac hypertrophy, we administrated the 5-

HT_{2A} receptor antagonists ketanserin or M100907 by osmotic pumps during 4 weeks in sham and aortic banded animals. The reference compound ketanserin displays about ~100-fold selectivity toward 5-HT_{2A} receptor compared to 5-HT_{2B} subtype, but presents weak α 1-adrenergic receptor antagonist properties [177]. On the other hand, M100907 is described as one of the most selective 5-HT_{2A} receptor antagonist both *in vitro* and *in vivo* [177-179]. In sham-operated mice, antagonist administration did not modify cardiac parameters measured by morphological and echocardiographic approaches (Tableau 6).

| | | WT | | MAO-A KO | |
|--------------|------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|
| | | Sham | Aortic banding | Sham | Aortic banding |
| IVST (mm) | Vehicle | 0.63±0.01 | 0.91±0.02 | 0.62±0.01 | 1.01±0.01 |
| | Ketanserin | 0.63±0.02 | 0.81±0.02 [#] | 0.64±0.02 | 0.83±0.02 [#] |
| | M100907 | 0.69±0.01 | 0.73±0.01 [§] | 0.66±0.02 | 0.77±0.02 [§] |
| PWT (mm) | Vehicle | 0.73±0.03 | 0.93±0.02 | 0.63±0.01 | 1.04±0.05 |
| | Ketanserin | 0.64±0.02 | 0.82±0.02 | 0.67±0.01 | 0.85±0.02 [#] |
| | M100907 | 0.74±0.01 | 0.79±0.01 [§] | 0.63±0.01 | 0.78±0.02 [§] |
| HW/BW (mg/g) | Vehicle | 4.52±0.31 | 5.63±0.34 | 4.66±0.18 | 6.63±0.33 |
| | Ketanserin | 4.39±0.13 | 5.69±0.16 | 4.85±0.44 | 5.60±0.34 [#] |
| | M100907 | 4.01±0.20 | 5.53±0.31 | 4.76±0.03 | 5.53±0.15 [§] |

Tableau 6 : Morphometric measurements in WT and KO mice after administration of Vehicle or 5-HT_{2A} antagonists ketanserin or M100907 by osmotic pumps

IVST: Interventricular Septum Thickness; PWT: Posterior Wall Thickness; HW/BW: Heart Weight to Body Weight Ratio.

#: p<0.05 Ketanserin vs vehicle; § : p<0.05 M100907 vs vehicle

In contrast, after aortic banding, both ketanserin and M100907 significantly decreased IVST and PWT as measured by echocardiography (Figure 27A, B). Interestingly, the effects of 5-HT_{2A} antagonists were more pronounced in KO mice, in which IVST, PWT and HW/BW ratios decreased to the values found in WT mice after aortic banding (Figure 27, Tableau 6). These data show that the exacerbation of ventricular hypertrophy in the absence of MAO-A is related to accumulation of 5-HT and stimulation of 5-HT_{2A} receptors.

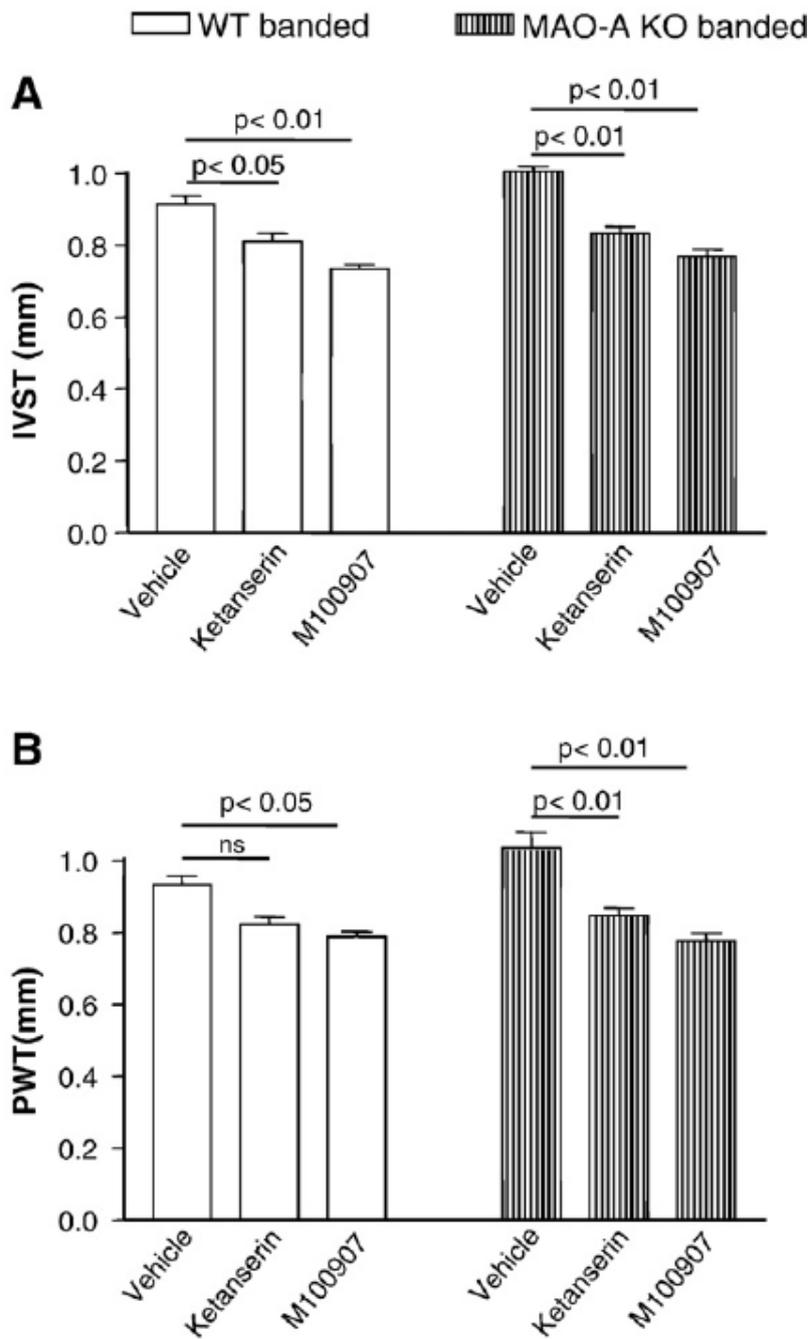


Figure 27 : Effect of Ketanserin and M100907 on cardiac hypertrophy induced by aortic banding

Echocardiographs measurements 4-weeks after surgery in banded-WT and banded-KO mice treated with vehicle (DMSO 10% in NaCl 0.9 %), Ketanserin (1 mg/kg/day) or M100907 (0.1 mg/kg/day) (N=7).

IVST: Intraventricular septum thickness; PWT: Posterior wall thickness, expressed in mm.

p: one-way analysis with post hoc Tukey test.

Discussion

The present study provides evidence for a role of MAO-A in cardiac remodeling during normal and pressure-overload conditions through the regulation of peripheral 5-HT levels.

We found that MAO-A deletion was associated with about 2-fold increase in whole-blood 5-HT. Since 99 % of whole-blood 5-HT is stored in platelets, our data indicate that the absence of peripheral MAO-A in various tissues, especially liver and lung which possess high 5-HT degrading activity, leads to an enhancement of peripheral 5-HT, which is absorbed and stored in platelets. Our data are consistent with increased platelet 5-HT content in patients with MAO-A deficiency [167] and in mice treated with moclobemide, a MAO-A inhibitor [174].

A relationship between circulating levels of 5-HT and cardiac dysfunction has been suggested by previous studies [103, 148, 180]. One of these studies concerns the consequences of inactivation of the plasma membrane 5-HT transporter, 5-HTT. Internalization into the cells is a preliminary step toward 5-HT degradation by the mitochondrial enzyme MAO-A. Interestingly, the phenotype of MAO-A KO mice at baseline displays some features of 5-HTT-deficient mice [148]. 5-HTT deficiency led to the development of ventricular dilatation and dysfunction, together with interstitial and valvular fibrosis. However, unlike 5-HTT-deficient mice, we did not observe valvular fibrosis in MAO-A KO mice. Such disparity may be related to the availability in peripheral 5-HT concentrations. Indeed, it has been shown that valvular fibrosis occurs at high 5-HT concentrations [103, 164, 181, 182]. In MAO-A KO mice, we only found a 1.6-fold increase in whole-blood 5-HT, a difference which may be insufficient to produce valvular damage.

When exposed to pressure overload, MAO-A KO mice displayed enhanced accumulation of 5-HT in the heart and exaggerated ventricular remodeling compared to WT mice, as assessed by echocardiography, gross morphology, size of cardiomyocytes and fibrosis. Regarding the origin of 5-HT in the heart and its regulation during aortic constriction, several sources, including the heart itself and platelets, need to be considered since cardiac 5-HT does not appear to be associated with serotonergic nerve endings [118, 183]. Recent data demonstrated that aortic banding in rats produced an increase in whole-blood 5-HT concentrations [184]. In addition, platelet activation was detected in patients with

hypertrophic cardiomyopathy due to left ventricular outflow tract obstruction [185]. In agreement with this, we found that myocardial 5-HT content was augmented in MAO-A KO mice following ventricular pressure overload. Interestingly, such modifications were not observed in WT animals, indicating that normal expression of MAO-A plays a critical role in the clearance of 5-HT in cardiac tissue.

To investigate the mechanism of action of 5-HT in cardiac hypertrophy during pressure overload, we administrated two different 5-HT_{2A} receptor antagonists in mice. 5-HT_{2A} receptor emerged as a good candidate because it was overexpressed in the myocardium of MAO-A KO mice and in different models of cardiac hypertrophy [147]. Moreover, in human, 5-HT_{2A} receptors have already been demonstrated to be upregulated in heart failure [147] and 5-HT_{2A} receptor antagonist ketanserin reduces left ventricular hypertrophy during hypertension [186]. In our study, we found that, in WT mice, administration of 5-HT_{2A} receptor antagonists only partially reduced the deleterious effects of aortic banding on ventricular morphology. In contrast, those compounds strongly prevented exacerbation of cardiac hypertrophy observed in MAO-A KO mice. These results indicate that, in situations in which 5-HT accumulates into the heart, 5-HT_{2A} receptors become a privileged target mediating ventricular hypertrophy during pressure overload. Our data are consistent with a recent study which identified 5-HT_{2A} receptors as potential regulators of cardiomyocytes hypertrophy [165].

Our results show that inactivation of MAO-A is associated with increased mRNA and protein expression of 5-HT_{2A} receptors. Interestingly, such overexpression is not observed with 5-HT_{2B} receptor. Overexpression of 5-HT_{2A} receptors in MAO-A KO mice is intriguing since G-protein-coupled receptors are generally down-regulated in the presence of excessive substrate. However, 5-HT_{2A} receptors have shown atypical regulation properties in different cell-types, and have already been demonstrated to be up-regulated by 5-HT or by synthetic agonists *in vitro* [187]. Therefore, further studies will be necessary to determine whether 5-HT_{2A} overexpression in the heart depends on the increase in peripheral 5-HT, or on alternative mechanism present in MAO-A KO mice.

Interestingly, MAO-A was recently identified as a relevant source of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the heart, which is generated during 5-HT metabolism [149]. In addition, H₂O₂ was demonstrated to act as a signalling intermediate in cardiomyocyte hypertrophy *in vitro* [46, 149, 152]. However, based on our study, MAO-A/H₂O₂

pathway does not play a major role in this model of cardiac hypertrophy. This signaling pathway may become predominant in situations where large amounts of 5-HT are released, like in platelet activation following ischemia-reperfusion [151]. In addition, MAO-A/H₂O₂ pathway could play an important role in particular situations with enhanced MAO-A expression such as cardiac ageing [149].

In conclusion, our experiments demonstrate a role for MAO-A in the regulation of peripheral 5-HT and ventricular remodeling. These results supply new insights on the function of 5-HT and MAO-A in the heart and underline their importance in cardiac pathology.

Conclusion

Nos travaux démontrent que les effets de la MAO-A dans l'apparition de l'hypertrophie au cours du remodelage ne sont pas médiés par les ERO mais par la régulation de son substrat, la sérotonine, via son récepteur 5-HT_{2A}. Ces résultats ont été récemment confirmés par Kaludercic et coll. qui démontrent que l'inhibition de la MAO-A ne prévient pas l'apparition de hypertrophie concentrique en réponse à la sténose aortique mais prévient l'apparition d'une dysfonction systolique ventriculaire [188]. Nos résultats et les données de Kaludercic et coll. suggèrent que la MAO-A module la réponse hypertrophique induite par la surcharge barométrique en régulant les taux de sérotonine qui agirait sur le myocarde via son récepteur 5-HT_{2A}. Dans les travaux de Kaludercic et coll., le stress oxydant induit par la MAO-A interviendrait dans l'apparition d'une dysfonction systolique ventriculaire, marquant le tournant entre hypertrophie adaptative et hypertrophie maladaptative [188].

Nos travaux démontrent que la voie sérotonine – récepteur 5-HT_{2A} participe au remodelage ventriculaire en permettant l'apparition d'une hypertrophie concentrique et d'une fibrose interstitielle en réponse à la surcharge barométrique. Ces résultats ont été confirmés par des études *in vitro* montrant que le récepteur 5-HT_{2A} est impliqué dans l'hypertrophie des cardiomyocytes [189, 190] et l'activation des fibroblastes cardiaques [191]. Pourtant, le rôle du récepteur 5-HT_{2A} dans l'apparition d'une dysfonction systolique ventriculaire et de l'IC n'est pas connu. En effet, si son rôle dans l'apparition de l'hypertrophie ventriculaire est maintenant bien établi, ses effets fonctionnels sur le myocarde en réponse à la surcharge barométrique ne sont toujours pas précisés.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular and Cellular Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjmcc

Original article

Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload

Olivier Lairez^{a,b}, Denis Calise^{a,b}, Pascale Bianchi^{a,b}, Catherine Ordener^{a,b}, Odile Spreux-Varoquaux^{c,d}, Céline Guilbeau-Frugier^{a,b}, Ghislaine Escourrou^{a,b}, Isabelle Seif^e, Jérôme Roncalli^{a,b}, Nathalie Pizzinat^{a,b}, Michel Galinier^{a,b}, Angelo Parini^{a,b}, Jeanne Mialet-Perez^{a,b,*}^a INSERM; U858; F-31432 Toulouse, France^b Université de Toulouse; UPS; Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil; CHU de Toulouse; IFR31, F-31432 Toulouse, France^c Université Versailles St-Quentin-en-Yvelines, Pharmacologie, Faculté de Médecine Paris-Ile de France-Ouest, 78000, France^d Service de Biologie, Unité de Pharmacologie, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, 78157, France^e Université Paris-Sud; EA3544, Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2008

Accepted 15 December 2008

Available online 7 January 2009

Keywords:

5-HT

MAO-A

Hypertrophy

Fibrosis

Remodeling

5-HT_{2A}

ABSTRACT

The potential role of serotonin (5-HT) in cardiac function has generated much interest in recent years. In particular, the need for a tight regulation of 5-HT to maintain normal cardiovascular activity has been demonstrated in different experimental models. However, it remains unclear how increased levels of 5-HT could contribute to the development of cardiac hypertrophy. Availability of 5-HT depends on the mitochondrial enzyme monoamine oxidase A (MAO-A). Therefore, we investigated the consequences of MAO-A deletion on ventricular remodeling in the model of aortic banding in mice. At baseline, MAO-A deletion was associated with an increase in whole blood 5-HT ($39.4 \pm 1.9 \mu\text{M}$ vs. $24.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$ in KO and WT mice, respectively). Cardiac 5-HT_{2A}, but not 5-HT_{2B} receptors were overexpressed in MAO-A KO mice, as demonstrated by real-time PCR and Western-blot experiments. After aortic banding, MAO-A KO mice demonstrated greater increase in heart wall thickness, heart to body weight ratios, cardiomyocyte cross-section areas, and myocardial fibrosis compared to WT. Exacerbation of hypertrophy in KO mice was associated with increased amounts of 5-HT in the heart. In order to determine the role of 5-HT and 5-HT_{2A} receptors in ventricular remodeling in MAO-A KO mice, we administered the 5-HT_{2A} receptor antagonists ketanserin (1 mg/kg/day) or M100907 (0.1 mg/kg/day) during 4 weeks of aortic banding. Chronic administration of these antagonists strongly prevented exacerbation of ventricular hypertrophy in MAO-A KO mice. These results show for the first time that regulation of peripheral 5-HT by MAO-A plays a role in ventricular remodeling via activation of 5-HT_{2A} receptors.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Serotonin (5-HT) is a neurohormone participating in a wide range of physiological functions. The role and mechanisms of action of 5-HT have been extensively investigated in the central nervous system. However, its role in cardiovascular regulation is still not well understood. In the periphery, 5-HT is mainly synthesized by enterochromaffin cells of the intestine. It is secreted into the blood and taken up by platelets, which constitute the richest reservoir of 5-HT in the periphery. Following platelet activation, 5-HT is released into the blood to activate specific serotonin receptors expressed in target tissues.

The potential role of 5-HT in cardiac function, as well as its involvement in cardiovascular disorders has generated considerable

interest in recent years. In particular, the need for balanced levels of 5-HT to maintain normal cardiovascular activities has been highlighted in different experimental models and clinical studies. In humans, an important raise in blood 5-HT occurs in carcinoid syndromes, which is responsible for valvular heart disease and cardiac failure [1]. Moreover, increase in plasma 5-HT following infusion in the rat, or by genetic deletion of the 5-HT transporter in mice, is responsible for valvular fibrosis and ventricular dysfunction [2,3]. Altogether, these studies indicate that deregulation in peripheral 5-HT levels provokes adverse effects on the heart. However, no direct evidence has been made concerning the consequences of increased 5-HT levels on the onset and progression of cardiac hypertrophy in response to excessive hemodynamic load.

The mechanism of action of 5-HT in the heart is complex and may involve different subtypes of receptors. In particular, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors present in the myocardium have been described as potential targets for 5-HT induced hypertrophy, along with 5-HT₄

* Corresponding author. INSERM U858, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 562 17 29 53; fax: +33 561 32 56 22.

E-mail address: jeanne.perez@inserm.fr (J. Mialet-Perez).



**Travaux de recherche
fondamentale : *Deuxième étude***

Avant-propos

Cette première étude confirme le rôle de la sérotonine et de son récepteur 5-HT_{2A} dans le remodelage ventriculaire tant en conditions de bases qu'en conditions de charge. Pourtant, dans ces conditions expérimentales, même si les souris déficientes en MAO-A développent les stigmates biologiques du remodelage ventriculaire, aucune n'atteint le stade de l'IC avec dysfonction systolique (hypertrophie excentrique).

L'objectif de cette deuxième étude a été d'étudier le rôle de la sérotonine au travers de son récepteur 5-HT_{2A} dans l'hypertrophie ventriculaire et la transition de l'hypertrophie concentrique vers l'hypertrophie excentrique avec dysfonction systolique qui caractérise l'évolution naturelle de l'IC.

Introduction

L'IC est maintenant admise comme une pathologie circulatoire dans laquelle la mise en jeu des systèmes d'adaptation neuro-hormonaux entretient la vasoconstriction périphérique et le remodelage ventriculaire. Aussi, la compréhension des effets des systèmes d'adaptation neuro-hormonaux sur le remodelage ventriculaire est d'un intérêt majeur dans le développement de nouvelles thérapies visant à stopper la progression de l'IC.

La physiopathologie de l'IC fait du remodelage ventriculaire l'aboutissement d'une surcharge cardiaque, quelle soit barométrique (post-charge) ou volumétrique (pré-charge). Il est maintenant admis qu'il existe deux voies d'hypertrophie cardiaque : l'une physiologique, en réponse à l'exercice ou la grossesse, l'autre pathologique, en réponse à la surcharge cardiaque, toutes deux répondant à des voies de signalisation indépendantes [32, 192]. Aussi, dans l'hypertrophie physiologique, le maintien du ratio paroi/rayon du ventricule explique l'absence de dysfonction myocardique par la normalisation de la contrainte pariétale, suivant la loi de Laplace. Au niveau histologique, l'hypertrophie physiologique se caractérise par une hypertrophie harmonieuse des cardiomyocytes mais ne développe pas les autres modifications qui accompagnent le remodelage ventriculaire comme

l'augmentation de la fibrose interstitielle [24]. Au contraire, dans l'IC, l'augmentation pathologique de la charge, en dilatant les ventricules, fait chuter le ratio paroi/rayon du ventricule, à l'origine d'une augmentation de la contrainte pariétale et de l'activation du remodelage ventriculaire qui caractérise l'hypertrophie pathologique. L'hypertrophie cardiaque a alors pour objectif de normaliser la contrainte pariétale en augmentant l'épaisseur de la paroi. Au niveau histologique, l'hypertrophie pathologique se caractérise par un allongement des cardiomyocytes et des modifications de la MEC à l'origine de la fibrose interstitielle [24].

Dans des conditions de surcharge barométrique, comme l'HTA ou le rétrécissement aortique, l'hypertrophie cardiaque va évoluer en deux phases : une phase d'hypertrophie concentrique dite « adaptative » ou « compensatrice » puis une phase d'hypertrophie excentrique dite « maladaptative » qui mène à la dysfonction systolique. Les places respectives de l'hypertrophie adaptative et de l'hypertrophie maladaptative dans la progression de l'IC restent mal définies. Des travaux démontrent que l'inhibition de la voie de signalisation hypertrophique de la calcineurine-NFAT en réponse à la sténose aortique aboutit à une diminution de la fonction systolique du myocarde et à l'apparition d'une insuffisance cardiaque, pour une même contrainte pariétale [193]. Ces travaux suggèrent que cette voie de signalisation hypertrophique en réponse à la surcharge barométrique serait bénéfique en prévenant la transition vers l'IC. D'autres travaux démontrent au contraire que la prévention de l'hypertrophie compensatrice en réponse à la sténose aortique par l'administration d'un antagoniste de l'aldostérone prévient l'apparition d'une hypertrophie excentrique et de la dysfonction systolique qui l'accompagne, et améliore la survie [194]. Ces données suggèrent qu'il puisse exister différentes voies de signalisation indépendantes qui dirigent hypertrophie adaptative et hypertrophie maladaptative, cette dernière conduisant à l'IC. La phase initiale d'hypertrophie compensatrice (hypertrophie concentrique) serait bénéfique en permettant la normalisation de contrainte pariétale, alors que la phase d'hypertrophie maladaptative (hypertrophie excentrique) serait délétère, conduisant à la dysfonction systolique et aux signes cliniques de l'IC. Si les données de la littérature s'accordent sur le rôle de la perte des cardiomyocytes dans cette transition [50, 51, 195], peu de travaux éclairent sur les systèmes qui amorcent cette transition.

Nos précédents travaux ont montré que le système sérotoninergique jouait un rôle dans le remodelage ventriculaire [162]. Dans un modèle de souris déficientes

en MAO-A, l'augmentation du taux sanguin en sérotonine s'accompagnait de l'apparition d'un remodelage ventriculaire associant hypertrophie des cardiomyocytes, fibrose interstitielle et dilatation ventriculaire. Après sténose aortique, les souris déficientes en MAO-A développaient une réponse hypertrophique exacerbée, prévenue par l'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A}. Cette réponse hypertrophique s'accompagnait des modifications histologiques pathologiques qui accompagnent habituellement le remodelage ventriculaire. Pourtant, aucune souris n'atteignait le stade de remodelage excentrique et de dysfonction systolique qui marque l'histoire naturelle de l'IC [162]. Ces résultats forcent à s'interroger sur le rôle du récepteur 5-HT_{2A} dans la transition entre hypertrophie adaptative et hypertrophie maladaptative. En prévenant la réponse hypertrophique à la sténose aortique, l'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A} prévient-elle de l'apparition d'une hypertrophie excentrique et de l'IC ?

Les travaux récents du laboratoire démontrent qu'*in vitro*, les faibles doses de sérotonine sont responsables d'une réponse hypertrophique du cardiomyocyte via l'activation du récepteur 5-HT_{2A} et la voie de signalisation calcineurine – NFAT [189]. Cet effet n'est pas retrouvé avec le récepteur 5-HT_{2B} dont la signalisation hypertrophique serait médiée par les fibroblastes cardiaques, et non le cardiomyocyte, via le relargage de cytokines pro-hypertrophiques [196]. Le rôle du récepteur 5-HT_{2A} semble donc central dans les effets de la sérotonine sur les cardiomyocytes au cours du remodelage ventriculaire.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle du récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine dans la phase de transition de l'hypertrophie concentrique vers l'hypertrophie excentrique avec dysfonction systolique par l'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A}, le M100907 (Sanofi-Aventis, France) chez des souris soumises à une sténose aortique.

Matériels et méthodes

Matériels

L'isoflurane a été fourni par Sigma-Aldrich (L'isle d'Abeau Chesnes, France). Le M100907 [R-(+)-a-(2,3-dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperidinemethanol] a été généreusement offert par Sanofi-Aventis (Paris, France).

Animaux

Les souris C57Bl6, âgées de 8 à 10 semaines, (Charles River, L'Arbresle, France) ont été placées dans des cages standard dans un environnement contrôlé pour la température (20°C), l'humidité (45%) et la photopériode (12h jour/12h nuit). Les animaux ont reçu une alimentation standard et de l'eau de boisson *ad libitum*. Le protocole expérimental a débuté 8 jours après réception des animaux de façon à éviter tout effet de stress lié au changement de stabulation.

Sténose aortique

La sténose aortique a été réalisée sous anesthésie générale gazeuse (Isoflurane, 4% à l'induction puis entretien à 2%), chez 20 souris intubées et ventilées, maintenues à une température corporelle constante de $38 \pm 0,1^\circ\text{C}$. La procédure microchirurgicale débute par une thoracotomie gauche en regard du 4^{ème} espace intercostal et consiste à réduire la lumière aortique par ligature de sa portion ascendante (Prolène® non résorbable 8.0) à un calibre de 26 gauges. L'ensemble de la procédure a été réalisé sous microscope opératoire dans des conditions d'asepsie rigoureuse et après acceptation du protocole (N°03-858-6-10). Vingt souris du même âge ont subi la même procédure chirurgicale sans ligature de l'aorte (animaux shams).

Les animaux ont été traités pendant 8 semaines soit par un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine, le M100907 (0,1 mg/kg/jour dilué dans un volume minimum de 0,01 d'acide chlorhydrique puis dilué dans du sérum physiologique pour atteindre sa concentration finale et ajusté à un PH 7,5), soit par un placebo (DMSO 10%) administré par une pompe mini-osmotique Alzet (Charles River, L'Arbresle, France) placée dans la cavité péritonéale.

Échocardiographies

Les échocardiographies ont été réalisées 4 et 8 semaines après la chirurgie, sous anesthésie générale gazeuse par Isoflurane (1,5% sans induction), sur des souris préalablement rasées sur la partie médiane du thorax.

L'acquisition des images a été réalisées par voie transthoracique à l'aide d'un appareil Vivid 7 (*General Electric Medical System*) équipé d'une sonde 13 MHz. Les dimensions pariétales et cavitaire en fin de diastole (télédiastole) et en fin de systole (téléstole) ont été mesurées en mode Temps-Mouvement et la fraction de raccourcissement a été calculée à partir de ces mesures. Cinq acquisitions successives ont été réalisées pour être moyennées. La fréquence cardiaque a été mesurée en mode Temps-Mouvement.

Histologie

Les moitiés de cœur conservées dans une solution de Carnoy ont été incluses dans la Paraffine et des coupes histologiques de 6 µm ont été effectuées au microtome.

Pour réaliser les différentes colorations, les coupes ont été déparaffinées (3 bains de toluène, 5 min.), puis réhydratées par 3 bains successifs d'éthanol (100°, 95° et 50°, 5 min.) et un bain d'eau (5 min.).

Coloration au Rouge Sirius

Les coupes ont été mises à incuber 30 minutes dans une solution de Rouge Sirius (F3B 0,1% saturé en acide picrique) avant d'être rincées 5 minutes à l'eau.

Les lames ont été observées au microscope optique (Eclipse E400, Nikon) à un grossissement x2. Les photographies (Microfire, Optronics) ont été analysées à l'aide du logiciel MorphoExpert 3.0 pour permettre la quantification de la fibrose évaluée par la surface de collagène rapportée à la surface totale de tissu.

Coloration éosine-hématoxyline

Les coupes ont été mises à incuber 10 minutes dans une solution d'éosine 1% avant d'être rincées à l'eau (5min.). Elles ont ensuite été colorées avec de l'hématoxyline (1 min.) puis ont été rincées à l'eau (5 min.).

Les lames ont été observées au microscope optique à un grossissement x40, 3 champs ont été photographiés aléatoirement pour chaque lame. La surface des cardiomyocytes a été moyennée à partir de 50 mesures par lame, réalisées à l'aide du logiciel MorphoExpert 3.0.

Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les différences statistiques entre les groupes ont été mesurées en utilisant le test de Student. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

Résultats

Phase d'hypertrophie concentrique

L'administration de M100907, antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A}, durant les 4 semaines qui suivent la sténose aortique prévient partiellement l'apparition d'une hypertrophie concentrique (Figure 28A-B) mais s'accompagne d'une augmentation du diamètre télédiastolique du ventricule gauche (DTDVG ; Figure 28C). L'augmentation de l'épaisseur pariétale et du diamètre télédiastolique du ventricule se traduisent par un maintien de l'index de remodelage ventriculaire épaisseur/rayon (E/R) qui augmente chez les animaux soumis à une sténose aortique mais n'ayant pas reçu de M100907 et développant une hypertrophie concentrique (Tableau 7).

| Shams | | Sténose aortique | |
|----------|---------|------------------|----------|
| Contrôle | M100907 | Contrôle | M100907 |
| 0,38 | 0,36 | 0,41 | 0,34 * § |

Tableau 7 : Index de remodelage ventriculaire épaisseur/rayon 4 semaines après chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907

* : $p =$ non significatif sténose aortique/shams ; § : $p < 0,005$ contrôle/M100907

D'un point de vue histologique, l'administration de M100907 durant les 4 semaines qui suivent la sténose, prévient partiellement l'augmentation de la taille des cardiomyocytes induite par la sténose (Figure 29A-B) mais ne prévient pas l'apparition de la fibrose interstitielle qui accompagne le remodelage ventriculaire

(densité de fibrose interstitielle NaCl contre M100907 : 2,46 % contre 2,38 %, $p = 0,9$).

A ce stade, il n'existe pas de différence en terme de fraction de raccourcissement entre les groupes (Figure 28D) bien que les animaux avec sténose aortique ayant reçu du M100907 montrent une tendance à la diminution de la fraction de raccourcissement (sténose aortique : M100907 contre contrôle, $p = 0,07$).

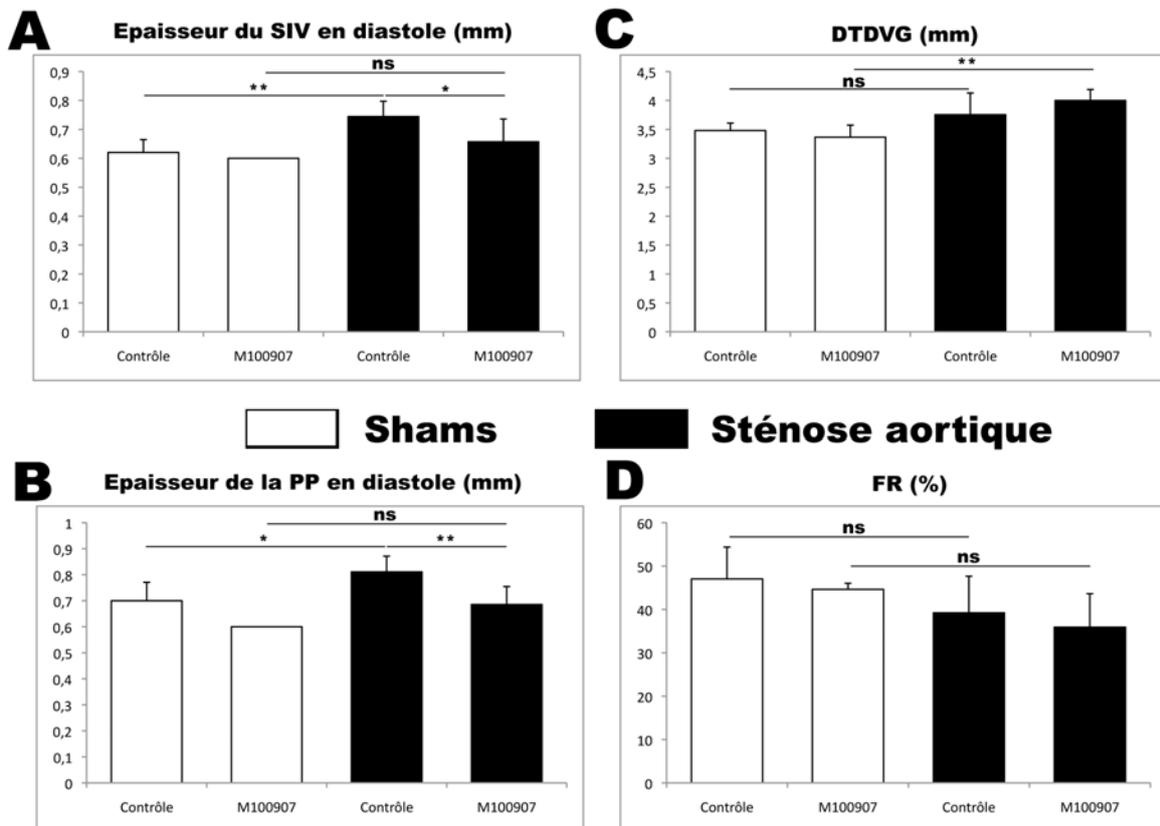


Figure 28 : Evolution des paramètres morphologiques échocardiographiques après 4 semaines de chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907

DTDVG : diamètre télédiastolique du ventricule gauche ; FR : fraction de raccourcissement ; PP : paroi postérieure ; SIV : septum interventriculaire

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; ns : $p =$ non significatif

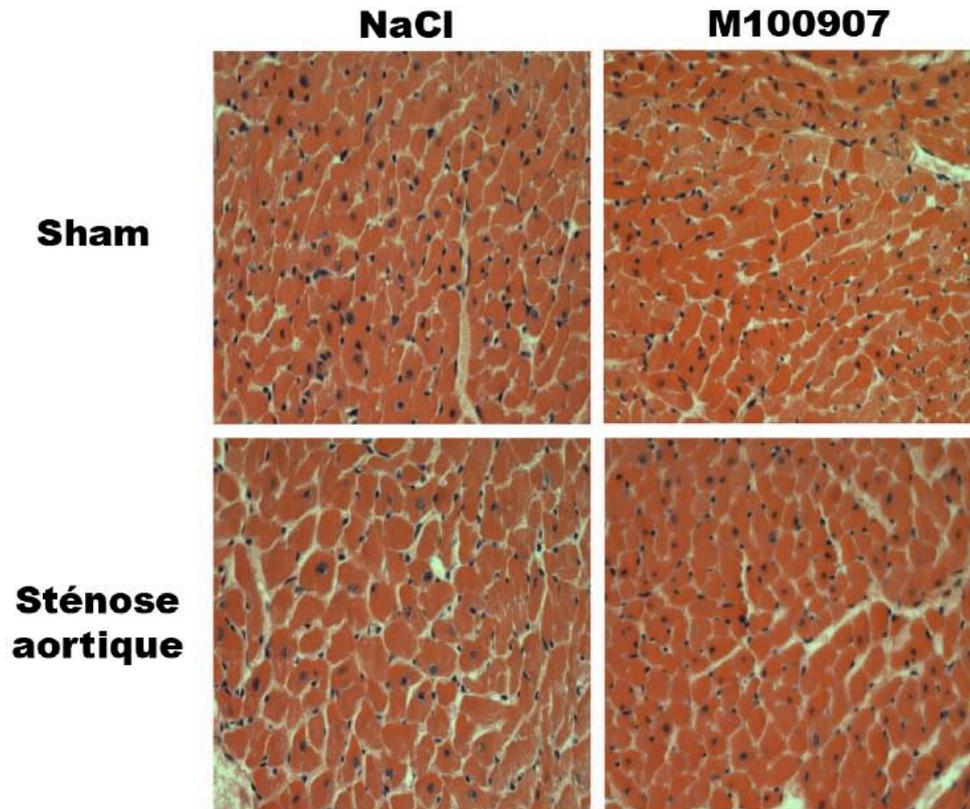
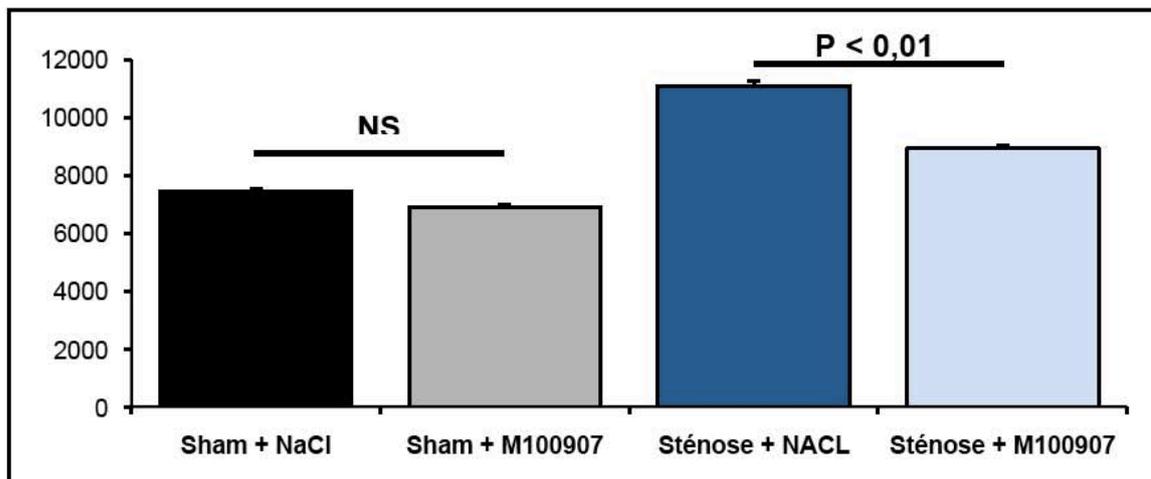
A**B**

Figure 29 : Taille des cardiomyocytes (μm^2) après 4 semaines de chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907

A : coupes transverses du ventricule gauche, coloration éosine-hématoxyline, grossissement 400.

B : surface des cardiomyocytes en μm^2

NS : non significatif

Phase d'hypertrophie excentrique

Au terme des 8 semaines qui suivent la sténose aortique, l'ensemble des souris développe une hypertrophie myocardique qui se manifeste par une augmentation des épaisseurs pariétales du ventricule (Figure 30A-B). L'administration de M100907 au cours de cette période s'accompagne d'une augmentation du DTDVG (Figure 30C) et d'une diminution de la fraction de raccourcissement (Figure 30D).

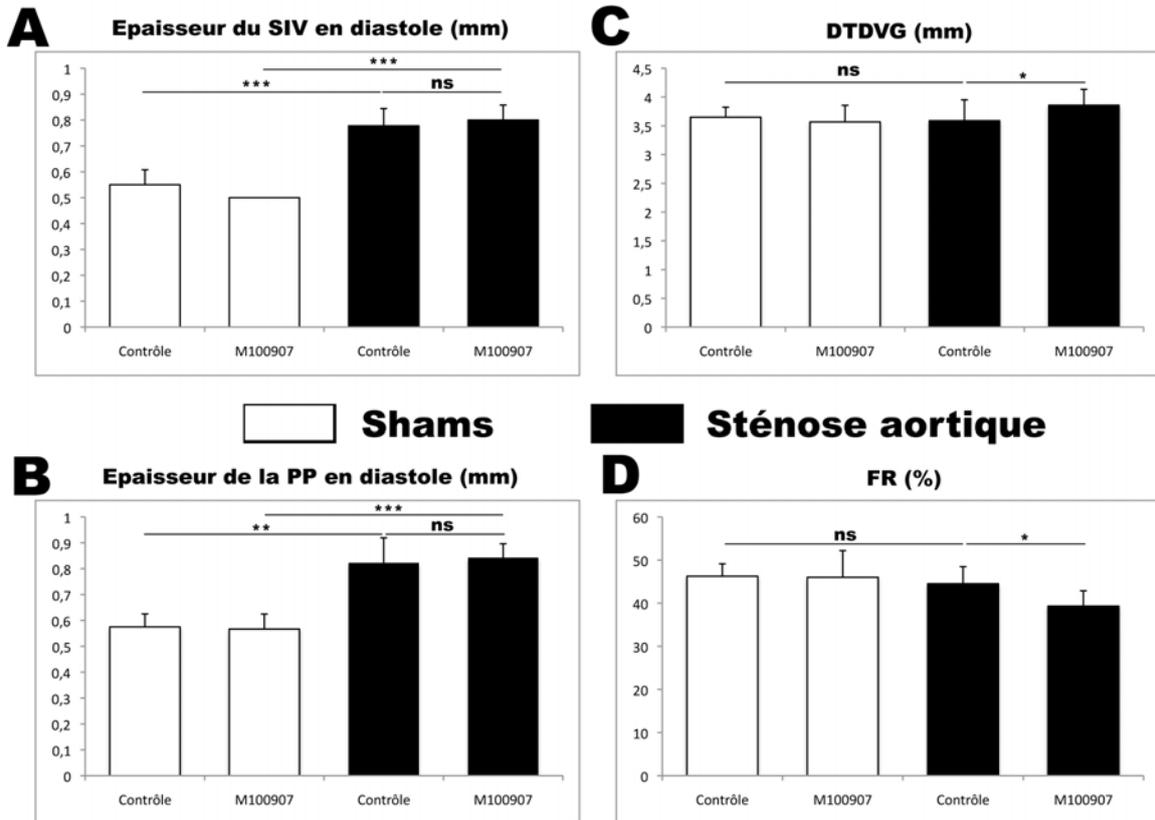


Figure 30 : Evolution des paramètres morphologiques échocardiographiques après 8 semaines de chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907

DTDVG : diamètre télédiastolique du ventricule gauche ; FR : fraction de raccourcissement ; PP : paroi postérieure ; SIV : septum interventriculaire

* : p < 0,05 ; ** : p < 0,005 ; *** : p < 0,0005 ; ns : p = non significatif

A ce stade, l'index E/R est augmenté de façon similaire chez les animaux traités par M100907 et chez les animaux non traités (Tableau 8).

| Shams | | Sténose aortique | |
|----------|---------|------------------|----------|
| Contrôle | M100907 | Contrôle | M100907 |
| 0,31 | 0,30 | 0,45 * | 0,44 * § |

Tableau 8 : Index de remodelage ventriculaire épaisseur/rayon 8 semaines après chirurgie avec ou sans sténose aortique, avec ou sans administration de M100907

* : $p < 0,005$ sténose aortique/shams ; § : $p =$ non significatif contrôle/M100907

Discussion

Cette étude préliminaire démontre que l'inhibition du récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine par un antagoniste sélectif, le M100907, aboutirait à l'apparition d'une hypertrophie excentrique avec dysfonction systolique ventriculaire, sans phase d'hypertrophie concentrique habituellement observée en réponse à la surcharge barométrique. Des résultats similaires ont été retrouvés chez les souris déficientes en récepteurs α 1-adrénergiques et en récepteurs à l'ET-1 qui développent un hypertrophie excentrique avec dysfonction systolique en réponse à la sténose aortique [197, 198]. Les récepteurs α 1-adrénergiques sont, au même titre que les récepteurs 5-HT₂, des récepteurs couplés à la protéine G_q, ce qui suggère que le mécanisme d'action du récepteur 5-HT_{2A} après sténose aortique puisse passer par la même voie que celui des récepteurs α 1-adrénergiques.

Les précédents travaux du laboratoire réalisés *in vitro* démontrent que l'administration de faibles doses de sérotonine (conditions physiologiques) induit l'hypertrophie des cardiomyocytes via le récepteur 5-HT_{2A} activant la voie de signalisation pro-hypertrophique calcineurine – NFAT [189]. Molкетин *et coll.* ont démontré que la surexpression de la voie de signalisation calcineurine – NFAT était à l'origine de l'apparition d'une hypertrophie concentrique, en dehors de toute modification de charge, hypertrophie qui était prévenue par l'inhibition de la voie calcineurine – NFAT [27]. Ces travaux démontraient également que la voie calcineurine – NFAT médiait les effets de l'AT2 et la phényléphrine, hormones se

liant également à un récepteur couplé à la protéine G_q . Nos travaux démontrent qu'*in vivo*, l'inhibition du récepteur 5-HT_{2A} prévient à court terme de l'apparition d'une hypertrophie concentrique, mais s'accompagne à long terme d'une hypertrophie excentrique avec dégradation de la fonction systolique ventriculaire gauche, sous la forme d'une augmentation du DTDVG et d'une diminution de la FR, contemporaines d'une augmentation de l'épaisseur pariétale ventriculaire. Ces résultats s'accordent avec les données de la littérature qui démontrent que l'inhibition de la voie de signalisation hypertrophique de la calcineurine – NFAT en réponse à la sténose aortique aboutit à une hypertrophie excentrique avec dysfonction systolique ventriculaire aboutissant à l'apparition d'une IC [193, 199]. Ces résultats suggèrent que le récepteur 5-HT_{2A} suivrait un voie de signalisation commune des récepteurs couplés à la protéine G_q , activant la voie de signalisation hypertrophique calcineurine – NFAT permettant le développement d'une hypertrophie concentrique compensatrice, qui serait un phénomène adaptatif bénéfique au cours de la surcharge barométrique. D'autres travaux démontrent que l'inhibition des récepteurs de l'aldostérone, qui sont des récepteurs nucléaires, améliore la survie chez la souris soumise à une sténose aortique en prévenant l'apparition d'une hypertrophie excentrique et la dysfonction systolique ventriculaires gauches via la diminution du stress oxydant source d'apoptose et de modifications de la MEC [194]. Ces travaux expliqueraient les effets bénéfiques des antagonistes des récepteurs de l'aldostérone observés dans les essais cliniques [200, 201]. Ces données, et les résultats de nos travaux, confirment que l'hypertrophie concentrique observée initialement au cours de la surcharge barométrique est un phénomène adaptatif bénéfique qui emprunterait une voie de signalisation autonome de l'hypertrophie maladaptative d'apparition tardive s'accompagnant des modifications de la MEC et de la perte cellulaire en cardiomyocytes à l'origine de la dysfonction systolique ventriculaire.

L'hypertrophie des cardiomyocytes, à l'origine d'une hypertrophie ventriculaire, ne serait donc pas nécessairement un phénomène délétère mais pourrait se révéler nécessaire à l'adaptation du myocarde à certaines conditions physiologiques ou pathologiques. Ainsi, l'hypertrophie physiologique induite par l'exercice dépendrait de la voie PI3K – AKT [32, 36]. Dans leurs travaux, McMullen et coll. démontrent que l'inhibition de la voie PI3K – AKT prévient l'apparition de l'hypertrophie physiologique induite par l'exercice mais s'accompagne d'une hypertrophie excentrique avec dysfonction systolique en réponse à la sténose aortique, sans passer par la phase d'hypertrophie concentrique retrouvée chez les

animaux contrôle soumis à sténose aortique. A l'inverse, la surexpression de la voie PI3K – AKT augmente la réponse hypertrophique et la fonction systolique ventriculaire gauche des souris soumises à une sténose aortique et améliore la survie des souris porteuses de cardiomyopathie dilatée [202]. Dans nos précédents travaux, nous avons démontré que l'augmentation des concentrations en sérotonine circulante était à l'origine d'une augmentation de la réponse hypertrophique à la sténose aortique, et que cette réponse exacerbée était prévenue par l'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A} [162]. Les derniers travaux du laboratoire démontrent que la sérotonine est capable de phosphoryler AKT via son récepteur 5-HT_{2A} [203]. Ces données suggèrent que la sérotonine participerait à l'hypertrophie concentrique compensatrice initialement induite par la sténose aortique via son récepteur 5-HT_{2A}.

Pourtant, dans nos travaux, la réponse hypertrophique à la sténose aortique, exacerbée par l'augmentation des taux circulants de sérotonine, s'accompagnait d'une augmentation de la fibrose interstitielle myocardique, stigmate du remodelage ventriculaire, prévenue par l'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A}. Ces résultats corroborent les récents travaux du laboratoires qui démontrent *in vitro* que la sérotonine relarguée par les plaquettes active les fibroblastes cardiaques via son récepteur 5-HT_{2A}, aboutissant à leur migration et à la sécrétion de MMP profibrosantes [191]. Le récepteur 5-HT_{2A} aurait donc un effet paradoxal au niveau du myocarde : effet bénéfique sur le cardiomyocyte en permettant une hypertrophie compensatrice nécessaire au maintien de la fonction contractile dans des conditions de surcharge barométrique, et effet délétère au niveau du fibroblaste en permettant son activation aboutissant au remodelage de la MEC. Ces résultats laissent penser que l'hypertrophie ventriculaire induite par la sérotonine, bien que bénéfique en retardant l'apparition d'une dysfonction ventriculaire, relèverait d'un phénomène pathologique se traduisant par l'apparition d'une fibrose intramyocardique, habituellement non retrouvée dans l'hypertrophie physiologique induite par l'exercice.

Les mécanismes qui participent à la transition entre hypertrophie concentrique et hypertrophie excentrique avec dysfonction systolique ventriculaire restent encore méconnus. Les données des précédents travaux laissent penser que l'apparition d'une hypertrophie excentrique puisse être médiée par le stress oxydant [194]. Les travaux de Grieve et coll. démontrent que la NADPH, impliquée dans une grande partie des effets de l'angiotensine 2, participe à l'apparition d'une

fibrose intramyocardique et d'une dysfonction ventriculaire, mais n'a pas d'effet sur l'hypertrophie concentrique initiale provoquée par la sténose aortique [204]. Les précédents travaux du laboratoire ont démontrés *in vitro* qu'à haute concentration, la sérotonine avait un effet pro-apoptotique via le stress oxydant induit lors de sa dégradation de la MAO-A [151]. Gustafsson et coll. ont montrés que l'administration de sérotonine provoquait l'apparition d'une fibrose valvulaire [103]. L'ensemble de ces données suggère que les effets de la sérotonine dépendent de sa concentration plasmatique. Ainsi, à concentration physiologique, la sérotonine aurait un effet pro-hypertrophique bénéfique mais contemporain d'un effet pro-fibrosant potentialisé par l'élévation des taux de sérotonine plasmatique à l'origine d'une augmentation du stress oxydant et s'accompagnant d'apoptose.

En conclusion, nos travaux démontrent que la sérotonine via son récepteur 5-HT_{2A} permet l'apparition d'une hypertrophie compensatrice bénéfique au cours de la surcharge barométrique, prévenant l'apparition d'une dysfonction systolique ventriculaire.

Travaux de recherche clinique :
Etude SERAOPI

Avant-propos

Nos précédents travaux nous ont amenés à nous interroger sur le rôle de l'activation plaquettaire et de la MAO-A dans la régulation des taux circulants de sérotonine plasmatique et de ses effets sur le myocarde au cours du remodelage ventriculaire. Dans cette étude réalisée chez l'homme, nous étudieront l'activation plaquettaire et les taux sanguins et plasmatiques de sérotonine et de son métabolite, le 5-HIAA, en fonction de la réponse ventriculaire au rétrécissement aortique (RAo) serré.

Nous supposons que la turbulence de flux induite par la sténose aortique est à l'origine d'une activation plaquettaire aboutissant au relargage massif de sérotonine à l'ostium des artères coronaires et influence la réponse myocardique à la sténose.

Cette recherche a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Ouest et Outre-Mer le 5 février 2010 et l'autorisation de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) le 25 janvier 2010.

Justification scientifique et description générale

Le rétrécissement aortique serré

Le rétrécissement aortique (RAo) est la valvulopathie de l'adulte la plus fréquente en Europe et en Amérique du Nord. La forme calcifiée dégénérative du sujet âgé est l'étiologie la plus fréquente, atteignant 2 à 7% de la population de plus de 65 ans [205-207]. Sa prévalence va donc en augmentant du fait du vieillissement de la population, alors que les étiologies rhumatismales et congénitales deviennent plus rares [208].

L'échocardiographie est l'examen de référence dans le diagnostic de RAo [209]. Elle permet le diagnostic de RAo en quantifiant la sténose aortique et en évaluant le degré de calcifications valvulaires et la réponse myocardique à la

sténose, sources d'informations pronostiques importantes [210]. La surface moyenne d'une valve aortique normale est de 2,5 à 3,5 cm². Au grès de la dégénérescence valvulaire et de l'apparition d'une sclérose valvulaire aortique, un gradient de pression entre ventricule et aorte apparaît progressivement lorsque la surface valvulaire aortique devient inférieure à 1,5 cm². Le flux aortique est alors propulsé à haute vitesse provoquant l'apparition de turbulences de flux autour d'un jet central laminaire. S'il est difficile d'établir une limite de sténose serrée tant elle dépend des gradients de pressions transvalvulaires et de la fonction myocardique, la plupart des recommandations s'accordent sur une surface absolue inférieure à 1 cm² ou une surface indexée à la surface corporelle inférieure à 0,6 cm²/m² pour définir le seuil de RAO serré [209].

Le RAO calcifié est une maladie d'évolution progressive. Durant une longue période latente, les patients demeurent asymptomatiques. Cependant, la durée de la période asymptomatique varie largement suivant les patients [211-213]. Les signes fonctionnels apparaissent généralement lorsque RAO devient serré. La mort subite est une cause fréquente de décès chez les patients symptomatiques, mais reste rare chez les sujets asymptomatiques [211-213]. Aussi, la survie moyenne après l'apparition des symptômes va de 20 à 50%, faisant des symptômes l'un des principaux facteurs pronostics [211-215]. Bien que l'âge, la coexistence de lésions coronaires et l'importance des calcifications valvulaires aient été identifiées, entre autres, comme facteurs prédictifs d'évolutivité, il n'est pas possible de prévoir l'évolution chez un patient donné [206, 207]. L'apparition des symptômes dépend essentiellement de la réponse du myocarde à la surcharge barométrique induite par la sténose aortique. Le ventricule développe une hypertrophie initialement concentrique, sans dilatation cavitaire et sans dysfonction systolique, puis, en l'absence d'intervention, une hypertrophie excentrique source de dysfonction systolique. C'est au fur et à mesure de l'évolution de cette réponse ventriculaire qu'apparaissent la dyspnée d'effort, secondaire à l'augmentation des pressions de remplissage, puis la syncope d'effort, secondaire à l'incapacité du myocarde à adapter son débit au cours de l'effort. La diminution contemporaine du débit des artères coronaires malgré l'augmentation de leur calibre est à la source d'une insuffisance coronarienne fonctionnelle expliquant l'apparition possible d'un œdème aigu pulmonaire.

Il n'existe actuellement aucun traitement médical au RAO serré. Seul le remplacement valvulaire aortique, qu'il soit chirurgical ou percutané, permet de lever le gradient de pression transvalvulaire et d'éviter l'évolution vers l'insuffisance cardiaque et le décès. La prévention de l'évolution naturelle de la maladie après l'apparition des symptômes se fait au pris d'une mortalité opératoire de 3 à 5% avant 70 ans et 5 à 15% chez les patients plus âgés [209]. Le développement de nouvelles thérapeutiques visant à prévenir la progression du remodelage ventriculaire est donc un enjeu majeur dans la prise en charge de cette pathologie.

Hypothèses de la recherche et résultats attendus

Les travaux de recherche des dix dernières années ont confirmés le rôle du système serotoninergique dans le remodelage ventriculaire. Les précédents travaux du laboratoire ont démontrés que la sérotonine participait à l'apparition du remodelage ventriculaire dans un modèle de surcharge ventriculaire par sténose aortique [162]. Dans cette étude, l'apparition de l'hypertrophie après sténose aortique était prévenue par l'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A}. Des travaux récents du laboratoire réalisés *in vitro* démontrent que la sérotonine stimule la sécrétion d'IL pro-inflammatoires par les cardiomyofibroblastes, via son récepteur 5-HT_{2A}, expliquant son rôle potentiel dans l'apparition de la fibrose myocardique et de la dysfonction cardiaque [191].

Comme cela a été démontré dans le modèle d'ischémie-reperfusion, la sérotonine, internalisée dans les granules denses des plaquettes, est libérée massivement lors de l'activation plaquettaire. Le RAO serré et les cardiomyopathies hypertrophiques obstructives, de part les turbulences de flux sanguin qu'ils induisent, sont à l'origine d'une activation plus modérée, mais chronique, de l'activation plaquettaire, et de libération de sérotonine [65, 185]. Ceci explique que les marqueurs d'activation plaquettaire, comme la P-sélectine soluble, soient augmentés dans les valvulopathies aortiques [216]. L'IC est également source d'activation plaquettaire chronique, expliquant probablement l'augmentation des taux sanguins de sérotonine. Ainsi, dans le RAO, la turbulence de flux induite par la sténose aortique pourrait être à l'origine d'une activation plaquettaire en sortie de valve, libérant la sérotonine, acteur du remodelage, à l'*ostium* des artères coronaires. Ce mode d'action de la sérotonine dans le remodelage ventriculaire au cours de la sténose aortique conforterait l'hypothèse d'un effet dépendant de la concentration de la sérotonine sur la signalisation hypertrophique du myocarde. Les précédents

travaux du laboratoire ont montré que les faibles concentrations de sérotonine avaient un effet pro-hypertrophique via ses récepteurs, alors que les fortes concentrations avaient un effet pro-apoptotique. L'hypothèse d'une concentration de sérotonine modulée par le degré d'activation plaquettaire lui-même corrélait au degré de sténose de la valve et au degré d'évolution de la maladie expliquerait l'apparition d'une hypertrophie excentrique et d'une dysfonction systolique au cours l'histoire naturelle du RAO serré. La sérotonine aurait donc une place centrale dans le déclin des performances du myocarde et l'apparition des symptômes. Pourtant, le rôle de la sérotonine dans la physiopathologie du RAO n'a jamais été étudiée chez l'homme.

Par ailleurs, si le RAO calcifié a été considéré jusqu'à ces dernières années comme d'origine dégénérative et donc irrémédiable, des travaux récents sont en faveur d'un processus actif qui présente des similitudes de type inflammatoire avec le développement de la plaque d'athérome [217, 218] et qui aboutit à l'apparition de calcifications sur la valve aortique s'étendant au trigone aorto-mitral et au septum inter ventriculaire [219]. Les données de la littérature ont démontrées que la sérotonine avait un effet sur les structures valvulaires et favorisant l'apparition d'une fibrose [103], comme dans le syndrome carcinoïde [220-222] ou lors de l'administration d'anorexigènes agonistes des récepteurs de la sérotonine [223].

Basée sur les précédents résultats du laboratoire, notre hypothèse de recherche est que la sérotonine pourrait participer à l'évolution du RAO en participant au remodelage du ventricule et à la fibrose de la valve, contribuant ainsi à l'apparition des symptômes et à l'aggravation du pronostic. La démonstration de l'implication du système sérotoninergique dans l'aggravation du RAO serré ouvrirait la perspective à de nouvelles thérapies visant à ralentir l'évolution de la maladie.

Dans cette étude, nous étudierons les taux de sérotonine sanguine et plasmatique en fonction de la réponse hypertrophique du myocarde au RAO. Du fait de son caractère ubiquitaire, la demi vie de la sérotonine est faible. L'étude de la sérotonine seule ne serait donc pas un bon reflet ni de son relargage par les plaquettes, ni de son activité au niveau local car elle est métabolisée trop rapidement. Pour ces raisons, les dosages de sérotonine seront complétés par des dosages de l'activation plaquettaire et de son métabolite, le 5-HIAA.

Nous supposons qu'il existe une relation « dose-effet » entre la sévérité du RAO, les taux de sérotonine et l'hypertrophie ventriculaire :

La sérotonine plasmatique libre serait augmentée parallèlement à l'aggravation du RAO et de l'hypertrophie ventriculaire gauche.

La sérotonine plaquettaire stockée serait diminuée (plaquettes vidées) parallèlement à l'aggravation du RAO et à l'hypertrophie ventriculaire gauche.

Les marqueurs d'activation plaquettaires seraient plus exprimés à la surface des plaquettes avec l'aggravation du RAO et de l'hypertrophie ventriculaire gauche.

Ce schéma d'action permet de comprendre les différents éléments de la littérature en reliant RAO, hypertrophie ventriculaire, sérotonine et activation plaquettaire. A ce jour, aucune étude n'a décrit la place du système sérotoninergique en fonction du degré d'évolution des RAO serrés.

Cette étude pilote constituera un élément de compréhension de la physiopathologie du RAO et pourra être une base de travail vers la mise au point de nouveaux marqueurs biologiques pronostics du RAO et éclairer la voie de nouvelles thérapeutiques.

Rapport bénéfice / risque

Cette étude ne comporte pas de bénéfice individuel ni pour les patients ni pour les sujets sains. Il existe cependant un bénéfice collectif. En effet une meilleure connaissance de la maladie permet d'obtenir une prise en charge thérapeutique et chirurgicale plus éclairée, améliorant les critères de morbi-mortalité.

Les risques, inhérents au prélèvement sanguin artériel, sont modestes et sont décrits au paragraphe « Effet indésirable ».

Ce prélèvement étant réalisé de façon systématique chez les sujets porteurs de RAO serré, il n'existe pas de risque surajouté chez ces patients en cas de participation à cette étude.

Retombées attendues

Cette étude pilote, à court terme, pourrait constituer les pré-requis pour des études plus larges visant à :

Préciser le mécanisme physiopathologique de l'évolution du RAO serré

Identifier si la sérotonine est prédictive de l'évolution myocardique en terme de morbi-mortalité par un suivi des patients.

A moyen terme, cette étude pourrait constituer une base de travail pour évaluer par des études de cohorte si la sérotonine est un facteur pronostic du RAO.

A plus long terme, une application thérapeutique en rapport avec la sérotonine pourrait être déclinée.

Objectifs de la recherche

Objectif principal

Décrire la moyenne et la variabilité de la sérotonine plasmatique à différents stades de sévérité du rétrécissement aortique et de l'hypertrophie ventriculaire.

Objectifs secondaires

Décrire la variabilité de 5-HIAA, de l'activation plaquettaire, et de la sérotonine plaquettaire en fonction de la sévérité du rétrécissement aortique et de la sévérité de l'hypertrophie ventriculaire.

Pour les patients porteurs d'un cathéter, détermination du facteur de dilution pour la sérotonine, constitué par l'arbre artériel (entre la sortie du ventricule gauche au niveau des valves aortiques où se passent les phénomènes locaux et l'artère radiale, lieu du prélèvement sanguin). L'étude sera réalisée sur des prélèvements de sérotonine plasmatique réalisés sur l'artériel radiale et sur sonde de coronarographie, réalisée systématiquement au cours du bilan préopératoire chez les patients éligibles au remplacement valvulaire aortique.

Schéma de la recherche

Cette étude est une étude physiopathologique pilote descriptive, monocentrique.

Le dosage des échantillons est réalisé en aveugle de la sévérité de la pathologie.

Critères d'éligibilité

L'évaluation du RAo et de ses conséquences musculaires cardiaques se fera par échocardiographie.

La mesure du RAo se fait par équation de continuité : connaissant le diamètre de la chambre de chasse du ventricule gauche (CCVG), connaissant la vitesse dans la CCVG et connaissant la vitesse à travers la valve aortique, cette équation s'écrit :

$$\text{Surface aortique} \times \text{Vitesse aortique} = \text{Surface CCVG} \times \text{Vitesse CCVG}$$

D'où :

$$\text{Surface aortique} = (\text{Surface CCVG} \times \text{Vitesse CCVG}) / \text{Vitesse aortique}$$

La mesure de la masse myocardique se fait par la méthode de Devreux (approche échographique « temps-mouvement » de la masse ventriculaire gauche) qui suppose une géométrie ventriculaire ellipsoïde.

Les groupes de sévérité du RAo serré en fonction de la réponse hypertrophique myocardique seront déterminés par l'utilisation de l'index de remodelage ventriculaire recommandé par la Société Européenne de Cardiologie (ratio paroi du ventricule sur rayon du ventricule) [224].

Critères d'inclusion

Pour tous les groupes :

Age \geq à 50 ans

Signature du consentement éclairé

Affiliation à un régime de sécurité sociale

Pour le groupe 1 (contrôle)

Absence de RAo serré (surface $> 0,6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$)

Absence d'hypertrophie ventriculaire (masse ventriculaire gauche $< 125 \text{ g/m}^2$ chez les Hommes et $< 110 \text{ g/m}^2$ chez les Femmes)

Ratio paroi du ventricule sur rayon du ventricule $< 0,42$

Pour le groupe 2 (groupe remodelage ventriculaire concentrique)

RAo serré (surface $\leq 0,6\text{cm}^2/\text{m}^2$)

Absence d'hypertrophie ventriculaire (masse ventriculaire gauche $< 125\text{ g/m}^2$ chez les Hommes et $< 110\text{ g/m}^2$ chez les Femmes)

Ratio paroi du ventricule sur rayon du ventricule $\geq 0,42$

Pour le groupe 3 (groupe hypertrophie concentrique)

RAo serré (surface $\leq 0,6\text{cm}^2/\text{m}^2$)

Hypertrophie ventriculaire (masse ventriculaire gauche $\geq 125\text{ g/m}^2$ chez les Hommes et $\geq 110\text{ g/m}^2$ chez les Femmes)

Ratio paroi du ventricule sur rayon du ventricule $\geq 0,42$

Pour le groupe 4 (groupe hypertrophie excentrique)

RAo serré (surface $\leq 0,6\text{cm}^2/\text{m}^2$)

Hypertrophie ventriculaire (masse ventriculaire gauche $\geq 125\text{ g/m}^2$ chez les Hommes et $\geq 110\text{ g/m}^2$ chez les Femmes)

Ratio paroi du ventricule sur rayon du ventricule $< 0,42$

D'un point de vue physiopathologique la distinction de ces 4 groupes correspond à une augmentation de la gravité du RAo en terme de réponse ventriculaire gauche, principal facteur pronostic de la maladie. En pratique clinique, il existe une continuité dans la diminution de la surface valvulaire aortique du groupe 1 au groupe 4.

Critères de non inclusion

Pour tous les groupes

Age < 50 ans

Traitement présent dans la liste positive en annexe

Thrombopathie, thrombopénie et thrombocytose

Tumeur carcinoïde

Femme enceinte ou susceptible de l'être

Sujet sous sauvegarde de justice, sous tutelle ou sous curatelle

Pathologie dépressive

Pour le groupe 1

Antécédent de pathologie cardiaque

Pour les groupes 2, 3 et 4

Antécédent d'IDM

Sténoses aortiques supra et sous valvulaires (sténoses aortique congénitales).

Modalités de recrutement

Pour le groupe 1 (15 volontaires sains)

Le recrutement débutera au Centre d'Investigation Clinique (CIC) de Toulouse, par une consultation des bases de données des volontaires sains. Les sujets éligibles seront contactés par courrier dans un premier temps ; s'ils sont intéressés, ils seront vus en consultation dans le service de Cardiologie de Rangueil pour une visite de pré-inclusion puis 24h après pour la visite d'inclusion et les examens cliniques et biologiques nécessaire à la recherche biomédicale.

Pour les groupes 2, 3 et 4 (15 patients par groupe)

Le recrutement se fera de façon monocentrique dans la Fédération de Services de Cardiologie du CHU Rangueil à Toulouse.

En moyenne, quatre patients par semaine sont adressés dans la Fédération des Services de Cardiologie à l'hôpital Rangueil pour prise en charge de RAO serré. Nous considérons le nombre de perte de sujets à 50 %, nous souhaitons former 3 groupes de malades atteints de RAO avec des niveaux de réponse ventriculaire différents chacun composé de 15 patients. En incluant le groupe témoin, 60 sujets seront nécessaires à l'étude. La durée de recrutement est estimée à un an.

Le recrutement se fera de manière consécutive : les patients pouvant être inclus dans l'un des groupes seront invités consécutivement à participer et chaque groupe sera complété jusqu'à l'effectif maximal prévu.

En résumé, les sujets sains du groupe 1 seront recrutés de manière encadrée, au sein du Centre d'Investigation Clinique (CIC) de Toulouse qui possède des listes de volontaires sains.

Les patients atteints de RAO serrés des groupes 2, 3 et 4, adressés au CHU Rangueil pour la prise en charge de leur RAO serré, seront recrutés au sein de la Fédération des Services de Cardiologie.

Traitements et procédures associé(e)s autorisé(e)s

Traitements autorisés

β-Bloquant

Inhibiteurs Calciques

Inhibiteur de l'enzyme de conversion

Antagoniste des récepteurs de l'angiotensine 2

Diurétiques

Statine

Amiodarone

Digoxine

Anti-Vitamine K

Anti-agrégant plaquettaire

Dérivés nitrés

Anti-diabétiques oraux

Insuline

L'état d'activation des plaquettes étudié résulte d'une activation précoce aboutissant à l'expression à la surface des plaquettes d'un certain nombre de marqueurs qui seront explorés par cytométrie de flux. Les traitements tels que les anti-vitamines K et les antiagrégants plaquettaires actifs sur les phénomènes d'hémostase secondaire et non sur les phénomènes d'activation plaquettaire précoce n'influent pas sur l'expression de ces marqueurs.

Procédures autorisées

Échocardiographies transthoraciques

L'échocardiographie est un examen non invasif, indolore, d'une durée de 15 à 20 minutes.

Les échocardiographies seront réalisées au laboratoire d'échocardiographie de l'hôpital Ranguel, sur un échographe IE33 Philips permettant le stockage d'images numérisées.

L'examen sera réalisé sur un lit, chez un patient en décubitus latéral gauche, torse nu.

Aucun risque supplémentaire n'est encouru par les patients ou volontaires sains se prêtant à l'examen.

Prélèvements sanguins artériels radiaux

Le prélèvement artériel sera réalisé par le médecin investigateur par une ponction radiale droite ou gauche au choix du patient.

La ponction artérielle sera réalisée 20 minutes après la mise en place du patch adhésif d'un anesthésique local Emla[®] fourni par la pharmacie de l'hôpital.

La ponction de l'artère sera réalisée par un repérage au pouls, au niveau de la face avant du poignet, à l'aide d'une aiguille de 23 gauges (0,4 mm).

À l'issue du prélèvement, une compression manuelle de 5 minutes sera réalisée en regard du point de ponction, suivie de la mise en place d'un pansement compressif à conserver 30 minutes de façon à diminuer le risque d'hématome.

Le prélèvement artériel radial sera réalisé chez les sujets atteints de RAO à la suite du prélèvement artériel destiné à l'exploration des gaz du sang compris dans le bilan pré-opératoire (motif d'hospitalisation). Dans les groupes 2, 3 et 4, la recherche biomédicale est le principe du « tube en plus ».

La sécurité des volontaires sains sera assurée par la présence à proximité de la salle de prélèvement du matériel nécessaire à la prise en charge des volontaires sains en cas d'évènements indésirables.

Prélèvement sanguin artériel supra-valvulaire sur sonde-cathéter d'angiocoronarographie (groupes 2 à 4).

L'angiocoronarographie est une technique d'imagerie médicale utilisée en cardiologie pour visualiser l'état de la circulation artérielle coronaire avant toute intervention chirurgicale. Cet examen utilise la technique des rayons X et l'injection d'un produit de contraste iodé Xenetix® (300mg d'iode/ml) actuellement en marché au CHU de Toulouse. Une sonde-cathéter est introduit via l'artère radiale jusqu'à l'ostium des artères coronaires, en sortie de valve aortique, lieu de prélèvement du sang artériel.

Le prélèvement de sang ne rajoute pas de risque supplémentaire aux patients volontaires des groupes 2, 3 ou 4 subissant cet examen.

Prélèvement sanguin veineux

Le prélèvement sanguin veineux concerne uniquement les volontaires du groupe 1 pour la réalisation d'une numération-formule sanguine et des sérologies virales. Ce prélèvement sera réalisé dans le pli du coude. Les résultats de la numération-formule sanguine des volontaires des groupes 2,3 et 4 seront récupérés dans le dossiers du patients.

Traitements interdits :

Les traitements interdits sont listés dans l'annexe 1A. Ces traitements sont interdits s'ils sont pris par le patient actuellement ou bien arrêtés depuis moins de 30 jours.

L'ensemble des médicaments pouvant interférer avec les taux de sérotonine (inhibiteurs des MAO, inhibiteurs de la recapture de la sérotonine) seront exclus. Par mesure de précaution l'ensemble des neuroleptiques seront également exclus (Annexe 1A).

Il n'y a pas de procédure interdite pendant cette étude.

Critères de jugement

Critère de jugement principal

Concentration artérielle de la sérotonine plasmatique (ng/ml). Distribution de la variable « concentration de la sérotonine » considérée comme quantitative et continue.

Outil d'évaluation

La sérotonine sera dosée par technique HPLC avec une double détection coulométrique (ampérométrie). Le principe de séparation sur la colonne de chromatographie se matérialise par des temps de rétention spécifiques à chaque sous type chimique à doser. Le principe du dosage est basé sur une méthode électrochimique, plus spécifiquement coulométrique et se matérialise par des mesures de courants. La méthode utilisée permet de doser la sérotonine plasmatique et plaquettaire, et son métabolite HIAA, de manière simultanée conformément à l'analyse et dosage des monoamines sur des homogénats de cerveau de souris [173]. Il s'agit de la même méthode d'extraction et de purification pour chaque échantillon sanguin, des mêmes réactifs, de la même ligne HPLC et du même détecteur entre les séries. La technique de purification avant dosage est protégée par un brevet appartenant au laboratoire de Biochimie qui réalisera les dosages (Laboratoire de Biochimie Pharmacologique, Hôpital André Mignot, Le Chesnay). Le détail de la technique est présenté en annexe 1B.

Le protocole de recueillement et de traitement des échantillons avant stockage dans des cryotubes à moins 80°C (congélateur présent dans la fédération des Services de Cardiologie de l'hôpital Ranguel Ranguel) est détaillé en annexe 1C.

Des séries de 30 dosages seront regroupés avant envoi sécurisé dans de la carboglace par un organisme privé « Nuit et jour » en contrat avec l'INSERM I2MR de Toulouse.

La technique HPLC sera réalisée dans le laboratoire de Biochimie Pharmacologique de l'Hôpital André Mignot à Le Chesnay, ayant l'expertise et le personnel qualifié pour le traitement des échantillons humains et avec qui notre équipe collabore dans le cadre d'activités de recherche fondamentale chez le rongeur.

Les prélèvements de cette étude seront réalisés sur du sang artériel au niveau de l'artère radiale permettant d'obtenir un meilleur reflet du relargage plaquettaire de la sérotonine en sortie de valve aortique, avant la dispersion de l'amine dans le lit artériolaire et le réseau veineux où la MAO-A dégrade la sérotonine circulante.

Critères de jugement secondaires

1) Concentration artérielle du 5-HIAA en ng/ml (variable quantitative continue)

Outil d'évaluation

La même technique de dosage par HPLC que pour la sérotonine plasmatique sera utilisée. Seul le traitement de l'échantillon avant congélation diffère et est détaillé en annexe 1C.

2) Concentration artérielle de la sérotonine plaquettaire en ng/ml (variable quantitative continue)

Outil d'évaluation

La même technique de dosage par HPLC que pour la sérotonine plasmatique sera utilisée. Seul le traitement de l'échantillon avant congélation diffère et est détaillé en annexe 1C.

3) Densité d'expression des marqueurs de surface des plaquettes activées

Outil d'évaluation

La technique de dosage repose sur la cytométrie de flux (CMF) : le principe de cette évaluation est la séparation de différents types cellulaires en fonction de l'expression de marqueurs différents à la surface de la membrane plasmique. En faisant défiler les plaquettes à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, la lumière réémise permet un triage en fonction de l'expression de certains marqueurs. Ce procédé d'analyse individuelle permet d'obtenir des résultats statistiques sous forme de distribution en histogramme. Le matériel utilisé (CMF Beckman Coulter FC500) est localisé au laboratoire d'Hémostase du CHU Purpan à Toulouse.

Le prélèvement destiné à cette exploration sera prélevé sur tube citrate et réalisé sur sang total. Le délai maximum entre le prélèvement et la réalisation du dosage est de 4 h, période durant laquelle le prélèvement devra rester à température ambiante comme détaillé en annexe 1C.

4) Facteur de dilution constitué par l'arbre artériel

L'hypothèse physiopathologique de l'implication de la sérotonine dans le Rao serré suppose une concentration de l'amine importante en sortie du valve du fait du relargage plaquettaire, à l'origine d'un impact myocardique local avant sa dilution de long de l'arbre artériel.

Outil d'évaluation

La dilution des concentrations de sérotonine le long de l'arbre artériel se fera par comparaison de deux dosages de sérotonine plasmatique par HPLC par

individu : le premier réalisé au niveau de l'artère radiale, comme décrit précédemment, l'autre réalisé en sortie de valve, au niveau des ostia coronaires, lors du bilan angiocoronarographique réalisé systématiquement dans le cadre du bilan pré-opératoire chez les sujets des groupes 2 à 4 redevables d'un remplacement valvulaire aortique.

Le facteur de dilution de la sérotonine le long de l'arbre artériel se fera par comparaison entre la moyenne des concentrations au niveau de l'artère radiale et la moyenne des concentrations en sortie de valve par test de Student dans chacun des groupes étudiés.

Déroulement de la recherche

Calendrier de la recherche

Début des inclusions : juin 2010

Durée de la période d'inclusion : 2 ans

Durée de participation de chaque sujet du groupe 1 : deux fois 1 heure. Le premier jour, une consultation d'une heure sera réalisée pour informer le sujet témoin du déroulement et des objectifs de la recherche. Après vingt-quatre heures de réflexion, le sujet témoin signera le consentement pour la réalisation des examens dans le cadre de la recherche.

Durée de participation de chaque sujet des groupes 2 à 4 : 1 heure. Au cours de l'hospitalisation pour la prise en charge du Rao serré, une consultation d'une heure sera réalisée pour informer le patient du déroulement et des objectifs de la recherche. Après vingt-quatre heures de réflexion, le patient signera le consentement pour la réalisation des examens dans le cadre de la recherche. Pour les sujets des groupes 2 à 4, il n'y a pas de temps supplémentaire en cas de participation à l'étude : cette recherche est basée sur le principe du « tube en plus » s'intégrant dans le cadre de la prise en charge des patients (bilan pré-opératoire de Rao serré).

Durée totale de la recherche : 2 ans.

Tableau récapitulatif du suivi patient

Groupe 1

| | Pré-inclusion J-1 | Inclusion J0 |
|------------------------------------|----------------------|-----------------|
| Information & consentement éclairé | ✓ | |
| Examen clinique ¹ | | ✓ |
| Bilan biologique (1) ² | | ✓ |
| Bilan biologique (2) ³ | | ✓ |
| Examens paracliniques ⁴ | | ✓ |

Tableau 9 : Récapitulatif du calendrier de la recherche pour les sujets du groupe 1

¹ Examen clinique : examen clinique cardiovasculaire standard comprenant auscultation cardiaque, vasculaire périphérique et pulmonaire et recherche de signes d'insuffisance cardiaque

² Bilan biologique (1) : prélèvement sanguin veineux pour la réalisation de la numération formule sanguine et plaquettes, des sérologies (VIH, HVC et HVB).

³ Bilan biologique (2) : prélèvement sanguin artériel radial pour dosage de la sérotonine plasmatique et plaquettaire, du 5HIAA plasmatique et de l'activation plaquettaire

⁴ Examens para-cliniques : échocardiographie transthoracique

Groupe 2 à 4

| | Pré-inclusion J-1 | Inclusion J0 |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------|
| Information et consentement éclairé | ✓ | |
| Examen clinique ¹ | | ✓ |
| Bilan biologique (2) ² | | ✓ |
| Examens paracliniques ³ | | ✓ |

Tableau 10 : Récapitulatif du calendrier de la recherche pour les sujets des groupes 2 à 4

¹ Examen clinique : examen clinique cardiovasculaire standard comprenant auscultation cardiaque, vasculaire périphérique et pulmonaire et recherche de signes d'insuffisance cardiaque

² Bilan biologique (2) : prélèvement sanguin artériel radial pour dosage de la sérotonine plasmatique et plaquettaire, du 5HIAA plasmatique et de l'activation plaquettaire

³ Examens para-cliniques du bilan pré-opératoire dans la prise en charge du patient avant toute chirurgie de RAO : échocardiographie transthoracique et angiocoronarographie.

Visite de pré-inclusion

La visite de pré-inclusion sera assurée par le médecin investigateur Cardiologue et aura lieu avant la visite d'inclusion. Avant tout examen lié à la recherche, l'investigateur informera le volontaire sain ou le patient. Après cette séance d'information, le volontaire proposé à la recherche dispose d'un délai minimum de réflexion de vingt-quatre heures. Le médecin précisera également les droits du volontaire dans le cadre d'une recherche biomédicale et vérifiera les critères d'éligibilité lors de la visite d'inclusion. Un exemplaire de la note d'information et du formulaire de consentement sera alors remis au volontaire par le médecin investigateur pour réflexion.

Visite d'inclusion

Recueil du consentement

Lors de la visite d'inclusion, le médecin investigateur informera de nouveau le volontaire si nécessaire et répondra à toutes ses questions concernant l'objectif, la nature des contraintes, les risques prévisibles et les bénéfices attendus de la recherche. Il précisera également les droits du sujet dans le cadre d'une recherche biomédicale et vérifiera les critères d'éligibilité.

Le formulaire de consentement devra être signé avant la réalisation de tout examen clinique ou paraclinique nécessaire à la recherche. Si le volontaire donne son accord de participation, ce dernier et l'investigateur inscriront leurs noms et prénoms en clair, dateront et signeront le formulaire de consentement.

Les différents exemplaires de la note d'information et du formulaire de consentement seront alors repartis comme suit :

Un exemplaire de la note d'information et du consentement signé sera remis au volontaire.

L'exemplaire original sera conservé par le médecin investigateur (même en cas de déménagement du volontaire pendant la durée de la recherche) dans un lieu sûr inaccessible à des tiers, pour une durée de 30 ans après la fin de la recherche.

A la fin des inclusions ou au plus tard à la fin de la recherche, un exemplaire de chaque formulaire de consentement sera transmis au promoteur ou à son représentant selon des modalités communiquées en temps utile aux investigateurs.

Tout amendement qui modifie la prise en charge des volontaires ou les bénéfices, risques et contraintes de la recherche fera l'objet d'une nouvelle note d'information et d'un nouveau formulaire de consentement dont le recueil suit la même procédure que celle précitée.

Déroulement de la recherche

Pour tous les groupes, la visite d'inclusion comprend un examen clinique cardiovasculaire standard incluant une auscultation cardiaque, vasculaire et pulmonaire, ainsi que la recherche de signes d'insuffisance cardiaque.

Groupe 1

Les sujets volontaires du groupe 1 inscrit dans la base de données du CIC de Toulouse seront convoqués pour la visite d'inclusion en secteur de consultation, en ambulatoire, vingt-quatre heures minimum après la visite de pré-inclusion et après le recueil du consentement du volontaire.

À l'issue de l'examen clinique, une infirmière diplômée d'Etat, réalisera le prélèvement sanguin veineux destiné à la réalisation de la numération formule plaquette, des sérologies (VIH, VHC et VHB).

Un patch adhésif anesthésique sera positionné sur la face avant du poignet où sera réalisée la ponction artérielle radiale (au choix du sujet).

L'échocardiographie sera réalisée par voie transthoracique.

Après l'échocardiographie (15 à 20 minutes), l'anesthésie locale étant efficace au niveau de l'artère radiale, le médecin investigateur réalisera le prélèvement artériel par ponction radiale (5 tubes). Le prélèvement servira aux dosages de la sérotonine plasmatique (1 tube de 5ml) et plaquettaire (1 tube de 5ml), du 5-HIAA plasmatique (1 tube de 5ml) et de l'activation plaquettaire (2 tubes de 2,7ml).

Groupe 2, 3 ou 4

La visite d'inclusion sera réalisée en secteur d'hospitalisation de Cardiologie chez des patients hospitalisés pour bilan préopératoire d'un RAO serré, vingt-quatre heures après la visite de pré-inclusion et après avoir recueilli le consentement du patient.

L'échocardiographie transthoracique sera réalisée de façon systématique au titre du bilan pré-opératoire de RAO serré.

Les résultats de la numération-formule sanguine (NFS) sur sang veineux, réalisée systématiquement dans le cadre du bilan pré-opératoire, seront récupérés dans le dossier clinique du patient. Aucun prélèvement veineux supplémentaire ne sera réalisé dans le cadre de la recherche biomédicale chez les patients des groupes 2 à 4.

Pour le prélèvement artériel, cinq tubes de sang sont prélevés en plus au cours de la ponction artérielle réalisée à titre systématique au cours de l'exploration fonctionnelle respiratoire (gaz du sang) dans le cadre du bilan pré-opératoire. Le prélèvement servira aux dosages de la sérotonine plasmatique (1 tube de 5ml) et plaquettaire (1 tube de 5ml), du 5-HIAA plasmatique (1 tube de 5ml) et de l'activation plaquettaire (2 tubes de 2,7 ml).

Un tube de 5 ml sera prélevé en plus au cours de l'angiocoronarographie réalisée à titre systématique dans le cadre du bilan pré-opératoire de RAO serré. Le prélèvement sera réalisé au moment où la sonde de cathétérisme est située au dessus de la valve aortique. Un tel prélèvement ne rallonge pas l'examen et ne rajoute aucun risque à la procédure. Le prélèvement servira aux dosages de la sérotonine plasmatique (1 tube de 5ml) de façon à rechercher un éventuel gradient entre le culot de l'aorte et l'artère radiale (objectif secondaire : mesure du facteur de dilution constitué par l'arbre artériel).

Gestion des prélèvements artériels pour dosage par HPLC : sérotonine et 5-HIAA

Chaque prélèvement sera numéroté de façon incrémentielle avant d'être centrifugés (annexe 1C) immédiatement dans le service de Cardiologie pour un conditionnement en cryotube. Les prélèvements sont ensuite stockés dans un congélateur sécurisé à -80°C au sein du service de Cardiologie pour être secondairement envoyés par série dans le laboratoire de Biochimie Pharmacologique de l'Hôpital André Mignot pour analyse.

L'incrémentation des volontaires inclus s'effectuera dans l'ordre chronologique d'arrivée des volontaires après vérification des critères d'inclusion et conduira à l'inclusion du nombre de sujets nécessaires dans chaque groupe.

Un cahier sera tenu à jour dans le service de Cardiologie. A chaque inclusion, ce cahier sera rempli avec un numéro de sujet, la date et l'heure d'inclusion ainsi que le badge hospitalier du volontaire.

La codification des tubes sera organisée comme suit :

Les prélèvements artériels seront notés « artériel ».

Les deux premières lettres correspondront aux initiales des nom et prénom de l'investigateur.

Le premier chiffre correspondra au numéro du patient (ordre chronologique) suivi de son groupe :

G1 pour groupe 1

G2 pour groupe 2

G3 pour groupe 3

G4 pour groupe 4

Le deuxième chiffre correspondra au type de prélèvement : (1) prélèvement sérotonine plasmatique, (2) : prélèvement 5-HIAA, (3) : prélèvement sérotonine plaquettaire.

Les cryotubes seront stockés dans un congélateur - 80°C, sous clef, prévu à cet effet dans le service de Cardiologie.

Les analyses de chromatographie se dérouleront par série de 20 à 30 échantillons, une série représentant environ 7 à 8 sujets prélevés.

Les analyses de chromatographie se dérouleront dans le laboratoire de Biochimie Pharmacologique de l'Hôpital André Mignot à Le Chesnay. Les dosages seront réalisés en aveugle : à chaque envoi, les tubes seront numérotés :

« A » pour l'ensemble des dosages de sérotonine plasmatique

« B » pour l'ensemble des dosages de sérotonine plaquettaire

« C » pour l'ensemble des dosages du 5-HIAA

Cette lettre sera suivie d'un chiffre attribué à chaque cryotube, dont la correspondance restera sous clef à Toulouse.

Gestion des prélèvements pour hémostase : activation plaquettaire

La codification des tubes sera organisée comme suit :

Les prélèvements artériels seront notés « artériel ».

Les deux premières lettres correspondront aux initiales des nom et prénom de l'investigateur.

Le premier chiffre correspondra au numéro du patient (ordre chronologique) suivi de son groupe :

G1 pour groupe1

G2 pour groupe 2

G3 pour groupe 3

G4 pour groupe 4

Le code « PQ 1 » correspondra au prélèvement destiné à l'analyse pour CMF et le code « PQ2 » au prélèvement dédié à la sérothèque.

Les prélèvements (2 tubes de 2,7 ml) destinés à explorer l'activation plaquettaire seront acheminés dans les quatre heures qui suivent dans des conditions nécessaires pour le maintien de leur qualité, à température ambiante, par un coursier d'une entreprise de transport privé jusqu'au laboratoire d'hémostase de l'hôpital Purpan.

Gestion du prélèvement veineux pour numération-formule sanguine :

groupe 1

Le prélèvement veineux des sujets du groupe 1 sera noté « veineux NFS»

Les deux premières lettres correspondront aux initiales des nom et prénom de l'investigateur.

Le premier chiffre correspondra au numéro du patient (ordre chronologique) suivi de son groupe :

G1 pour groupe1

Ce prélèvement sera envoyé pour numération en même temps que les tubes pour analyse de l'activation plaquettaire au laboratoire d'hémostase de l'hôpital Purpan.

Les résultats de la numération-formule sanguine (NFS) sur sang veineux pour les volontaires des groupes 2 à 4 seront récupérés dans le dossier clinique du patient et stockés dans un classeur sous clef, avant retranscription dans le cahier d'observation. Aucun prélèvement veineux supplémentaire ne sera réalisé dans le cadre de la recherche biomédicale chez les patients des groupes 2 à 4.

Contraintes liées à la recherche et indemnisation des sujets

Les volontaires pourront participer simultanément à une autre recherche si cette dernière ne met pas en jeu un traitement inconnu ou un traitement présent dans la liste interdite pour l'étude.

La contrainte pour les sujets sains est due au temps investi dans la réalisation des examens, à la gêne et au risque d'hématome occasionné par la ponction artérielle radiale.

Le montant des indemnisations, en rapport avec ces contraintes a été évalué à 40 euros pour chacun des patients du groupe 1.

Quel que soit leur stade de gravité du groupe 2 à 4, il n'existe aucune contrainte ou risque surajouté pour les patients porteurs d'un RAO serré qui seront hospitalisés dans le cadre d'un bilan pré-opératoire de RAO. En effet la participation des sujets malades à cette étude pilote rentre dans le cadre des études « tubes en plus ».

Les sujets du groupe 1 seront inscrits dans le fichier national des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales.

Règles d'arrêt de la recherche

Cette étude ne modifie rien quant à la prise en charge du patient porteur de RAO serré qui restera inchangée même s'il vient à quitter l'étude. La seule différence avec un patient ne participant pas à l'étude est le prélèvement d'un tube de sang artériel en plus au cours de la gazométrie et de l'angiocoronarographie réalisées dans le cadre du bilan pré-opératoire de son RAO serré.

Le patient peut cependant à tout moment s'il le désire sortir de l'étude.

Collection d'échantillons biologiques

La recherche comportera une collection d'échantillons biologiques.

Objectifs

Collection de sérum des patients pour analyse dans un second temps des marqueurs solubles de l'activation plaquettaire par technique ELISA.

Nombre de collections

Quatre groupes de 15 sujets, soit un total de 60 sujets.

Nature des échantillons biologiques

Sérum.

Les modalités de prélèvement

Prélèvement artériel.

Nombre de tubes de sang prélevés

Un tube par patient.

Quantité de sang dans chaque tube

Cinq millilitres.

Technique de préparation et d'identification des tubes

Anonymat identique au codage des tubes et patients

Conditions de conservation des échantillons prélevés

Congélateur à - 80°C,

Nom et adresse des lieux de conservation

Service d'hémostase, Inserm U563, Hôpital Purpan, Toulouse

But

Approfondir et affiner le niveau d'activation des plaquettes.

Devenir envisagé à la fin de la recherche

Utilisation des échantillons puis destruction dans le circuit des déchets d'activité de soin : durée de conservation 5 ans au maximum.

Gestion des événements indésirables et des faits nouveaux

Définitions

Événement indésirable (article R.1123-39 du code de la santé publique)

Toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche biomédicale, que cette manifestation soit liée ou non à la recherche ou au produit sur lequel porte cette recherche.

Événement indésirable grave (article R.1123-39 du code de la santé publique)

Tout événement indésirable qui :

Entraîne la mort,

Met en danger la vie de la personne qui se prête à la recherche,

Nécessite une hospitalisation ou la prolongation de l'hospitalisation,

Provoque une incapacité ou un handicap importants ou durables,

Ou bien se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale,

Et s'agissant du médicament, quelle que soit la dose administrée.

Effet indésirable inattendu (article R.1123-39 du code de la santé publique)

Tout effet indésirable du produit dont la nature, la sévérité ou l'évolution ne concorde pas avec les informations figurant dans les dossiers de demande d'avis au Comité de Protection des Personnes et de demande d'autorisation à l'autorité compétente.

Fait nouveau (arrêté du 24 mai 2006)

Nouvelle donnée de sécurité, pouvant conduire à une réévaluation du rapport des bénéfices et des risques de la recherche, ou qui pourrait être suffisant pour envisager des modifications des documents relatifs à la recherche, de la conduite de la recherche ainsi que, le cas échéant, dans l'utilisation du produit.

Description des événements indésirables

Effets secondaires graves attendus

Il n'y a pas d'événements indésirables graves attendus dans le cadre du protocole :

Ni liés au traitement,

Ni liés à la recherche,

Ni liés aux techniques de recherche.

Cependant l'évolution de la maladie et l'acte chirurgical de remplacement des valves peuvent comporter des événements indésirables graves :

Décès,

Epanchement péricardique compressif,

Désinsertion de la valve prothétique,

Troubles conductifs de haut grade,

Accident vasculaire cérébral,

Fibrillation auriculaire,

Sternite et médiastinite.

Tout événement indésirable grave ne figurant pas dans la liste des événements attendus est qualifié d'inattendu.

Les effets secondaires non graves attendus

Ils pourraient faire suite au prélèvement artériel :

Douleur au point de ponction

Hématome au point de ponction

Toutes les mesures sont prises pour éviter ces événements mineurs (pose d'un patch adhésif anesthésiant local 30 min avant le prélèvement artériel).

Conduite à tenir en cas d'évènement indésirable ou de fait nouveau

L'investigateur doit notifier au promoteur, sans délai à partir du jour où il en a connaissance, tout événement indésirable grave ou tout fait nouveau, s'il survient :

A partir de la date de signature du consentement,

Pendant toute la durée de suivi du patient prévue par la recherche,

Jusqu'à 10 jours après la fin du suivi du participant prévue par la recherche, lorsqu'il est susceptible d'être dû à la recherche.

| Type d'événement | Modalités de notification | Délai de notification au promoteur |
|------------------|---|--|
| EI non grave | Dans le cahier d'observation | Pas de notification immédiate |
| EIG attendu | Formulaire de déclaration d'EI grave initiale + rapport écrit si nécessaire | Notification immédiate au promoteur |
| EIG inattendu | Formulaire de déclaration d'EI grave initiale + rapport écrit si nécessaire | Notification immédiate au promoteur |
| Fait nouveau | Formulaire de déclaration + rapport écrit si nécessaire | Notification immédiate au promoteur |
| Grossesse | Formulaire de déclaration d'une grossesse | Dès confirmation de la grossesse |

Tableau 11 : Récapitulatif des notifications des événements indésirables dans le cadre de la recherche biomédicale

EI : événement indésirable

Tous ces événements devront être suivis jusqu'à la complète résolution. Un complément d'information (fiche de déclaration complémentaire) concernant l'évolution de l'événement, si elle n'est pas mentionnée dans le premier rapport, sera envoyée au promoteur par l'investigateur.

La survenue d'une grossesse dans la période ou au décours immédiat d'une recherche, ne constitue pas un événement indésirable grave. Cependant, une grossesse doit être notifiée selon les mêmes modalités qu'un événement indésirable grave car elle fera l'objet d'un suivi particulier jusqu'à son issue. Toute anomalie constatée sur le fœtus ou l'enfant sera alors notifiée. Toute interruption volontaire de grossesse, interruption médicale de grossesse ou fausse couche doit faire l'objet d'une notification de grossesse, et si elle a nécessité une hospitalisation, elle doit être transmise selon les mêmes modalités qu'un événement indésirable grave.

Déclaration et enregistrement des événements indésirables graves inattendus et des faits nouveaux

Le promoteur déclare sans délai les événements indésirables graves inattendus et les faits nouveaux survenus au cours de la recherche :

A l'AFSSAPS,

Au Comité de Protection des Personnes compétent. Le comité s'assure, si nécessaire, que les sujets participant à la recherche ont été informés des effets indésirables et qu'ils confirment leur consentement.

Aspects statistiques

Calcul de la taille d'étude

Dans cette étude pilote, l'objectif est de décrire la moyenne et la variabilité de la sérotonine plasmatique à différents stades d'évolution de l'hypertrophie ventriculaire en réponse au RAo serré. L'effectif habituel de 30 patients habituellement retenu pour les études pilotes a été majoré à 60 patients (15 patients dans 4 sous groupes de d'évolution croissante) afin de :

Pouvoir constituer quatre sous groupes définis par une réponse hypertrophique ventriculaire d'évolution croissante ;

Limiter la perte de précision des estimations dans chaque sous groupe.

Méthodes statistiques employées

Analyse des données

La cohérence des données sera vérifiée par des contrôles logiques. En cas d'erreurs, les données seront corrigées lorsque cela sera possible avant de geler la base de données.

Les variables mesurées seront décrites pour l'ensemble de la population par leur moyenne et écart type pour les variables quantitatives et leur effectif et pourcentage pour les variables qualitatives.

Pour répondre à l'objectif principal de l'étude, quatre sous groupes de d'évolution croissante de la réponse ventriculaire au RAo serré seront définis selon les quartiles de la distribution du RAo et de l'épaisseur ventriculaire. Les critères de jugement principaux et secondaires seront décrits par leur moyenne, leur écart type et l'intervalle de confiance de la moyenne dans ces sous groupes. Des graphiques de type « box plot » seront également réalisés.

En complément, une première estimation de la corrélation entre le taux de sérotonine et la surface du RAo ou de l'hypertrophie ventriculaire sera réalisée.

L'analyse sera réalisée sur le logiciel Stata 9.2 SE, par un ingénieur biostatisticien sous la responsabilité du méthodologiste.

Au sujet du facteur de dilution constitué par l'arbre artériel :

La comparaison sera faite entre la moyenne des concentrations au niveau de l'artère radiale et la moyenne des concentrations en sortie de valve aortique. Cette comparaison sera réalisée par un test apparié dans chacun des sous groupes (test de Student).

Droits d'accès aux données et documents source

Accès aux données

Le promoteur est chargé d'obtenir l'accord de l'ensemble des parties impliquées dans la recherche afin de garantir l'accès direct à tous les lieux de déroulement de la recherche, aux données source, aux documents source et aux rapports dans un but de contrôle de qualité et d'audit par le promoteur.

Les investigateurs mettront à disposition les documents et données individuelles strictement nécessaires au suivi, au contrôle de qualité et à l'audit de la recherche biomédicale, à la disposition des personnes ayant un accès à ces documents conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur (articles L.1121-3 et R.5121-13 du code de la santé publique).

Données source

Tout document ou objet original permettant de prouver l'existence ou l'exactitude d'une donnée ou d'un fait enregistrés au cours de la recherche est défini comme document source (Dossier médical, compte rendu échographique, cahier d'observation, ensemble du bilan pré-opératoire).

Confidentialité des données

Conformément aux dispositions législatives en vigueur (articles L.1121-3 et R.5121-13 du code de la santé publique), les personnes ayant un accès direct aux données source prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux médicaments expérimentaux, aux recherches, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus. Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel.

Pendant la recherche biomédicale ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent et transmises au promoteur par les investigateurs (ou tous autres intervenants spécialisés) seront rendues anonymes. Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse.

Le promoteur s'assurera que chaque personne qui se prête à la recherche a donné son accord par écrit pour l'accès aux données individuelles la concernant et strictement nécessaires au contrôle de qualité de la recherche.

Contrôle et assurance qualité

Consignes pour le recueil des données

Toutes les informations requises par le protocole doivent être consignées sur les cahiers d'observation et une explication doit être apportée pour chaque donnée manquante. Les données devront être recueillies au fur et à mesure qu'elles sont obtenues, et transcrites dans ces cahiers de façon nette et lisible.

Les données erronées relevées sur les cahiers d'observation seront clairement barrées et les nouvelles données seront copiées, à côté de l'information barrée, accompagnées des initiales, de la date et éventuellement d'une justification par l'investigateur ou la personne autorisée qui aura fait la correction.

Les données seront recueillies sur un cahier d'observation papier et informatique. L'ensemble des données du cahier d'observation sera considéré comme des données source.

Suivi de la recherche

Le suivi de la recherche sera assuré par un technicien de recherche clinique et les coordonnateurs de l'étude. Ils seront chargés, auprès de l'investigateur principal de :

La logistique et la surveillance de la recherche,

L'établissement des rapports concernant son état d'avancement,

La vérification de la mise à jour du cahier d'observation (demande d'informations complémentaires, corrections,...),

L'envoi des prélèvements,

La transmission des événements indésirables graves au promoteur.

Il travaillera conformément aux procédures opératoires standardisées, en collaboration avec l'attaché de recherche clinique délégué par le promoteur.

Contrôle de Qualité

Un attaché de recherche clinique mandaté par le promoteur visitera de façon régulière le centre investigateur, lors de la mise en place de la recherche, une ou plusieurs fois en cours de recherche selon le rythme des inclusions et en fin de recherche. Lors de ces visites, les éléments suivants seront revus :

Consentement éclairé,

Respect du protocole de la recherche et des procédures qui y sont définies,

Qualité des données recueillies dans le cahier d'observation : exactitude, données manquantes, cohérence des données avec les documents source (dossiers médicaux, carnets de rendez-vous, originaux des résultats de laboratoire, etc,...),

Gestion des produits éventuels.

Toute visite fera l'objet d'un rapport de monitoring par compte-rendu écrit.

Audit et inspection

Un audit peut être réalisé à tout moment par des personnes mandatées par le promoteur et indépendantes des responsables de la recherche. Il a pour objectif de s'assurer de la qualité de la recherche, de la validité de ses résultats et du respect de la loi et des réglementations en vigueur.

Les investigateurs acceptent de se conformer aux exigences du promoteur et à l'autorité compétente en ce qui concerne un audit ou une inspection de la recherche.

L'audit pourra s'appliquer à tous les stades de la recherche, du développement du protocole à la publication des résultats et au classement des données utilisées ou produites dans le cadre de la recherche.

Considérations éthiques

Le promoteur et les investigateurs s'engagent à ce que cette recherche soit réalisée en conformité avec la loi n°2004-806 du 9 août 2004, ainsi qu'en accord avec les Bonnes Pratiques Cliniques (décision du 24 novembre 2006) et la déclaration d'Helsinki (Principes éthiques applicables aux recherches médicales sur des sujets humains, Tokyo 2004).

La recherche est conduite conformément au présent protocole. Hormis dans les situations d'urgence nécessitant la mise en place d'actes thérapeutiques précis, les investigateurs s'engagent à respecter le protocole en tous points en particulier en ce qui concerne le recueil du consentement et la notification et le suivi des événements indésirables graves.

Cette recherche a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Ouest et Outre-Mer le 05/02/2010 et l'autorisation de l'AFSSAPS le 25/01/2010.

Le CHU de Toulouse, promoteur de cette recherche, a souscrit un contrat d'assurance en responsabilité civile auprès de la société GERLING conformément aux dispositions de l'article L1121-10 du code de la santé publique.

Les données enregistrées à l'occasion de cette recherche font l'objet d'un traitement informatisé dans le respect de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés modifiée par la loi 2004-801 du 6 août 2004.

Cette recherche entre dans le cadre de la « Méthodologie de référence » (MR-001) en application des dispositions de l'article 54 alinéa 5 de la loi du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'information, aux fichiers et aux libertés. Ce changement a été homologué par décision du 5 janvier 2006. Le CHU de Toulouse a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de référence ».

La collection d'échantillons biologiques réalisée dans le cadre de cette recherche a été déclarée à l'AFSSAPS en même temps que la demande d'autorisation de la recherche. Après la recherche, la conservation de la collection d'échantillons biologiques sera déclarée au ministre chargé de la recherche et au

directeur de l'Agence Régionale d'Hospitalisation (et soumise au Comité de Protection des Personnes pour avis si changement de finalité de recherche).

Amendement au protocole

Toute modification substantielle, c'est-à-dire toute modification de nature à avoir un impact significatif sur la protection des personnes, sur les conditions de validité et sur les résultats de la recherche, sur l'interprétation des documents scientifiques qui viennent appuyer le déroulement de la recherche ou sur les modalités de conduite de celle-ci, fait l'objet d'un amendement écrit qui est soumis au promoteur ; celui-ci doit obtenir, préalablement à sa mise en œuvre, un avis favorable du Comité de Protection des Personnes et une autorisation de l'AFSSAPS.

Les modifications non substantielles, sans impact significatif sur quelque aspect de la recherche que ce soit, sont communiquées au CPP à titre d'information.

Tous les amendements au protocole doivent être portés à la connaissance de tous les investigateurs qui participent à la recherche. Les investigateurs s'engagent à en respecter le contenu.

Traitement des données et conservation des documents et des données relatives à la recherche

Traitement des données

Les données sont saisies en simple saisie par l'attaché de recherche clinique.

La saisie est réalisée sur un tableur informatique Microsoft Excel, au sein du centre recruteur (Toulouse).

Les données sont validées conformément au plan de data management défini conjointement entre l'investigateur coordinateur et le Centre de Méthodologie et de Gestion des données (méthodologiste, data manager et statisticien).

Le processus de gel/dégel des données est réalisé conformément à la procédure mise en place dans le Centre de Méthodologie et de Gestion des données. L'ensemble des données est sauvegardé chaque soir.

Conservation des documents relatifs à la recherche

Les documents suivants relatifs à cette recherche sont archivés conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques :

Par les médecins investigateurs :

Pour une durée de 15 ans suivant la fin de la recherche

Le protocole et les amendements éventuels au protocole

Les cahiers d'observation

Les dossiers source des participants ayant signé un consentement

Tous les autres documents et courriers relatifs à la recherche

Pour une durée de 30 ans suivant la fin de la recherche

L'exemplaire original des consentements éclairés signés des participants

Tous ces documents sont sous la responsabilité de l'investigateur pendant la durée réglementaire d'archivage.

Par le promoteur :

Pour une durée de 15 ans suivant la fin de la recherche

Le protocole et les amendements éventuels au protocole

L'original des cahiers d'observation

Tous les autres documents et courriers relatifs à la recherche

Pour une durée de 30 ans suivant la fin de la recherche

Un exemplaire des consentements éclairés signés des participants

Tous ces documents sont sous la responsabilité du promoteur pendant la durée réglementaire d'archivage.

Aucun déplacement ou destruction ne pourra être effectué sans l'accord du promoteur. Au terme de la durée réglementaire d'archivage, le promoteur sera consulté pour destruction. Toutes les données, tous les documents et rapports pourront faire l'objet d'audit ou d'inspection.

Règles relatives à la publication

Communications scientifiques

L'analyse des données fournies par les centres investigateurs est réalisée par CHU de Toulouse et l'INSERM. Cette analyse donne lieu à un rapport écrit qui est soumis au promoteur, qui transmettra au CPP et à l'autorité compétente.

Toute communication écrite ou orale des résultats de la recherche doit recevoir l'accord préalable de l'investigateur principal et, le cas échéant, de tout comité constitué pour la recherche.

La publication des résultats principaux mentionne le nom du promoteur, de tous les investigateurs ayant inclus ou suivi des patients dans la recherche, des méthodologistes, biostatisticiens et data managers ayant participé à la recherche, des membres du(des) comité(s) constitué(s) pour la recherche, la source de financement. Il sera tenu compte des règles internationales d'écriture et de publication (Convention de Vancouver, février 2006).

Communication des résultats aux patients

Conformément à la loi n°2002-303 du 4 mars 2002, les patients sont informés, à leur demande, des résultats globaux de la recherche.

Cession des données

Le recueil et la gestion des données sont assurés par le CHU de Toulouse. Les conditions de cession de tout ou partie de la base de données de la recherche sont décidées par le promoteur de la recherche et font l'objet d'un contrat écrit.

Conclusion

L'étude SERAOPI nous permettra de mieux comprendre les effets des taux de sérotonine circulante sur la réponse hypertrophique du myocarde à la surcharge barométrique. L'étude de l'activation plaquettaire au cours du rétrécissement aortique nous permettra de préciser son rôle dans la régulation des taux circulants de sérotonine.

Conclusion générale

Les résultats de nos travaux, réalisés sur un modèle murin, démontrent l'influence de la sérotonine dans le remodelage ventriculaire qui accompagne la surcharge barométrique et mène à l'IC.

Nos travaux démontrent que, chez la souris :

1/ L'augmentation des taux circulants de sérotonine s'accompagne d'une augmentation de la réponse hypertrophique à la surcharge barométrique.

2/ Cette augmentation de la réponse hypertrophique ventriculaire induite par la sérotonine en réponse à la surcharge barométrique présente les stigmates histologiques et moléculaires du remodelage ventriculaire, sous la forme d'une augmentation de la fibrose interstitielle et d'une réexpression du programme génétique fœtal, mais ne s'accompagne pas de dysfonction systolique ventriculaire.

3/ Cette augmentation de la réponse hypertrophique ventriculaire induite par la sérotonine en réponse à la surcharge barométrique est médiée par son récepteur 5-HT_{2A}.

4/ En conditions de surcharge barométrique, l'inhibition du récepteur 5-HT_{2A} en prévenant l'apparition d'une hypertrophie concentrique favorise le développement d'une hypertrophie excentrique avec dysfonction systolique ventriculaire.

Si le rôle de la sérotonine dans le remodelage ventriculaire au cours de l'IC est maintenant prouvé, ses effets, bénéfiques ou délétères, restent encore incertains. Nos travaux démontrent le rôle central du récepteur 5-HT_{2A} dans l'apparition d'une hypertrophie concentrique adaptative au cours de la surcharge barométrique en ralentissant l'évolution vers la dysfonction systolique ventriculaire. Pourtant, les précédents travaux du laboratoire ont démontrés le rôle du récepteur 5-HT_{2A} dans l'activation des fibroblastes cardiaques [191] qui jouent un rôle central au cours du remodelage ventriculaire. L'ensemble de ces résultats suggère que les médiateurs de l'hypertrophie ventriculaire et de la dysfonction systolique qui accompagnent le remodelage ventriculaire empruntent deux voies de signalisation différentes. De récents travaux confirment la dualité des voies de signalisations qui mènent à une hypertrophie adaptative ou maladaptative [225]. Ainsi, au cours de la surcharge barométrique, le récepteur 5-HT_{2A} favoriserait l'apparition d'une hypertrophie concentrique adaptative, riche en fibrose, bénéfique en permettant la normalisation de la contrainte pariétale, indépendamment de l'apparition d'une dysfonction

systolique ventriculaire qui emprunterait une voie de signalisation autonome. Les données de la littérature suggèrent que la voie de signalisation aboutissant à l'apparition d'une hypertrophie excentrique maladaptative avec dysfonction systolique puisse emprunter la voie de la MAO-A et du stress oxydant [188]. Ainsi, ces données, en accord avec les précédents résultats du laboratoire, impliqueraient un effet dose-dépendant de la sérotonine sur le remodelage ventriculaire [138, 189] : à faible dose, la sérotonine aurait un effet bénéfique en favorisant une hypertrophie concentrique adaptative médiée par son récepteur 5-HT_{2A} ; à forte dose, elle aurait un effet délétère en participant au développement d'une hypertrophie excentrique maladaptative avec dysfonction systolique ventriculaire, via le stress oxydant secondaire à sa dégradation par la MAO-A. Cette hypothèse est renforcée par les récents travaux du laboratoire qui démontrent que la surexpression de la MAO-A aboutit à l'apparition d'une dilatation ventriculaire avec dysfonction systolique médiée par le stress oxydant [226]. Cette deuxième voie de signalisation deviendrait effective dans des conditions d'augmentation importante des concentrations de sérotonine, modulées par l'activation plaquettaire, source principale de sérotonine, et impliquant les voies de l'apoptose [152] et de la nécrose [226] à l'origine de la transition d'une hypertrophie adaptative vers une hypertrophie maladaptative [50, 51]. Ainsi, l'augmentation linéaire des concentrations de sérotonine au cours de la progression de l'IC participerait à la progression du remodelage ventriculaire et à l'auto-entretien de la maladie.

De façon à mieux préciser la place du récepteur 5-HT_{2A} dans les effets récepteurs-dépendants de la sérotonine au cours du remodelage ventriculaire induit par la surcharge barométrique, nos travaux actuels se concentrent sur l'étude de l'évolution de paramètres histologiques (hypertrophie des cardiomyocytes, fibrose interstitielle, apoptose et nécrose) et moléculaires (réexpression du programme génétique fœtal) à long terme après inhibition du récepteur 5-HT_{2A} et en fonction des taux circulants de sérotonine. En effet, suivant l'hypothèse d'un effet dose dépendant de la sérotonine et d'une dualité des voies de signalisation contrôlant hypertrophie adaptative via le récepteur 5-HT_{2A} et maladaptative via le stress oxydant, nous souhaitons préciser la place du récepteur 5-HT_{2A} dans la prévention de l'évolution vers l'IC au cours de la surcharge barométrique. Si les effets bénéfiques du récepteur 5-HT_{2A} sur le phénotype cardiaque semblent maintenant prouvés, les voies de signalisation empruntées restent encore méconnues. Certains travaux suggèrent que l'effet bénéfique de l'hypertrophie médiée par le récepteur 5-HT_{2A} au cours du

remodelage ventriculaire puisse passer par un effet inotrope positif [146, 147]. D'autres travaux plus récents démontrent que le récepteur 5-HT_{2A} est capable d'induire une réponse de survie cellulaire en améliorant les performances mitochondriales [227], et laissent penser qu'il pourrait ralentir la destruction cellulaire qui accompagne la transition vers l'IC. Nos prochains travaux s'attacheront à compléter ces données en utilisant un modèle déjà existant de souris inactivées pour le récepteur 5-HT_{2A} [228] et en développant un modèle de souris surexprimant le récepteur 5-HT_{2A} de façon à étudier leur phénotype cardiaque en conditions basales et après surcharge barométrique.

Comme l'ont démontré les précédents travaux du laboratoire, les effets du récepteur 5-HT_{2A} au niveau cardiaque peuvent être médiés par des cellules non myocytaires comme les cardiofibroblastes. Nos futurs travaux s'attacheront à développer un modèle de souris inactivées pour le récepteur 5-HT_{2A} de façon sélective au niveau des cardiomyocytes pour en étudier les effets sur le remodelage ventriculaire.

Enfin, nos travaux et les données de la littérature suggèrent que l'activation du système sérotoninergique pourrait avoir des effets bénéfiques jusqu'alors méconnus. La description et la compréhension des effets récepteurs-dépendants et récepteurs-indépendants de la sérotonine sur le remodelage ventriculaire devrait permettre d'isoler de nouvelles cibles thérapeutiques adaptées aux concentrations plasmatiques en sérotonine, reflet du degré d'évolution de l'IC. Les sources de sérotonine au cours de l'insuffisance cardiaque restent à préciser. Les données physiopathologiques de la littérature laissent penser que l'activation plaquettaire puisse avoir un rôle majeur dans la régulation des taux circulants de sérotonine. Pourtant, aucune donnée, à notre connaissance, ne permet d'exclure la possibilité d'une synthèse locale intra-cardiaque de sérotonine. L'étude SERAOPI devrait permettre d'améliorer la compréhension du rôle de l'activation plaquettaire dans la régulation des taux de sérotonine plasmatique et sur ses effets sur le myocarde. Ainsi, la prise en charge pharmacologique de l'IC devrait s'orienter dans l'avenir vers le développement de thérapeutiques ciblées adaptées au degré d'activation des systèmes d'adaptation neuro-hormonaux et au stade d'évolution de la maladie.

Annexe 1 :

Compléments d'étude SERAOPI

Annexe 1A : Tableau récapitulatif des traitements interdits au cours de l'étude SERAOPI

| Nom commercial | DCI |
|-----------------------|---------------------|
| Abilify | Aripiprazole |
| Almogran | Almotriptan |
| Anafranil | Clomipramine |
| Anzemet | Dolasetron |
| Athymil | Minaserine |
| Avonex | Interferon β |
| Betferon | Interferon β |
| Defanyl | Amoxapine |
| Deroxat | Paroxetine |
| Desernil | Methysergide |
| Diergospray | Dihydroergotamine |
| Effexor | Venlaxatine |
| Elavil | Amitriptyline |
| Floxyfral | Fluvoxamine |
| Gynergène Caféine | Ergotamine |
| Ikaran | Dihydroergotamine |
| Imigrane | Sumatriptine |
| Infergen | Interferon α |
| Intron A | Interferon α |
| Ixel | Milnacipram |
| Kytril | Granisetron |
| Leponex | Clozapine |
| Ludiomil | Maprotilin |
| Marsilid | Iproniazide |
| Migwell | Ergotamine |
| Moclamine | Moclobemide |
| Naramig | Naratriptan |

| | |
|---------------|---------------------|
| Navoban | Tropisetron |
| Nocertone | Oxétoron |
| Norset | Mirtazapine |
| Pegasys | Interferon α |
| Pertofran | Despiramine |
| Prothiadem | Dosulépine |
| Prozac | Fluoxétine |
| Quitaxon | Doxépine |
| Rebif | Interferon β |
| Relpax | Eletriptan |
| Risperdal | Risperidone |
| Roferon-A | Interferon α |
| Sanmigran | Pizotifene |
| Séglor | Dihydroergotamine |
| Séropram | Citalopram |
| Sibélium | Flunarizine |
| Stablon | Tianeptine |
| Surmontil | Trimipramine |
| Tamik | Dihydroergotamine |
| Tofranil | Imipramine |
| Vidora | Indoramine |
| Viraferon | Interferon α |
| Viraferon PEG | Interferon α |
| Vivalan | Viloxazine |
| Zoloft | Sertraline |
| Zomig | Zolmitriptan |
| Zomigoro | Zolmitriptan |
| Zophren | Ondansétron |
| Zyprexa | Olanzapine |

Annexe 1B : Technique de dosage HPLC dans l'étude SERAOPi**Dosage de sérotonine (5-HT) sanguine ou plaquettaire**

La mesure des concentrations de sérotonine sanguine (correspondant à 99% de sérotonine plaquettaire et 1% de sérotonine plasmatique) est réalisée en aveugle par une méthode de HPLC avec détection coulométrique [229].

Elle s'effectue à partir d'un échantillon de 250 µL de sang total après une étape de lyse des éléments figurés du sang par congélation/décongélation. Après ajout d'un étalon interne (N-méthyl-5OH tryptamine), 0,5 mL d'acide ascorbique et d'un tampon basique, une première extraction liquide/liquide est réalisée avec 8 mL de milieu organique. Après centrifugation (3000g, 5 minutes) une ré-extraction liquide/liquide du milieu organique est réalisée par 0,5 mL de tampon acide.

Le système comprend une colonne (Symmetry, C₁₈, 25 cm x 4,6 mm) et un détecteur électrochimique coulométrique ESA (Eurosep) équipé d'une cellule analytique duale (5011) appliquant deux potentiels d'oxydation. La phase mobile est un mélange d'un tampon acide composé de KH₂PO₄ – acide citrique et d'acétonitrile et est utilisée à un débit de 1.0 mL/min.

La méthode de détection consiste à appliquer un double potentiel d'oxydation afin de travailler sur une fenêtre de potentiels ce qui accroît la sélectivité de la détection. Ceci permet d'éliminer au maximum les interférences dues à toutes les molécules présentes dans le milieu sanguin. Vingt µL d'échantillon sont injectés dans le système chromatographique. Les courbes de calibration sont préparées avec 250 µL de sang humain reconstitué à partir de concentrés d'érythrocytes (périmés, fournis par l'établissement Français du sang) aux quels est ajouté du plasma filtré dépourvu de plaquettes. Les courbes de calibration sont effectuées en utilisant le rapport hauteur du pic de sérotonine / hauteur du pic d'étalon interne. Il existe une relation linéaire entre les rapports des hauteurs de pic et les concentrations de sérotonine (la gamme utilise des concentrations de 20 à 400 ng/mL (r= 0.999)). Toutes les concentrations sont exprimées en pmol/mL ou nmol/L et ng/mL. Les valeurs usuelles de sérotonine sanguine sont de 250 à 1400 pmol/mL ou nM (ou 45 à 250 ng/mL). Le taux de sérotonine peut être rapporté par 10⁹ plaquettes.

Les coefficients de variation intra-essai de la mesure de la sérotonine sanguine sont de 2,6%, 1,4 % et 0,8 % pour 7,8 ng/mL, 113 ng/mL et 250 ng/mL (44,

640 et 1420 nM), (n = 6) respectivement. Les coefficients de variation inter-essai de la mesure de la sérotonine sanguine sont de 1,9 %, 3,9 % et 5,5 % pour 142, 640 et 1420 nM (n = 6) respectivement.

Le coefficient d'extraction pour la sérotonine sanguine est de 84 % et celui de l'étalon interne de 87 %. Un contrôle de qualité interne est testé lors de chaque série de dosage.

Le taux minimum quantifiable est de 2,5 ng/mL (concentration théorique) donnant une concentration mesurée de $2,32 \pm 0,16$ ng/mL (n=6) avec un coefficient de variation intra-essai de 6,9 %. La précision des concentrations mesurées des points de calibration est indiquée par des coefficients de variation de 2,5 %, 1.5 %, 1,7 %, 0,5 %, 2 %, et 1,6 % pour 20 ng/mL (n=5), 40 ng/mL (n=7), 100 ng/mL (n=7), 200 ng/mL (n=7), 300 ng/mL (n=7) et 400 ng/mL (n=5) respectivement.

Les temps de rétention sont de 8,0 min pour la sérotonine et de 9,6 min pour l'étalon interne.

Dosage de la sérotonine libre plasmatique

Le prélèvement est laissé à température ambiante depuis le prélèvement jusqu'à la centrifugation. Deux centrifugations sont nécessaires à température ambiante, la première à 3000 rpm pendant 5 minutes, la deuxième à 10 000 rotations par minute (rpm) pendant 10 minutes. Le plasma récupéré est stocké à -80° C.

Le dosage de la sérotonine plasmatique libre s'effectue dans les mêmes conditions que le dosage de la sérotonine sanguine (plaquettaire) excepté le volume d'échantillon qui est de 1mL de plasma et l'étalon interne. La gamme s'effectue à partir d'1 mL de tampon phosphate buffered saline ; elle se situe de 0,1 à 10 ng/mL. La phase mobile est utilisée à un débit de 1,1 mL/min.

Les valeurs fréquentes (normales) du laboratoire pour la sérotonine plasmatique sont de 0,3 à 3 ng/mL (2 à 20 nM).

Les coefficients de variation intra-essai de la mesure de la sérotonine plasmatique sont de 2,6% et de 2 % pour 1,3 ng/mL (n = 6) et 5,8 ng/mL (n=6) ou 7,4 et 33 nM respectivement. Les coefficients de variation inter-essai de la mesure de la

sérotonine plasmatique sont de 12,5 % et 9,6 % pour 1,3 ng/mL (n = 6) et 5,8 ng/mL (n=6) ou 7,4 et 33 nM respectivement.

Les coefficients d'extraction pour la sérotonine plasmatique sont de 95,4 % et de 98,9 % pour l'étalon interne. Un contrôle de qualité interne est testé lors de chaque série de dosage.

Le taux minimum quantifiable est de 0,1 ng/mL (concentration théorique) donnant une concentration mesurée de $0,11 \pm 0,01$ ng/mL (n=6) avec un coefficient de variation intra-essai de 6,7 %. La précision des standards de calibration est indiquée par des coefficients de variation de 8,1 %, 2,6 %, 5,4 %, 2,1 %, 1,5% et 1 %, pour 0,2 ng/mL (n=7), 0,5 ng/mL (n=7), 1 ng/mL (n=7), 2 ng/mL (n=7), 5,0 ng/mL (n=7) et 10 ng/mL (n=7) respectivement.

Les temps de rétention sont de 7,0 minutes pour la sérotonine plasmatique et de 12,0 minutes pour l'étalon interne.

Dosage de 5-HIAA plasmatique

Les dosages de 5-HIAA et d'acide homovanillique (HVA) s'effectuent simultanément.

La mesure des concentrations de 5-HIAA et d'HVA plasmatiques a été réalisée en aveugle par une méthode de chromatographie liquide haute performance avec détection coulométrique [230]. Elle est réalisée à partir d'un échantillon plasmatique de 500 μ L après ajout d'un étalon interne par une extraction liquide/liquide en milieu acide avec de l'éther. Après évaporation de la phase organique (éther), l'extrait est repris dans un tampon acide.

Le système comprend une colonne Hypersil BDS C₁₈, (150 x 4,6, 5 μ m; phase stationnaire) et un détecteur électrochimique coulométrique ESA (Eurosep) équipé d'une cellule analytique duale (5011), appliquant deux potentiels d'oxydation l'un pour la détection du 5-HIAA et l'autre pour la détection de l'HVA. La phase mobile est un mélange d'un tampon acide composé de KH₂PO₄ et d'acide citrique et d'une phase organique composée d'un mélange de méthanol et d'acétonitrile, utilisée à un débit de 1.2 mL/min.

La méthode de détection consiste à appliquer un double potentiel d'oxydation afin de travailler sur une fenêtre de potentiels ce qui accroît la sélectivité de la détection. Ceci permet d'éliminer au maximum les interférences dues à toutes les molécules présentes dans le plasma sanguin.

Trente μL d'échantillon sont injectés dans le système chromatographique. Les courbes de calibration sont effectuées en utilisant le rapport hauteur du pic du paramètre à doser / hauteur du pic d'étalon interne. La gamme utilise des concentrations de 21 à 158 pmol/mL pour le 5-HIAA ($r= 0.999$). Toutes les concentrations sont exprimées en pmol/mL. Un contrôle de qualité interne est testé lors de chaque série de dosage.

Les coefficients de variation inter-essai de la mesure du 5-HIAA plasmatique sont de 14 % et 11,2 % pour des concentrations de 30 pmol/mL et 105 pmol/mL ($n = 10$) respectivement.

Le taux minimum quantifiable est de 1 ng/mL ou 5 pmol/mL.

Les valeurs fréquentes (normales) sont de 4 à 15 ng/mL ou 20 à 80 pmol/mL pour le 5-HIAA plasmatique.

Le temps de rétention est de 11,0 min pour le 5-HIAA, 12,0 min pour l'étalon interne.

Annexe 1C : Protocole de traitement, de congélation et de stockage des prélèvements dans l'étude SERAOPi

| Ordre | Etape 1 | Etape 2 | Etape 3 | Etape 4 | Etape 5 | Etape 6 |
|---|--|--|--|--|--|--|
| Type de prélèvement | ARTERIEL 1 tube EDTA sec (bouchon parme translucide) | ARTERIEL 1 tube EDTA (bouchon parme) | ARTERIEL 1 tube citrate de sodium (bouchon bleu ciel) | ARTERIEL 2 tubes citrate de sodium (bouchon bleu ciel) | ARTERIEL CATHETER 1 tube EDTA sec (bouchon parme translucide) | VEINEUX 1 tube EDTA (bouchon parme) |
| Paramètres concerné | Sérotonine plaquettaire | 5 HIAA | Sérotonine plasmatique | Activation plaquettaire | Sérotonine plaquettaire sur cathéter pendant l'angiocoronarographie | NFS Sérologie |
| Mode opératoire | Ne pas traiter Sang total | Centrifugation à 3000g pendant 10 min | Centrifugation immédiate à 3000g pendant 5min à Température ambiante Récupération délicate des 2/3 supérieurs du surnageant (sans plaquettes sinon recentrifuger) Transfert du plasma dans un cône Ependorf de 1,5ml pour Recentrifugation à 3000g pendant 5 min à température ambiante Récupération délicate de la partie supérieure sans culot (laisser qq ml) | Ne pas traiter, Ne pas mettre au frigo, Ne pas congeler, Laisser à température ambiante | Ne pas traiter Sang total | Ne pas traiter Sang total |
| Codification NP=Nom et Prénom investigateur | date Artériel NP G1, 2, 3 ou 4 n°sujet : 3 | date Artériel NP G1, 2, 3 ou 4 n°sujet : 2 | date Artériel NP G1, 2, 3 ou 4 n°sujet : 1 | date Artériel NP G1, 2, 3 ou 4 n°sujet: « PQT 1 » et « PQT2 » | date Artériel cathéter NP G 2, 3 ou 4 n°sujet : « CATH » | Date Veineux NP G1 n°sujet « NFS » |
| Tube de transfert Stockage | Pas de transfert -80°C congélateur service | Cryotube -80°C congélateur service | Cryotube -80°C congélateur service | Pas de transfert Température ambiante | Pas de transfert -80°C congélateur service | Pas de transfert Température ambiante |
| Laboratoire destinataire | Toxicologie (Le Chesnay) | Toxicologie (Le Chesnay) | Toxicologie (Le Chesnay) | Hémostase Purpan TLSE Délai max 4h | Toxicologie (Le Chesnay) | Hémostase Purpan TLSE Délai max 4h |

Annexe 2 :

Autres publications

STEM CELLS®

TISSUE-SPECIFIC STEM CELLS

Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion By Cardiac Fibroblasts And Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis After Myocardial Infarction

Céline Mias^{1,2}, Olivier Lairez^{1,2}, Elodie Trouche^{1,2}, Jérôme Roncalli¹, Denis Calise³, Marie-Hélène Seguelas¹, Catherine Ordener¹, Marie-Dominique Piercecchi-Marti⁴, Nathalie Auge¹, Anne Negre Salvayre¹, Philippe Bourin⁵, Angelo Parini^{1,2#}, and Daniel Cussac^{1,2}

¹INSERM, U858, F-31432, Toulouse, France; ²Université de Toulouse; UPS; Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil; F-31432 Toulouse, France; ³INSERM, Zootechny Department of Experimental Micro-Surgery, Toulouse, France; ⁴UMR-S 608 INSERM- Université de la Méditerranée, Marseille, France; ⁵EFS, Laboratoire de thérapie cellulaire, Toulouse, France

Key words. Mesenchymal stem cells - Cardiac fibroblasts - Matrix metalloproteinases - Myocardial infarction - Therapeutic efficacy

ABSTRACT

Recent studies showed that mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation significantly decreased cardiac fibrosis. However, the mechanisms involved in these effects are still poorly understood. In this work, we investigated whether the antifibrotic properties of MSCs involve the regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and matrix metalloproteinase endogenous inhibitor (TIMPs) production by cardiac fibroblasts.

In vitro experiments showed that conditioned medium from MSCs decreased viability, alpha-SMA expression and collagen secretion of cardiac fibroblasts. These effects were concomitant to the stimulation of MMP-2/MMP-9 activities and MT1-MMP expression. Experiments performed with fibroblasts from MMP2^{-/-} mice demonstrated that

MMP2 plays a preponderant role in preventing collagen accumulation upon incubation with conditioned-medium from MSCs. Interestingly, we found that MSC-conditioned medium also decreased the expression of TIMP2 in cardiac fibroblasts. *In vivo* studies showed that intracardiac injection of MSCs in a rat model of post-ischemic heart failure induced a significant decrease in ventricular fibrosis. This effect was associated with the improvement of morphological and functional cardiac parameters.

In conclusion, we showed that MSCs modulate the phenotype of cardiac fibroblasts and their ability to degrade extracellular matrix. These properties of MSCs open new perspective for understanding of the mechanisms of action of MSCs and anticipate their potential therapeutic or side effects.

INTRODUCTION

Despite progresses in pharmacological and surgical approaches, post-infarction heart failure remains the major cause of

cardiovascular morbidity and mortality in developed countries. Myocardial infarction results in a significant loss of cardiomyocytes replaced by a fibrotic and akinetic tissue forming a permanent scar. Structural changes

Author contributions: C.M.: Conception and design, Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing; O.L.: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation; E.T.: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation; J.R.: Conception and design; D.Calise: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation; M.-H.S.: Collection and/or assembly of data; C.O.: Collection and/or assembly of data; M.-D. P.-M.: Collection and/or assembly of data; N.A.: Collection and/or assembly of data; A.N.S.: Collection and/or assembly of data; P.B.: Conception and design, Provision of study material or patients; A.P.: Conception and design, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript, Financial support; D.Cussac Conception and design, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript.

corresponding author: Angelo Parini, I2MR, INSERM U858, CHU Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Email: angelo.parini@inserm.fr, Tel: 33-5-61-32-36-01, FAX: 33-5-62-17-25-54, Acknowledgments: This work was supported in part by the INSERM and grants from the National Research Agency (ANR) (Grant under program Physiopathologie des Maladies Humaines, project SYNMESCARI), the Région Midi-Pyrénées and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Received March 09, 2009; accepted for publication June 28, 2009. ©AlphaMed Press 1066-5099/2009/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.169



Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy

Camille Foussal^{a,b}, Olivier Lairez^a, Denis Calise^d, Atul Pathak^{a,b}, Celine Guilbeau-Frugier^c, Philippe Valet^{a,b}, Angelo Parini^{a,b}, Oksana Kunduzova^{a,b,*}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U858, Toulouse, Cedex 4, France

^b Université de Toulouse, UPS, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, IFR150, BP84225, Toulouse, France

^c Service d'Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie, CHU Rangueil-Larrey, France

^d Service de Microchirurgie Expérimentale, IFR150 Rangueil, BP84225, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2010

Revised 9 April 2010

Accepted 9 April 2010

Available online 14 April 2010

Edited by Vladimir Skulachev

Keywords:

Oxidative stress

Hypertrophy

Apelin

Cardiomyocyte

Pressure overload

Catalase

ABSTRACT

Adipose tissue secretes a variety of bioactive factors, which can regulate cardiomyocyte hypertrophy via reactive oxygen species (ROS). In the present study we investigated whether apelin affects ROS-dependent cardiac hypertrophy. In cardiomyocytes apelin inhibited the hypertrophic response to 5-HT and oxidative stress induced by 5-HT- or H₂O₂ in a dose-dependent manner. These effects were concomitant to the increase in mRNA expression and activity of catalase. Chronic treatment of mice with apelin attenuated pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy. The prevention of hypertrophy by apelin was associated with increased myocardial catalase activity and decreased plasma lipid hydroperoxide, as an index of oxidative stress. These results show that apelin behaves as a catalase activator and prevents cardiac ROS-dependent hypertrophy.

© 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiac hypertrophy represents a typical feature of various cardiomyopathies including ischemic heart disease and hypertension. Cardiomyocyte hypertrophy is induced by a variety of factors such as mechanical load [1–3] and neurohumoral factors [4–6]. Among humoral factors, adipocyte-derived angiotensin II and leptin have recently attracted great attention, because of its role in the development and progression of left ventricular hypertrophy [7–10]. We have described a novel adipokine, produced and secreted by human and mouse adipocytes, apelin [11]. This bioactive peptide is the endogenous ligand of the orphan G protein-coupled receptor, APJ, affecting many biological functions in the neuroendocrine, cardiovascular, and immune systems [12–14]. Apelinergic signalling

pathway is widely represented in the heart and vasculature, and is emerging as an important regulator of cardiac function [15]. In skeletal muscle apelin has been shown to stimulate endothelial nitric oxide synthase [16]. In preclinical models, apelin causes nitric oxide-dependent vasodilatation and increases cardiac contractility in rats with normal and failing hearts [17–19]. Apelin/APJ signalling also attenuates ischemic myocardial injury and maintains cardiac performance in aging pressure overload [20–22]. Downregulation of apelin and APJ expression coincides with declining cardiac performance raising the possibility that diminished apelin/APJ activity may have pathophysiologic implications [23]. Although studies in animal models and humans suggest that cardiac failure results in an altered balance of apelin and APJ expression, the regulatory mechanisms for apelinergic system in failing heart are not fully investigated.

Reactive oxygen species (ROS) have emerged as key mediators of hypertrophic remodeling and cardiac dysfunction. In cardiomyocytes, excessive ROS generation has been shown to mediate the hypertrophic response to stretch [24] or other hypertrophic stimuli, such as endothelin-1 [25], angiotensin II [26], tumor necrosis factor- α (TNF- α) [27] and leptin [28]. We have previously demonstrated that serotonin (5-HT) induces hypertrophic growth in cardiomyocytes via an intracellular signalling pathway involving monoamine oxidase (MAO) A-dependent hydrogen peroxide

Abbreviations: 5-HT, serotonin; ROS, reactive oxygen species; H₂O₂, hydrogen peroxide; MAO, monoamine oxidase; DCF-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; AB, aortic banding; GPx, glutathione peroxidase; LPO, lipid hydroperoxide; FCS, fetal calf serum; ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; α - and β -MHC, α - and β -myosin heavy chain; α -SK-actin, α -skeletal actin; PBS, phosphate buffered saline; IVST, interventricular septal wall thickness; LVPWT, left ventricular posterior wall thickness; HW, heart weight; BW, body weight

* Corresponding author at: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U858, Toulouse, Cedex 4, France.

E-mail address: Oksana.Kunduzova@inserm.fr (O. Kunduzova).



Références bibliographiques

- [1] Gaziano JM. Global Burden of Cardiovascular Disease. In: Elsevier S, editor. Braunwald's Heart Disease. 8th ed; 2008, p. 1-22.
- [2] Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007 Sep; 93(9): 1137-46.
- [3] Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J*. 2008 Oct; 29(19): 2388-442.
- [4] Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2001 Jun; 3(3): 315-22.
- [5] Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 2002 Oct 31; 347(18): 1397-402.
- [6] Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*. 2005 May 31; 111(21): 2837-49.
- [7] Floras JS. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jul 28; 54(5): 375-85.
- [8] Bylund D, Bond R, Clarke D. Adrenoceptors. *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*. 1998: 58-74.
- [9] Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1994 Jun; 46(2): 121-36.
- [10] Skeberdis VA, Gendviliene V, Zablockaitė D, Treinys R, Macianskiene R, Bogdelis A, et al. beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca²⁺ current. *J Clin Invest*. 2008 Sep; 118(9): 3219-27.
- [11] Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, Graham RM. Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res*. 2008 Feb 1; 77(3): 452-62.
- [12] Shannon R, Chaudhry M. Effect of alpha1-adrenergic receptors in cardiac pathophysiology. *Am Heart J*. 2006 Nov; 152(5): 842-50.
- [13] Mann DL. Pathophysiology of Heart Failure. In: Elsevier S, editor. Braunwald's Heart Disease. 8th ed; 2008, p. 541-60.
- [14] Weber KT. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med*. 2001 Dec 6; 345(23): 1689-97.
- [15] Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med*. 1999 Aug 19; 341(8): 577-85.
- [16] Tang WH, Bhavnani S, Francis GS. Vasopressin receptor antagonists in the management of acute heart failure. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 May; 14(5): 593-600.
- [17] Lim M, Honisett S, Sparkes CD, Komesaroff P, Kompa A, Krum H. Differential effect of urotensin II on vascular tone in normal subjects and patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2004 Mar 16; 109(10): 1212-4.
- [18] Rademaker MT, Richards AM. Cardiac natriuretic peptides for cardiac health. *Clin Sci (Lond)*. 2005 Jan; 108(1): 23-36.
- [19] Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(10): 2023-39.

- [20] Sharma JN. Cardiovascular activities of the bradykinin system. *ScientificWorldJournal*. 2008; 8: 384-93.
- [21] Rademaker MT, Cameron VA, Charles CJ, Lainchbury JG, Nicholls MG, Richards AM. Adrenomedullin and heart failure. *Regul Pept*. 2003 Apr 15; 112(1-3): 51-60.
- [22] Mann DL. Left ventricular size and shape: determinants of mechanical signal transduction pathways. *Heart Fail Rev*. 2005 Jun; 10(2): 95-100.
- [23] Houser SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res*. 2003 Mar 7; 92(4): 350-8.
- [24] Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Aug; 7(8): 589-600.
- [25] Sanna B, Bueno OF, Dai YS, Wilkins BJ, Molkentin JD. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb; 25(3): 865-78.
- [26] Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res*. 2002 Nov 1; 91(9): 776-81.
- [27] Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998 Apr 17; 93(2): 215-28.
- [28] Liang Q, Bueno OF, Wilkins BJ, Kuan CY, Xia Y, Molkentin JD. c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *Embo J*. 2003 Oct 1; 22(19): 5079-89.
- [29] Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, et al. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest*. 2003 May; 111(10): 1475-86.
- [30] Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, et al. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 22; 99(2): 907-12.
- [31] Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Aug; 37(2): 449-71.
- [32] McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14; 100(21): 12355-60.
- [33] Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, et al. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*. 2002 Sep 20; 110(6): 737-49.
- [34] Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, et al. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. 2004 Aug 6; 118(3): 375-87.
- [35] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002 May 31; 296(5573): 1655-7.
- [36] DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*. 2006 May 2; 113(17): 2097-104.
- [37] Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*. 2005 Aug; 115(8): 2108-18.
- [38] Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004 Aug 15; 63(3): 403-13.

- [39] Nassar R, Malouf NN, Mao L, Rockman HA, Oakeley AE, Frye JR, et al. cTnT1, a cardiac troponin T isoform, decreases myofilament tension and affects the left ventricular pressure waveform. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Mar; 288(3): H1147-56.
- [40] Ferrans VJ. Morphology of the heart in hypertrophy. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1983 Jul; 18(7): 67-78.
- [41] Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999 Oct 21; 341(17): 1276-83.
- [42] Deschamps AM, Spinale FG. Matrix modulation and heart failure: new concepts question old beliefs. *Curr Opin Cardiol*. 2005 May; 20(3): 211-6.
- [43] Lopez B, Gonzalez A, Varo N, Laviades C, Querejeta R, Diez J. Biochemical assessment of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2001 Nov; 38(5): 1222-6.
- [44] Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res*. 2002 Mar 22; 90(5): 520-30.
- [45] Grieve DJ, Shah AM. Oxidative stress in heart failure. More than just damage. *Eur Heart J*. 2003 Dec; 24(24): 2161-3.
- [46] Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Jun; 35(6): 615-21.
- [47] Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 Apr; 34(4): 379-88.
- [48] Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*. 2002 Nov 29; 91(11): 988-98.
- [49] Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, et al. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res*. 1999 Oct 29; 85(9): 856-66.
- [50] Garg S, Narula J, Chandrashekar Y. Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Jan; 38(1): 73-9.
- [51] Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest*. 2003 May; 111(10): 1497-504.
- [52] Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res*. 2003 Apr 18; 92(7): 715-24.
- [53] Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, et al. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet*. 2000 May 6; 355(9215): 1575-81.
- [54] The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*. 1999 Jan 2; 353(9146): 9-13.
- [55] Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*. 1999 Jun 12; 353(9169): 2001-7.
- [56] Hjalmarson A, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjeksus J, et al. Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *Jama*. 2000 Mar 8; 283(10): 1295-302.
- [57] Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 2001 May 31; 344(22): 1651-8.

- [58] Packer M, Fowler MB, Roecker EB, Coats AJ, Katus HA, Krum H, et al. Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation*. 2002 Oct 22; 106(17): 2194-9.
- [59] Chandra M, Gupta V, Johri AK, Misra R, Kumar A, Gujrati V, et al. Serotonergic mechanisms in heart failure. *Indian Heart J*. 1994 Jul-Aug; 46(4): 153-6.
- [60] Vizir VA, Berezin AE. [Relationship between myocardial remodeling and neurohumoral activation in patients with cardiac failure]. *Klin Med (Mosk)*. 2001; 79(9): 21-7.
- [61] Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Other peripheral mediators: 5-hydroxytryptamine and purines. *Rang & Dale's pharmacology*. 5th ed. Edinburgh; 2003.
- [62] Rudnick G. Serotonin transporters--structure and function. *J Membr Biol*. 2006; 213(2): 101-10.
- [63] Lesch KP, Gutknecht L. Pharmacogenetics of the serotonin transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Jul; 29(6): 1062-73.
- [64] Maurer-Spurej E. Circulating serotonin in vertebrates. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Aug; 62(16): 1881-9.
- [65] Maurer-Spurej E. Serotonin reuptake inhibitors and cardiovascular diseases: a platelet connection. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Jan; 62(2): 159-70.
- [66] Yamada M, Yasuhara H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology*. 2004 Jan; 25(1-2): 215-21.
- [67] Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Apr; 7(4): 295-309.
- [68] Luque JM, Kwan SW, Abell CW, Da Prada M, Richards JG. Cellular expression of mRNAs encoding monoamine oxidases A and B in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 1995 Dec 25; 363(4): 665-80.
- [69] Jahng JW, Houpt TA, Wessel TC, Chen K, Shih JC, Joh TH. Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *Synapse*. 1997 Jan; 25(1): 30-6.
- [70] Vitalis T, Fouquet C, Alvarez C, Seif I, Price D, Gaspar P, et al. Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse. *J Comp Neurol*. 2002 Jan 21; 442(4): 331-47.
- [71] Youdim MB. Platelet monoamine oxidase B: use and misuse. *Experientia*. 1988 Feb 15; 44(2): 137-41.
- [72] Nicotra A, Pierucci F, Parvez H, Senatori O. Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology*. 2004 Jan; 25(1-2): 155-65.
- [73] Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 Apr; 71(4): 533-54.
- [74] Bockaert J, Claeysen S, Becamel C, Dumuis A, Marin P. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res*. 2006 Nov; 326(2): 553-72.
- [75] Xie Z, Lee SP, O'Dowd BF, George SR. Serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Lett*. 1999 Jul 30; 456(1): 63-7.
- [76] Salim K, Fenton T, Bacha J, Urien-Rodriguez H, Bonnert T, Skynner HA, et al. Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *J Biol Chem*. 2002 May 3; 277(18): 15482-5.
- [77] Herrick-Davis K, Grinde E, Mazurkiewicz JE. Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry*. 2004 Nov 9; 43(44): 13963-71.

- [78] Berthouze M, Ayoub M, Russo O, Rivail L, Sicsic S, Fischmeister R, et al. Constitutive dimerization of human serotonin 5-HT₄ receptors in living cells. *FEBS Lett.* 2005 Jun 6; 579(14): 2973-80.
- [79] Herrick-Davis K, Grinde E, Harrigan TJ, Mazurkiewicz JE. Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine_{2c} receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *J Biol Chem.* 2005 Dec 2; 280(48): 40144-51.
- [80] Jouvett M. Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology.* 1999 Aug; 21(2 Suppl): 24S-7S.
- [81] Jacobs BL, Fornal CA. Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev.* 1991 Dec; 43(4): 563-78.
- [82] Chaouloff F. Serotonin, stress and corticoids. *J Psychopharmacol.* 2000 Jun; 14(2): 139-51.
- [83] Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Mar; 29(3): 450-60.
- [84] Bruck K, Hinckel P. Thermoregulatory noradrenergic and serotonergic pathways to hypothalamic units. *J Physiol.* 1980 Jul; 304: 193-202.
- [85] Curzon G. Serotonin and appetite. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 600: 521-30; discussion 30-1.
- [86] Wilson PR, Yaksh TL. Pharmacology of pain and analgesia. *Anaesth Intensive Care.* 1980 Aug; 8(3): 248-56.
- [87] Cowen PJ, Anderson IM, Gartside SE. Endocrinological responses to 5-HT. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 600: 250-7; discussion 7-9.
- [88] Ni W, Watts SW. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006 Jul; 33(7): 575-83.
- [89] Ahlenius S, Larsson K, Svensson L. Further evidence for an inhibitory role of central 5-HT in male rat sexual behavior. *Psychopharmacology (Berl).* 1980; 68(3): 217-20.
- [90] Decker MW, McGaugh JL. The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse.* 1991 Feb; 7(2): 151-68.
- [91] Staley JK, Malison RT, Innis RB. Imaging of the serotonergic system: interactions of neuroanatomical and functional abnormalities of depression. *Biol Psychiatry.* 1998 Oct 1; 44(7): 534-49.
- [92] Handley SL. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther.* 1995 Apr; 66(1): 103-48.
- [93] Charney DS, Goodman WK, Price LH, Woods SW, Rasmussen SA, Heninger GR. Serotonin function in obsessive-compulsive disorder. A comparison of the effects of tryptophan and m-chlorophenylpiperazine in patients and healthy subjects. *Arch Gen Psychiatry.* 1988 Feb; 45(2): 177-85.
- [94] Mann JJ. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology.* 1999 Aug; 21(2 Suppl): 99S-105S.
- [95] Pucilowski O, Kostowski W. Aggressive behaviour and the central serotonergic systems. *Behav Brain Res.* 1983 Jul; 9(1): 33-48.
- [96] Sellers EM, Higgins GA, Sobell MB. 5-HT and alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci.* 1992 Feb; 13(2): 69-75.
- [97] Cowen PJ, Wood AJ. Biological markers of depression. *Psychol Med.* 1991 Nov; 21(4): 831-6.

- [98] Talley NJ. Serotonergic neuroenteric modulators. *Lancet*. 2001 Dec 15; 358(9298): 2061-8.
- [99] Crowell MD. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol*. 2004 Apr; 141(8): 1285-93.
- [100] Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2004 Jun; 126(7): 1657-64.
- [101] Kulke MH, Mayer RJ. Carcinoid tumors. *N Engl J Med*. 1999 Mar 18; 340(11): 858-68.
- [102] Fox DJ, Khattar RS. Carcinoid heart disease: presentation, diagnosis, and management. *Heart*. 2004 Oct; 90(10): 1224-8.
- [103] Gustafsson BI, Tommeras K, Nordrum I, Loennechen JP, Brunsvik A, Solligard E, et al. Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation*. 2005 Mar 29; 111(12): 1517-22.
- [104] Killam AL, Cohen ML. Characterization of rat platelet serotonin receptors with tryptamine agonists and the antagonists: ketanserin and SCH 23390. *Thromb Res*. 1991 Nov 1; 64(3): 331-40.
- [105] Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*. 2000 Mar 1; 95(5): 1694-702.
- [106] Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost*. 2005 Oct; 3(10): 2185-92.
- [107] Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*. 2002 Jan 10; 415(6868): 175-9.
- [108] Walther DJ, Peter JU, Winter S, Holtje M, Paulmann N, Grohmann M, et al. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*. 2003 Dec 26; 115(7): 851-62.
- [109] Cote F, Fligny C, Fromes Y, Mallet J, Vodjdani G. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol Med*. 2004 May; 10(5): 232-8.
- [110] Tortora GJ, Grabowski SR. *Principles of Anatomy and Physiology*. Seventh edition / Deuxième édition française ed: De Boeck Université; 1994.
- [111] Ramage AG. Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. *Brain Res Bull*. 2001 Nov 15; 56(5): 425-39.
- [112] Wang Y, Ramage AG. The role of central 5-HT(1A) receptors in the control of B-fibre cardiac and bronchoconstrictor vagal preganglionic neurones in anaesthetized cats. *J Physiol*. 2001 Nov 1; 536(Pt 3): 753-67.
- [113] Jones BJ, Blackburn TP. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 Apr; 71(4): 555-68.
- [114] Yusuf S, Al-Saady N, Camm AJ. 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation: how significant is this piece in the puzzle? *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003 Feb; 14(2): 209-14.
- [115] Fu LW, Longhurst JC. Activated platelets contribute to stimulation of cardiac afferents during ischaemia in cats: role of 5-HT(3) receptors. *J Physiol*. 2002 Nov 1; 544(Pt 3): 897-912.
- [116] Fu LW, Longhurst JC. Role of activated platelets in excitation of cardiac afferents during myocardial ischemia in cats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jan; 282(1): H100-9.

- [117] Callebert J, Esteve JM, Herve P, Peoc'h K, Tournois C, Drouet L, et al. Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5-hydroxytryptamine(2B) receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 May; 317(2): 724-31.
- [118] Laer S, Remmers F, Scholz H, Stein B, Muller FU, Neumann J. Receptor mechanisms involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. *Br J Pharmacol*. 1998 Mar; 123(6): 1182-8.
- [119] Hara K, Hirowatari Y, Yoshika M, Komiyama Y, Tsuka Y, Takahashi H. The ratio of plasma to whole-blood serotonin may be a novel marker of atherosclerotic cardiovascular disease. *J Lab Clin Med*. 2004 Jul; 144(1): 31-7.
- [120] Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Lubbert H. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett*. 1995 Aug 21; 370(3): 215-21.
- [121] Esteve JM, Launay JM, Kellermann O, Maroteaux L. Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell Biochem Biophys*. 2007; 47(1): 33-44.
- [122] Watts SW. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? *Clin Sci (Lond)*. 2005 May; 108(5): 399-412.
- [123] Yavarone MS, Shuey DL, Tamir H, Sadler TW, Lauder JM. Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology*. 1993 Jun; 47(6): 573-84.
- [124] Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L. 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development*. 1997 May; 124(9): 1745-55.
- [125] Kaumann AJ, Levy FO. 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 2006 Sep; 111(3): 674-706.
- [126] Pau D, Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. Electrophysiological effects of 5-hydroxytryptamine on isolated human atrial myocytes, and the influence of chronic beta-adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol*. 2003 Dec; 140(8): 1434-41.
- [127] Harris P, Fritts HW, Jr., Cournand A. Some circulatory effects of 5-hydroxytryptamine in man. *Circulation*. 1960 Jun; 21: 1134-9.
- [128] Hollander W, Michelson AL, Wilkins RW. Serotonin and antiserotonins. I. Their circulatory, respiratory, and renal effects in man. *Circulation*. 1957 Aug; 16(2): 246-55.
- [129] Lemessurier DH, Schwartz CJ, Whelan RF. Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. *Br J Pharmacol Chemother*. 1959 Jun; 14(2): 246-50.
- [130] Parks VJ, Sandison AG, Skinner SL, Whelan RF. The stimulation of respiration by 5-hydroxytryptamine in man. *J Physiol*. 1960 May; 151: 342-51.
- [131] Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ. A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol*. 1990 Aug; 100(4): 879-85.
- [132] Sanders L, Kaumann AJ. A 5-HT₄-like receptor in human left atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1992 Apr; 345(4): 382-6.
- [133] Kaumann AJ, Lynham JA, Brown AM. Comparison of the densities of 5-HT₄ receptors, beta 1- and beta 2-adrenoceptors in human atrium: functional implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1996 Apr; 353(5): 592-5.
- [134] Kaumann AJ. Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias? *Trends Pharmacol Sci*. 1994 Dec; 15(12): 451-5.
- [135] Lezoualc'h F, Steplewski K, Sartiani L, Mugelli A, Fischmeister R, Bril A. Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT₄ receptor isoforms, calcium handling proteins and ion channels in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 25; 357(1): 218-24.
- [136] Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Krobert KA, Brattelid T, Kaumann AJ, et al. 5HT₄(a) and 5-HT₄(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2001 Feb; 363(2): 146-60.

- [137] Brattelid T, Qvigstad E, Lynham JA, Molenaar P, Aass H, Geiran O, et al. Functional serotonin 5-HT₄ receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT₄ mRNA in heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 Sep; 370(3): 157-66.
- [138] Mialet-Perez J, Bianchi P, Kunduzova O, Parini A. New insights on receptor-dependent and monoamine oxidase-dependent effects of serotonin in the heart. *J Neural Transm.* 2007; 114(6): 823-7.
- [139] Qvigstad E, Brattelid T, Sjaastad I, Andressen KW, Krobert KA, Birkeland JA, et al. Appearance of a ventricular 5-HT₄ receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2005 Mar 1; 65(4): 869-78.
- [140] Muller J, Ziegler WH. Stimulation of aldosterone biosynthesis in vitro by serotonin. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1968 Sep; 59(1): 23-35.
- [141] Jaffre F, Callebert J, Sarre A, Etienne N, Nebigil CG, Launay JM, et al. Involvement of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in cardiac hypertrophy linked to sympathetic stimulation: control of interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha cytokine production by ventricular fibroblasts. *Circulation.* 2004 Aug 24; 110(8): 969-74.
- [142] Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, et al. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15; 97(17): 9508-13.
- [143] Nebigil CG, Hickel P, Messaddeq N, Vonesch JL, Douchet MP, Monassier L, et al. Ablation of serotonin 5-HT_{2B} receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation.* 2001 Jun 19; 103(24): 2973-9.
- [144] Nebigil CG, Jaffre F, Messaddeq N, Hickel P, Monassier L, Launay JM, et al. Overexpression of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy. *Circulation.* 2003 Jul 1; 107(25): 3223-9.
- [145] Nebigil CG, Etienne N, Schaerlinger B, Hickel P, Launay JM, Maroteaux L. Developmentally regulated serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Int J Dev Neurosci.* 2001 Jul; 19(4): 365-72.
- [146] Qvigstad E, Sjaastad I, Brattelid T, Nunn C, Swift F, Birkeland JA, et al. Dual serotonergic regulation of ventricular contractile force through 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors induced in the acute failing heart. *Circ Res.* 2005 Aug 5; 97(3): 268-76.
- [147] Brattelid T, Qvigstad E, Birkeland JA, Swift F, Bekkevold SV, Krobert KA, et al. Serotonin responsiveness through 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors is differentially regulated in hypertrophic and failing rat cardiac ventricle. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Dec; 43(6): 767-79.
- [148] Mekontso-Dessap A, Brouri F, Pascal O, Lechat P, Hanoun N, Lanfumey L, et al. Deficiency of the 5-hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis and valvulopathy in mice. *Circulation.* 2006 Jan 3; 113(1): 81-9.
- [149] Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, Bompard G, Cambon C, Parini A, et al. Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Apr; 284(4): H1460-7.
- [150] Kong SW, Bodyak N, Yue P, Liu Z, Brown J, Izumo S, et al. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics.* 2005 Mar 21; 21(1): 34-42.
- [151] Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, Cambon C, Bani D, Raimondi L, et al. Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation.* 2005 Nov 22; 112(21): 3297-305.
- [152] Bianchi P, Pimentel DR, Murphy MP, Colucci WS, Parini A. A new hypertrophic mechanism of serotonin in cardiac myocytes: receptor-independent ROS generation. *Faseb J.* 2005 Apr; 19(6): 641-3.

- [153] Lawrie A, Spiekerkoetter E, Martinez EC, Ambartsumian N, Sheward WJ, MacLean MR, et al. Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease. *Circ Res*. 2005 Aug 5; 97(3): 227-35.
- [154] Eddahibi S, Hanoun N, Lanfumey L, Lesch KP, Raffestin B, Hamon M, et al. Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *J Clin Invest*. 2000 Jun; 105(11): 1555-62.
- [155] Launay JM, Herve P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, et al. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med*. 2002 Oct; 8(10): 1129-35.
- [156] MacLean MR, Deuchar GA, Hicks MN, Morecroft I, Shen S, Sheward J, et al. Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2004 May 4; 109(17): 2150-5.
- [157] Asghar M, Banday AA, Fardoun RZ, Lokhandwala MF. Hydrogen peroxide causes uncoupling of dopamine D1-like receptors from G proteins via a mechanism involving protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan 1; 40(1): 13-20.
- [158] Bergstrom D, Jacobsson SO, Fowler CJ. The effect of hydrogen peroxide upon beta-adrenoceptor density and function in C6 rat glioma cells. *Neurochem Int*. 1999 Jan; 34(1): 63-70.
- [159] Nickenig G, Strehlow K, Baumer AT, Baudler S, Wassmann S, Sauer H, et al. Negative feedback regulation of reactive oxygen species on AT1 receptor gene expression. *Br J Pharmacol*. 2000 Oct; 131(4): 795-803.
- [160] Nebigil CG, Etienne N, Messaddeq N, Maroteaux L. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. *Faseb J*. 2003 Jul; 17(10): 1373-5.
- [161] Shimizu Y, Minatoguchi S, Hashimoto K, Uno Y, Arai M, Wang N, et al. The role of serotonin in ischemic cellular damage and the infarct size-reducing effect of sarpogrelate, a 5-hydroxytryptamine-2 receptor blocker, in rabbit hearts. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Oct 2; 40(7): 1347-55.
- [162] Lairez O, Calise D, Bianchi P, Ordener C, Spreux-Varoquaux O, Guilbeau-Frugier C, et al. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2009 Apr; 46(4): 587-95.
- [163] Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S, et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*. 1995 Jun 23; 268(5218): 1763-6.
- [164] Robiolio PA, Rigolin VH, Wilson JS, Harrison JK, Sanders LL, Bashore TM, et al. Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation*. 1995 Aug 15; 92(4): 790-5.
- [165] Bush E, Fielitz J, Melvin L, Martinez-Arnold M, McKinsey TA, Plichta R, et al. A small molecular activator of cardiac hypertrophy uncovered in a chemical screen for modifiers of the calcineurin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2; 101(9): 2870-5.
- [166] Youdim MB, Finberg JP. New directions in monoamine oxidase A and B selective inhibitors and substrates. *Biochem Pharmacol*. 1991 Jan 15; 41(2): 155-62.
- [167] Lenders JW, Eisenhofer G, Abeling NG, Berger W, Murphy DL, Konings CH, et al. Specific genetic deficiencies of the A and B isoenzymes of monoamine oxidase are characterized by distinct neurochemical and clinical phenotypes. *J Clin Invest*. 1996 Feb 15; 97(4): 1010-9.

- [168] Saura J, Richards JG, Mahy N. Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in mouse brain and peripheral organs. *Neurobiol Aging*. 1994 Jul-Aug; 15(4): 399-408.
- [169] Sivasubramaniam SD, Finch CC, Rodriguez MJ, Mahy N, Billett EE. A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B mRNA and protein in non-CNS human tissues. *Cell Tissue Res*. 2003 Sep; 313(3): 291-300.
- [170] Strom CC, Kruhoffer M, Knudsen S, Stensgaard-Hansen F, Jonassen TE, Orntoft TF, et al. Identification of a core set of genes that signifies pathways underlying cardiac hypertrophy. *Comp Funct Genomics*. 2004; 5(6-7): 459-70.
- [171] Schanstra JP, Neau E, Drogoz P, Arevalo Gomez MA, Lopez Novoa JM, Calise D, et al. In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J Clin Invest*. 2002 Aug; 110(3): 371-9.
- [172] Klein J, Gonzalez J, Duchene J, Esposito L, Pradere JP, Neau E, et al. Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *Faseb J*. 2008 Sep 22.
- [173] Alvarez JC, Bothua D, Collignon I, Advenier C, Spreux-Varoquaux O. Simultaneous measurement of dopamine, serotonin, their metabolites and tryptophan in mouse brain homogenates by high-performance liquid chromatography with dual coulometric detection. *Biomed Chromatogr*. 1999 Jun; 13(4): 293-8.
- [174] Alvarez JC, Sanceaume M, Advenier C, Spreux-Varoquaux O. Differential changes in brain and platelet 5-HT concentrations after steady-state achievement and repeated administration of antidepressant drugs in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 1999 Dec; 10(1): 31-6.
- [175] Strolin Benedetti M, Thomassin J, Tocchetti P, Dostert P, Kettler R, Da Prada M. Species differences in changes of heart monoamine oxidase activities with age. *J Neural Transm Suppl*. 1994; 41: 83-7.
- [176] Holschneider DP, Chen K, Seif I, Shih JC. Biochemical, behavioral, physiologic, and neurodevelopmental changes in mice deficient in monoamine oxidase A or B. *Brain Res Bull*. 2001 Nov 15; 56(5): 453-62.
- [177] Knight AR, Misra A, Quirk K, Benwell K, Revell D, Kennett G, et al. Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2004 Aug; 370(2): 114-23.
- [178] Johnson MP, Siegel BW, Carr AA. [3H]MDL 100,907: a novel selective 5-HT2A receptor ligand. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 1996 Jul; 354(2): 205-9.
- [179] Kehne JH, Baron BM, Carr AA, Chaney SF, Elands J, Feldman DJ, et al. Preclinical characterization of the potential of the putative atypical antipsychotic MDL 100,907 as a potent 5-HT2A antagonist with a favorable CNS safety profile. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 May; 277(2): 968-81.
- [180] Cote F, Thevenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoche MA, et al. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11; 100(23): 13525-30.
- [181] Kema IP, de Vries EG, Schellings AM, Postmus PE, Muskiet FA. Improved diagnosis of carcinoid tumors by measurement of platelet serotonin. *Clin Chem*. 1992 Apr; 38(4): 534-40.
- [182] Meijer WG, Kema IP, Volmer M, Willemsse PH, de Vries EG. Discriminating capacity of indole markers in the diagnosis of carcinoid tumors. *Clin Chem*. 2000 Oct; 46(10): 1588-96.
- [183] Sole MJ, Shum A, Van Loon GR. Serotonin metabolism in the normal and failing hamster heart. *Circ Res*. 1979 Nov; 45(5): 629-34.

- [184] Liang YJ, Lai LP, Wang BW, Juang SJ, Chang CM, Leu JG, et al. Mechanical stress enhances serotonin 2B receptor modulating brain natriuretic peptide through nuclear factor-kappaB in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2006 Nov 1; 72(2): 303-12.
- [185] Dimitrow PP, Undas A, Bober M, Tracz W, Dubiel JS. Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with enhanced thrombin generation and platelet activation. *Heart*. 2008 Jun; 94(6): e21.
- [186] Cobo C, Alcocer L, Chavez A. Effects of ketanserin on left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1990 Jan; 4 Suppl 1: 73-6.
- [187] Van Oekelen D, Luyten WH, Leysen JE. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life Sci*. 2003 Apr 18; 72(22): 2429-49.
- [188] Kaludercic N, Takimoto E, Nagayama T, Feng N, Lai EW, Bedja D, et al. Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload. *Circ Res*. 2010 Jan 8; 106(1): 193-202.
- [189] Villeneuve C, Caudrillier A, Ordener C, Pizzinat N, Parini A, Mialet-Perez J. Dose-dependent activation of distinct hypertrophic pathways by serotonin in cardiac cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Aug; 297(2): H821-8.
- [190] Vindis C, D'Angelo R, Mucher E, Negre-Salvayre A, Parini A, Mialet-Perez J. Essential role of TRPC1 channels in cardiomyoblasts hypertrophy mediated by 5-HT_{2A} serotonin receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 1; 391(1): 979-83.
- [191] Yabanoglu S, Akkiki M, Seguelas MH, Mialet-Perez J, Parini A, Pizzinat N. Platelet derived serotonin drives the activation of rat cardiac fibroblasts by 5-HT_{2A} receptors. *J Mol Cell Cardiol*. 2009 Apr; 46(4): 518-25.
- [192] Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *Embo J*. 2000 Jun 1; 19(11): 2537-48.
- [193] Meguro T, Hong C, Asai K, Takagi G, McKinsey TA, Olson EN, et al. Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circ Res*. 1999 Apr 2; 84(6): 735-40.
- [194] Kuster GM, Kotlyar E, Rude MK, Siwik DA, Liao R, Colucci WS, et al. Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation*. 2005 Feb 1; 111(4): 420-7.
- [195] Yang G, Meguro T, Hong C, Asai K, Takagi G, Karoor VL, et al. Cyclosporine reduces left ventricular mass with chronic aortic banding in mice, which could be due to apoptosis and fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Aug; 33(8): 1505-14.
- [196] Jaffre F, Bonnin P, Callebert J, Debbabi H, Setola V, Doly S, et al. Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2009 Jan 2; 104(1): 113-23.
- [197] O'Connell TD, Swigart PM, Rodrigo MC, Ishizaka S, Joho S, Turnbull L, et al. Alpha1-adrenergic receptors prevent a maladaptive cardiac response to pressure overload. *J Clin Invest*. 2006 Apr; 116(4): 1005-15.
- [198] Zhao XS, Pan W, Bekeredjian R, Shohet RV. Endogenous endothelin-1 is required for cardiomyocyte survival in vivo. *Circulation*. 2006 Aug 22; 114(8): 830-7.
- [199] Maillet M, Davis J, Auger-Messier M, York A, Osinska H, Piquereau J, et al. Heart-specific deletion of CnB1 reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function. *J Biol Chem*. 2010 Feb 26; 285(9): 6716-24.

- [200] Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003 Apr 3; 348(14): 1309-21.
- [201] Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2; 341(10): 709-17.
- [202] McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, Schinke-Braun M, Bouwman RD, Hewitt KA, et al. Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 9; 104(2): 612-7.
- [203] Mialet-Perez J, D'Angelo R, Ordener C, Parini A, Nègre-Salvayre A, Vindis C. Caveolin-3 negatively regulates the serotonin 5-HT_{2A} receptor: consequences on cardiomyoblast hypertrophy. *Soumis*. 2010.
- [204] Grieve DJ, Byrne JA, Siva A, Layland J, Johar S, Cave AC, et al. Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Feb 21; 47(4): 817-26.
- [205] Lung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Barwolf C, Levang OW, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. 2003 Jul; 24(13): 1231-43.
- [206] Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Mar 1; 29(3): 630-4.
- [207] Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med*. 1999 Jul 15; 341(3): 142-7.
- [208] Soler-Soler J, Galve E. Worldwide perspective of valve disease. *Heart*. 2000 Jun; 83(6): 721-5.
- [209] Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007 Jan; 28(2): 230-68.
- [210] Quinones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002 Feb; 15(2): 167-84.
- [211] Otto CM, Burwash IG, Legget ME, Munt BI, Fujioka M, Healy NL, et al. Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome. *Circulation*. 1997 May 6; 95(9): 2262-70.
- [212] Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, et al. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2000 Aug 31; 343(9): 611-7.
- [213] Pellikka PA, Sarano ME, Nishimura RA, Malouf JF, Bailey KR, Scott CG, et al. Outcome of 622 adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis during prolonged follow-up. *Circulation*. 2005 Jun 21; 111(24): 3290-5.
- [214] Amato MC, Moffa PJ, Werner KE, Ramires JA. Treatment decision in asymptomatic aortic valve stenosis: role of exercise testing. *Heart*. 2001 Oct; 86(4): 381-6.
- [215] Das P, Rimington H, Chambers J. Exercise testing to stratify risk in aortic stenosis. *Eur Heart J*. 2005 Jul; 26(13): 1309-13.

- [216] Goldsmith IR, Foo LS, Blann AD, Lip GY. Increased platelet activation and endothelial dysfunction in patients with atrial fibrillation immediately following percutaneous balloon mitral valvuloplasty. *Clin Cardiol*. 2000 Aug; 23(8): 587-90.
- [217] Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007 Dec 13; 357(24): 2482-94.
- [218] Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol*. 2007 Oct; 18(5): 483-91.
- [219] Mohler ER, 3rd. Mechanisms of aortic valve calcification. *Am J Cardiol*. 2004 Dec 1; 94(11): 1396-402, A6.
- [220] Kema IP, de Vries EG, Slooff MJ, Biesma B, Muskiet FA. Serotonin, catecholamines, histamine, and their metabolites in urine, platelets, and tumor tissue of patients with carcinoid tumors. *Clin Chem*. 1994 Jan; 40(1): 86-95.
- [221] Lundin L, Norheim I, Landelius J, Oberg K, Theodorsson-Norheim E. Carcinoid heart disease: relationship of circulating vasoactive substances to ultrasound-detectable cardiac abnormalities. *Circulation*. 1988 Feb; 77(2): 264-9.
- [222] Moller JE, Connolly HM, Rubin J, Seward JB, Modesto K, Pellikka PA. Factors associated with progression of carcinoid heart disease. *N Engl J Med*. 2003 Mar 13; 348(11): 1005-15.
- [223] Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, Hensrud DD, Edwards BS, Edwards WD, et al. Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N Engl J Med*. 1997 Aug 28; 337(9): 581-8.
- [224] Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2007 Jun; 28(12): 1462-536.
- [225] van Berlo JH, Elrod JW, van den Hoogenhof MM, York AJ, Aronow BJ, Duncan SA, et al. The Transcription Factor GATA-6 Regulates Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circ Res*. 2010 Oct 15; 107(8): 1032-40.
- [226] Villeneuve C, Guilbeau-Frugier C, Lairez O, Ordener C, Duparc T, De Paulis D, et al. Cardiac-specific overexpression of monoamine-oxidase-A is associated with chronic oxidative stress, cardiomyocyte drop-out and progressive ventricular failure. *Soumis*. 2010.
- [227] Rasbach KA, Funk JA, Jayavelu T, Green PT, Schnellmann RG. 5-hydroxytryptamine receptor stimulation of mitochondrial biogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Feb; 332(2): 632-9.
- [228] Fiorica-Howells E, Hen R, Gingrich J, Li Z, Gershon MD. 5-HT(2A) receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT(2A) knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 May; 282(5): G877-93.
- [229] Spreux-Varoquaux O, Gailledreau J, Vanier B, Bothua D, Plas J, Chevalier JF, et al. Initial increase of plasma serotonin: a biological predictor for the antidepressant response to clomipramine? *Biol Psychiatry*. 1996 Sep 15; 40(6): 465-73.
- [230] Radat F, Berlin I, Spreux-Varoquaux O, Elatki S, Ferreri M, Puech AJ. Initial monoamine oxidase-A inhibition by moclobemide does not predict the therapeutic response in patients with major depression. A double blind, randomized study. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996 Oct; 127(4): 370-6.