



Implication du récepteur 5-HT4 cardiaque humain dans la fibrillation auriculaire : rôle d'auto-anticorps dirigés contre ce récepteur ?

Emmanuella Di Scala

► To cite this version:

Emmanuella Di Scala. Implication du récepteur 5-HT4 cardiaque humain dans la fibrillation auriculaire : rôle d'auto-anticorps dirigés contre ce récepteur ? . Cardiologie et système cardiovasculaire. Université de Tours, 2004. Français. <tel-01360758>

HAL Id: tel-01360758

<https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01360758>

Submitted on 6 Sep 2016

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

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



**UNIVERSITE FRANÇOIS RABELAIS
TOURS**

Ecole Doctorale : Santé, Sciences, Technologies

**THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE
L'UNIVERSITE DE TOURS**

Discipline : Sciences de la Vie

**Présentée et soutenue publiquement par Emmanuella DI SCALA
Allocataire MENRT**

Soutenance prévue le 2 juillet 2004

**IMPLICATION DU RECEPTEUR 5-HT₄ CARDIAQUE HUMAIN DANS
LA FIBRILLATION AURICULAIRE : RÔLE D'AUTO-ANTICORPS
DIRIGES CONTRE CE RECEPTEUR ?**

Directeur de Thèse : Pierre COSNAY

Composition du Jury :

ARGIBAY Jorge, Professeur, Université de Tours

BOZON Véronique, Maître de Conférences, Université de Tours

COSNAY Pierre, Professeur-Praticien Hospitalier, Université de Tours

DUMUIS Aline, Directeur de Recherche CNRS, Montpellier

Rapporteur

HOEBEKE Johan, Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

LEZOUALC'H Frank, Chargé de Recherche INSERM, Châtenay-Malabry

Rapporteur

Remerciements :

Je tiens à remercier :

- Le Professeur Jorge Argibay pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche il y a de cela 5 ans. Je vous remercie également pour votre aide et vos conseils scientifiques au cours de ces années me permettant d'avancer dans mon travail et mes réflexions.
- Le Professeur Pierre Cosnay pour avoir dirigé cette thèse et m'avoir apporté les notions cliniques et électrophysiologiques qui m'étaient absentes. Malgré un emploi du temps surchargé, je vous remercie du temps que vous avez consacré à m'écouter et pour le soutien moral que vous m'avez apporté tout au long de cette thèse.
- Le Docteur Véronique Bozon pour avoir co-dirigé cette thèse. Je vous remercie pour l'attention que vous avez eu à mon égard aussi bien d'un point de vue intellectuel que moral. Merci également pour tout ce temps passé à m'écouter et pour votre patience tout au long de ces 5 années...Enfin, encore merci pour cette liberté que vous m'avez délibérément laissée et qui m'a permis de me développer intellectuellement.
- Le Docteur Ian Findlay pour m'avoir appris la technique de patch clamp. Merci pour le temps que vous m'avez consacré journalièrement en plus de votre propre travail de recherche. Je tiens également à vous remercier pour la rigueur et la culture scientifique que vous m'avez apportées au cours de ces 2 années d'étude sur l'électrophysiologie. J'ai été très heureuse d'apprendre à vos côtés. Encore merci pour tout ainsi que pour votre amitié.
- Stéphanie Rose pour son aide technique au cours de ces 4 années mais plus encore pour les discussions et réflexions communes que nous avons eu me permettant d'avancer dans mes travaux. Merci pour ton amitié et ton soutien moral. Je te suis très reconnaissante pour ton investissement intellectuel et moral et j'ai été très heureuse d'avoir pu travailler à tes côtés.

Je suis très honorée que les Docteurs Aline Dumuis et Frank Lezoualc'h aient accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que le Docteur Johan Hoebeke d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Vos nombreux travaux portant sur la réceptologie et l'immunologie montrent l'ampleur de votre implication scientifique dans ces domaines.

Je tiens à remercier Dominique Gennetay et Maryse Pingaud pour leur aide technique et morale. Merci pour ce temps que vous m'avez accordé.

Je voudrais également remercier le Professeur Michel Aupart pour sa gentillesse, son intérêt porté sur ce travail et son soutien moral au cours de ces 3 années. Merci de m'avoir intégré aussi facilement au sein du bloc opératoire.

Je remercie aussi le Docteur Laurent Sallé pour m'avoir appris la technique d'isolement des myocytes humains et pour m'avoir supportée alors qu'il écrivait sa thèse.

Je désire également remercier les personnels du laboratoire qui m'ont aidée pour une raison ou une autre. A ce titre je remercierai particulièrement le Docteur Jacques Lignon pour m'avoir prêté son cours de DEA et m'avoir aidée sur cette fin de thèse, le Docteur Nicolas Peineau pour les diverses remarques scientifiques qu'il m'a suggérées au cours de ces années ainsi que Chantal Boisseau pour son investissement administratif dès que j'en avais besoin.

Je remercie également les membres du service de Cardiologie B et du service de Chirurgie Cardiaque de l'Hôpital Trousseau de Tours.

Enfin je tiens à remercier pour leur soutien moral les étudiants avec qui j'ai travaillé et passé des moments: Cécile, Eric, Sévil, et Steffi pour qui j'ai une pensée toute particulière en raison de son soutien moral constant lors de mes premières années au laboratoire et à qui je souhaite bonne chance pour sa future soutenance.

Je voudrais maintenant remercier ma famille qui m'a permis d'arriver à cet objectif :

- Merci maman pour ta prévenance, ton dévouement, ta gentillesse et ton affection qui m'ont permis de me consacrer entièrement à mes études.
- Merci papa pour tes nombreux et justes conseils concernant la recherche. Merci pour ton affection ainsi que ton enseignement nous ayant conduit à adopter une démarche la plus rigoureuse possible afin de former notre esprit.
- Merci à mes frères Pascal et Nicolas pour leur soutien moral et leur affection.
- Merci à ma belle-famille : Françoise, Claude, Barbara et Denis pour leur soutien moral et leur affection pendant toutes ces années. Merci de m'avoir aidée à supporter ce pénible éloignement de mon cher et tendre pendant ces deux longues années à Bordeaux.

Je voudrais maintenant remercier spécialement celui sans qui je n'aurais jamais pris cette voie, mon fiancé et futur époux, Anthony. Tu me soutiens et me supportes depuis 8 ans et c'est pourquoi je te remercie pour ta tendresse, ton affection, ta patience et ta gentillesse. Tes visions et réflexions cartésiennes au cours de nos discussions m'apportent une meilleure connaissance de moi-même un peu plus chaque jour....

« La sagesse, c'est de savoir qu'on sait et qu'on ne sait pas » disait Platon. Quelle meilleure attitude pour effectuer cette distinction que d'utiliser le précepte cartésien : « éviter soigneusement la précipitation, le préjugé et ne comprendre rien de plus en mes jugements que ce qui se présenterait si clairement et si distinctement à mon esprit que je n'eusse aucune occasion de le mettre en doute ».

Sommaire

Sommaire.....	1
Abréviations.....	6
Résumé.....	7
Summary.....	8
Introduction générale.....	9
Tables des figures de la revue bibliographique.....	12
Revue bibliographique.....	14
Chapitre I : L'activité cardiaque.....	14
A. Rappels anatomiques et histologiques.....	14
B. Innervation cardiaque et tissu de conduction.....	16
C. Activation de la contraction.....	19
1. Potentiel d'action.....	19
2. Couplage excitation-contraction	21
3. Appareil contractile.....	22
4. Mécanisme de relaxation.....	24
Chapitre II : Les récepteurs couplés aux protéines G.....	25
A. Généralités.....	25
B. Modèle thermodynamique de l'activation des RCPG.....	29
1. De la théorie de l'occupation des récepteurs au modèle cubique ternaire allostérique.....	29
2. Processus d'activation microscopique des RCPG.....	34
3. Limitation du modèle thermodynamique cubique ternaire	35
C. Les récepteurs cardiaques couplés aux protéines G.....	39
1. Récepteurs adrénergiques.....	39
a) Récepteurs α -adrénergiques.....	40
b) Récepteurs β -adrénergiques.....	41
2. Récepteurs muscariniques.....	44
3. Récepteurs sérotoninergiques de type 4.....	45
Chapitre III : Les voies de transduction du signal des récepteurs couplés aux protéines G.....	51
A. Les seconds messagers intracellulaires des récepteurs couplés aux protéines G.....	51

1. L'AMP cyclique.....	51
a) Les adénylates cyclases.....	51
b) La protéine kinase A : cible de l'AMPc.....	53
c) Les protéines phosphatases : facteurs régulateurs des PKA.....	55
d) Les phosphodiesterases : régulateur de la concentration en AMPc intracellulaire.....	56
e) Efflux d'AMPc hors de la cellule : autre régulateur de la concentration en AMPc intracellulaire.....	57
2. Le second messager : l'ion Ca^{2+}	58
a) Rôle du récepteur à l' IP_3	58
b) Rôle du récepteur à la ryanodine.....	58
c) Oscillations calciques.....	60
d) Pompes et échangeurs : maintien de l'homéostasie calcique cellulaire.....	61
3. Interactions entre seconds messagers.....	63
B. La signalisation par l'intermédiaire de récepteurs-enzymes.....	64
Chapitre IV : Le canal calcique de type L.....	65
A. Généralités.....	65
B. Le canal calcique de type L cardiaque.....	65
1. La sous-unité α_{1C}	66
2. La sous-unité β	67
3. La sous-unité $\alpha_2\delta$	68
4. La sous-unité γ	68
C. Régulation du canal calcique de type L par le voltage, le calcium et les bloqueurs.....	69
1. Régulation par le voltage.....	69
2. Inactivation et facilitation dépendante du calcium.....	70
3. Régulation par les bloqueurs.....	70
D. Régulation du canal calcique de type L par les hormones.....	71
1. Modulation par une phosphorylation AMPc-dépendante.....	71
2. Modulation par une phosphorylation PKC-dépendante.....	71
3. Modulation par le GMPc.....	72
Chapitre V : Les RCPG cardiaques impliqués dans des maladies d'origine auto-immune.....	72

A. Pathologies cardiaques décrites dans le contexte d'une maladie auto-immune.....	74
1. Maladie de Chagas.....	74
2. La cardiomyopathie dilatée idiopathique.....	75
3. Lupus érythémateux disséminé et syndrome lupique néonatal.....	76
B. Production d'anticorps et effets sur les récepteurs cardiaques couplés aux protéines G.....	77
C. Les fibrillations auriculaires et le récepteur 5-HT ₄	78
Matériels et méthodes.....	82
A. Cultures cellulaires.....	82
B. Transfection des cellules COS-7.....	82
C. Isolement de myocytes atriaux humains.....	82
D. Production et purification de l'anticorps anti-G21V.....	83
E. Activité de l'adénylate cyclase.....	83
1. Stimulation des cellules COS-7.....	83
2. Stimulation des cellules clone 1 et 2.....	84
3. Stimulation des myocytes atriaux humains.....	84
4. Dosage de second messenger : l'AMPc.....	85
F. Liaison de radioligand et détermination de la constante de dissociation, K _d	85
G. Analyse de cytométrie en flux.....	86
H. Méthodes expérimentales électrophysiologiques réalisées sur des myocytes atriaux humains.....	87
I. Précipitation au sulfate d'ammonium des sérums de patients atteints de fibrillations auriculaires idiopathiques.....	88
J. Test ELISA.....	88
K. Dot blot et Western blot.....	89
L. Matériels.....	89
M. Analyse statistique.....	90
Tables des figures et tableaux de la partie résultats et discussion.....	91
Objectifs.....	93
Résultats et discussion.....	94
Partie 1 : Etude de l'activité d'un anticorps anti-peptidique anti-G21V le récepteur 5-HT_{4(e)} humain cardiaque exprimé dans des systèmes d'expression ..	94
A. Présentation.....	94

B. Effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur 5-HT _{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7	94
1. Caractérisation et identification du récepteur 5-HT _{4(e)}	95
2. Effet fonctionnel de l'anticorps sur l'activité du récepteur h5-HT _{4(e)}	97
C. Effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur 5-HT _{4(e)} exprimé dans les cellules CHO	98
1. Etude sur les cellules CHO clone 1.....	98
a) Caractérisation du récepteur h5-HT _{4(e)} exprimé	99
b) Effet de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT _{4(e)}	100
c) Les fractions agonistes des récepteurs h5-HT _{4(e)} diffèrent selon le système d'expression utilisé	103
2. Comparaison des effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT _{4(e)} exprimé dans deux clones de cellules CHO : clones 1 et 2.....	105
a) Caractérisation biochimique et immunochimique du récepteur h5-HT _{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 2.....	105
b) Effet fonctionnel de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT _{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 2.....	108
D. Conclusions et perspectives.....	110
Annexe 1.....	113
Annexe 2.....	122
Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle, pharmacologique et immunologique du récepteur h5-HT₄ dans des myocytes atriaux humains.....	144
A. Présentation.....	144
B. Activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V dirigé contre le récepteur 5-HT ₄ Mesure du taux d'AMPC intracellulaire	144
C. Etude fonctionnelle du récepteur 5-HT ₄	147
1. Mesure du taux d'AMPC intracellulaire.....	147
2. Mesure du courant calcique I _{Ca2+, L}	148
D. Comparaison des propriétés fonctionnelles des récepteurs cardiaques 5-HT ₄ et β-adrénergiques.....	150
1. Mesure du taux d'AMPC intracellulaire.....	150
2. Mesure du courant calcique I _{Ca2+, L}	150
E. Action conjointes des récepteurs cardiaques sur l'activité du I _{Ca2+, L}	151
F. Caractérisation pharmacologique.....	152

1. Mesure du taux d'AMPC intracellulaire.....	152
2. Mesure du courant calcique $I_{Ca^{2+},L}$	153
G. Relation entre l'intensité de la stimulation sérotoninergique et le traitement des patients avec les beta-bloqueurs	154
H. Oligomérisation du récepteur h5-HT ₄ cardiaque.....	156
I. Conclusions et perspectives.....	157
Annexe 3.....	165
Partie 3 : Détection d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur 5-HT₄ humain cardiaque dans le sérum de patients atteints de fibrillations auriculaires d'origine indéterminée. Effets fonctionnels des auto-anticorps sur les myocytes atriaux humains exprimant le récepteur 5-HT₄.....	192
A. Détection de la présence d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur 5-HT ₄ humain cardiaque dans le sérum de patients atteints de fibrillations auriculaires paroxystiques idiopathiques.....	192
1. Présence d'anticorps dirigés contre le peptide G21V.....	192
2. Présence d'anticorps dirigés contre le récepteur humain 5-HT _{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone1.....	193
B. Effets fonctionnels des IgG précipitées des patients P2 et P6 sur les myocytes atriaux humains	194
1. Effet des IgG précipitées sur la production d'AMPC	194
2. Effet des IgG précipitées sur l'amplitude du $I_{Ca^{2+},L}$	195
C. Conclusion et perspectives.....	197
Conclusions et perspectives générales.....	199
Bibliographie.....	202

Abréviations

5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
AC	adénylate cyclase
AMPc	adénosine monophosphate 3', 5' cyclique
AKAP	cAMP kinase anchoring protein
ATP	adénosine triphosphate
CEC	couplage excitation-contraction
CICR	calcium induced-calcium release
CMD	cardiomyopathie dilatée
GMPc	guanosine monophosphate 3', 5' cyclique
GTP	guanosine triphosphate
I_{Ca2+,L}	courant calcique de type L
IgG	immunoglobuline de type G
IP₃	inositol triphosphate
Iso	isoprotérénol
PDE	phosphodiesterase
PKA	protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase dépendante du GMPc
PTX	pertussis toxine
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G
RS	réticulum sarcoplasmique
SERCA	ATP-ase calcique du RS
h5-HT₄	Récepteur à la sérotonine de type 4 humain

RESUME

Le récepteur 5-HT₄ humain cardiaque cloné en 1997 présente une activité fonctionnelle uniquement au niveau des oreillettes. Il est couplé positivement à l'adénylate cyclase par une protéine G_S. Sa stimulation induit l'activation d'une protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), laquelle phosphoryle différentes protéines clés impliquées dans le couplage excitation-contraction incluant le canal calcique de type L. Plusieurs études suggèrent que le récepteur 5-HT₄ aurait un rôle dans le maintien des fibrillations auriculaires.

L'implication d'une composante auto-immune dans certaines cardiomyopathies a été largement répertoriée dans la littérature. Les anticorps sont dirigés contre la seconde boucle extracellulaire des récepteurs cardiaques couplés aux protéines G (RCPG) tels que les récepteurs β -adrénergiques et M2 muscariniques. L'identification récente du récepteur h5-HT₄ cardiaque suggère la possibilité d'une nouvelle cible pour des auto-anticorps.

La première partie de cette étude porte sur les effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur 5-HT₄ exprimé dans des systèmes recombinants, les cellules COS-7 et CHO. L'anticorps semblerait avoir une activité différente suivant la lignée cellulaire et la densité d'expression de ce récepteur à la membrane. En effet, l'anti-G21V a une activité de type agoniste sur le récepteur présent à forte densité dans les cellules COS-7 et n'a aucun effet sur les cellules CHO clone 1. De plus, dans ce même système cellulaire (cellules CHO), cet anticorps agit comme un agoniste inverse, sur un autre clone 2 exprimant plus faiblement ce récepteur. Nos travaux ont permis d'autre part de mettre en évidence pour la première fois la présence d'anticorps auto-immuns dirigés contre le récepteur 5-HT₄ dans le sérum de patients atteints de fibrillation auriculaire paroxystique idiopathique. Appliqués sur des myocytes atriaux humains, ces auto-anticorps ne modulent pas la production d'AMPc intracellulaire. Ces effets sont similaires à ceux observés avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un peptide mimant la seconde boucle extracellulaire du récepteur h5-HT₄. Néanmoins, il a été montré au laboratoire que l'anticorps anti-G21V pouvait inhiber le courant calcique I_{Ca2+,L}. Ces différents effets suggèrent que l'anti-G21V, soit déclenche une autre cascade de transduction que la voie AMPc, soit agit localement en microdomaines de régulation fonctionnelle autour de I_{Ca2+,L}. Il pourrait être en particulier proposé que les cardiomyocytes expriment une plus faible quantité de récepteurs 5-HT₄ au niveau de microdomaines de régulation contenant les canaux calciques de type L et un taux plus élevé pour le reste de la membrane plasmique dont les effets seraient similaires à ceux trouvés à partir des études sur les cellules CHO clone 1 et clone 2.

Mots clés : anticorps, récepteur, sérotonine, myocytes atriaux humains, fibrillation auriculaire

SUMMARY

The human cardiac 5-HT₄ receptor was cloned in 1997. It is functional only in atrial myocytes where it is positively coupled via G_s to the adenylate cyclase, activates the cAMP-dependent protein kinase (PKA) and in consequence phosphorylates a variety of intracellular proteins implicated in excitation-contraction coupling. A number of studies suggest a role for the 5-HT₄ receptor in the maintenance or elongation of atrial fibrillation.

It is now accepted that certain cardiac pathologies involve auto-immune processes. Antibodies directed against the second extracellular loop of a number of cardiac G-protein linked receptors have been found. The human cardiac 5-HT₄ receptor could therefore also be a target for auto-immune antibodies.

The first part of this study investigated the functional effects of the rabbit polyclonal antibody (anti-G21V) against the h5-HT₄ receptor expressed in the mammalian cell lines COS-7 and CHO. We found that the effects of the antibody seemed to depend upon the cell type and the density of expression of the receptor. Thus, when the receptor was expressed at high density in COS-7 and CHO cells, the antibody had an agonist-like effect in the former and no effect in the latter. When the receptor was expressed in CHO cells at low density, the antibody had an inverse-agonist-like effect.

Otherwise, our studies show for the first time the presence of auto-immune antibodies targeted against the 5-HT₄ receptor in the sera of patients suffering from idiopathic paroxysmic atrial fibrillation. Neither these human antibodies nor the polyclonal antibody (anti-G21V) raised in rabbit against the second extracellular loop of the 5-HT receptor, had any detectible effect upon the production of intracellular cAMP in enzymatically isolated human atrial myocytes. While previous studies from this laboratory have shown that antiG21V could inhibit activation by 5-HT of the L-type Ca²⁺ current in human myocytes. The difference between these results might suggest that the polyclonal antibody either activates a signalling pathway that does not involve cAMP, or operates in functional microdomains localised with the Ca²⁺ channels. In particular, atrial myocytes could express receptors at low density in domains around the Ca²⁺ channels and at high density in the rest of the sarcolemmal membrane conducting similar effects to clone 1 and 2.

Key Words : antibody, receptor, serotonin, human atrial myocytes, atrial fibrillation.

INTRODUCTION

L'effet de la sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) sur le système nerveux central ainsi que sur les organes périphériques implique les récepteurs RCPG sérotoninergiques de type 4 (Bockaert & Pin, 1998). 15 sous-types de récepteurs à la sérotonine ont été décrits (Saxena & Villalon, 1990). En 1997, le récepteur 5-HT₄ humain cardiaque a été cloné par Blondel et al. Il est constitué par 4 isoformes : a, b, c et e (Blondel et al., 1998a). Dans le cœur, le récepteur 5-HT₄ est fonctionnel uniquement au niveau de l'oreillette et est couplé positivement à l'adénylate cyclase par une protéine G_S (Kaumann, 1991; Ouadid et al., 1991; Sanders & Kaumann, 1992; Jahnel et al., 1992). La stimulation des récepteurs 5-HT₄ induit l'activation de la protéine kinase PKA qui phosphoryle différentes protéines clés impliquées dans le couplage excitation-contraction incluant le canal calcique de type L (I_{Ca2+,L}) (Jahnel et al., 1992). En 1994, le récepteur a été proposé comme étant partenaire des fibrillations auriculaires (Kaumann, 1994). Sur des lambeaux d'oreillette humaine, la 5-HT induit des contractions arythmiques amplifiées chez des patients traités avec des beta-bloqueurs (Kaumann & Sanders, 1994). La fibrillation auriculaire est totalement bloquée par l'utilisation du SB203186, un antagoniste du récepteur 5-HT₄. Il est suggéré qu'une stimulation sérotoninergique induise à partir de canaux calciques une surcharge calcique, condition génératrice de fibrillations auriculaires (Kaumann, 1994; Langlois & Fischmeister, 2003).

L'implication, dans des cardiomyopathies, d'une composante auto-immune dirigée contre des RCPG cardiaques a été abondamment répertoriée dans la littérature. Les auto-anticorps détectés dans le sérum de patients atteints de cardiomyopathies dilatées idiopathiques présentent des effets fonctionnels différents sur les RCPG cardiaques (Borda et al., 1984; Fu, 1995; Goin et al., 1994; Mijares et al., 1996a; Lebesgue et al., 1998; Michikado et al., 2001). Ces anticorps auto-immuns sont dirigés contre la seconde boucle extracellulaire des récepteurs β -adrenergiques et M2 muscariniques. Ils ont une activité de type agoniste sur ces récepteurs. Ils induisent sur des cardiomyocytes de rats en culture (Mijares et al., 1996a, Lebesgue et al., 1998) des effets inotrope positif et chronotrope négatif par l'intermédiaire des récepteurs β_2 -adrénergiques (Elies et al., 1998). D'autre part, pour 30 % de biopsies de patients atteints de fibrillations auriculaires idiopathiques, l'analyse histologique indique la présence de cellules nécrosées et de cellules ayant un aspect morphologique susceptible d'être à l'origine d'une réponse auto-immune de

Introduction

l'organisme (Frustaci et al., 1997). Une infiltration de cellules lymphocytaires est d'ailleurs observée dans ces tissus (Frustaci et al., 1997). L'identification récente du récepteur 5-HT₄ cardiaque auriculaire suggère la possibilité d'une nouvelle cible potentielle pour des auto-anticorps présents dans le sérum de patients ayant des troubles du rythme auriculaire.

Avant d'étudier cette hypothèse, nous allons présenter dans une revue bibliographique le récepteur 5-HT₄ cardiaque au sein de la superfamille à laquelle il appartient : les récepteurs couplés aux protéines G. Nous élargirons également notre présentation sur les récepteurs couplés aux protéines G cardiaques en spécifiant leur voie de transduction utilisée telle que la voie de l'AMPc ainsi que les effecteurs ciblés tel que le canal calcique de type L. Ces données nous permettront ensuite de mieux comprendre l'implication possible de ce récepteur dans la genèse ou le maintien de fibrillations auriculaires. Il sera également présenté son intervention dans certaines maladies auto-immunes menant à des conséquences physiopathologiques cardiaques.

Nos résultats seront ensuite présentés dans une partie Résultats-Discussion. Pour cette étude, un anticorps (anticorps anti-G21V) a été produit après immunisation d'un lapin avec le peptide G21V mimant la seconde boucle extracellulaire du récepteur 5-HT₄ humain cardiaque. L'objectif de ce travail a été de comparer l'activité fonctionnelle de cet anticorps polyclonal sur le récepteur 5-HT₄ humain cardiaque recombinant exprimé dans des systèmes d'expression tels que les cellules COS-7 et les cellules CHO et exprimé dans les myocytes atriaux humains. Ceci, afin de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles d'une composante auto-immune dirigée contre le récepteur 5-HT₄. Pour cela, le dosage du second messager, l'AMPc, a été effectué pour les cellules COS-7, CHO et les cardiomyocytes, afin d'être comparé aux études réalisées par Sallé et al., 2001. Celui-ci avait mesuré l'activité du courant I_{Ca2+,L} sur des cardiomyocytes atriaux humains, après fixation de l'anticorps anti-G21V suivi d'une stimulation sérotoninergique. Dans un second temps, une étude fonctionnelle du récepteur 5-HT₄ exprimé dans les cardiomyocytes humains a été réalisée en mesurant la production d'AMPc et l'activité du courant I_{Ca2+,L} après des stimulations sérotoninergiques et β-adrénergiques. Cette étude avait pour but de s'interroger sur le rôle fonctionnel du récepteur 5-HT₄. Enfin, ce travail a consisté en une détection de la présence d'auto-anticorps dans le sérum de patients atteints de fibrillations auriculaires idiopathiques. Il a ensuite été suivi par la recherche d'effets fonctionnels de ceux-ci sur le récepteur 5-HT₄ humain exprimé dans les myocytes atriaux humains. Cette étude a également été réalisée par l'intermédiaire de la mesure d'AMPc et de l'activité du I_{Ca,L}.

Introduction

Nous concluerons en résumant les informations qu'apportent ces données sur le récepteur 5-HT₄ et son implication dans la genèse et/ou le maintien de fibrillations auriculaires. Ces résultats nous permettront de formuler des hypothèses sur le mécanisme d'action fonctionnel d'un anticorps anti-5-HT₄ ainsi que sur l'intervention fonctionnelle du récepteur dans les fibrillations auriculaires.

Table des figures-Revue bibliographique

Figure 1 : Anatomie du cœur humain adulte.....15

Figure 2 : Myocyte cardiaque ventriculaire isolé.....16

Figure 3 : Tissu de conduction et propagation dans le myocarde ventriculaire à partir du pacemaker situé dans le nœud sinusal.....17

Figure 4 : Système nerveux autonome.....18

Figure 5 : Représentation d'un ECG20

Figure 6 : Transport du calcium et couplage excitation-contraction à 37°C dans une cellule cardiaque.....21

Figure 7 : Mécanisme de glissement des myofilaments suite à une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$23

Figure 8 : Raccourcissement d'un sarcomère lors de la contraction24

Figure 9 : Diversité des molécules activant les récepteurs couplés aux protéines G.....25

Figure 10 : Classification des récepteurs couplés aux protéines G.....26

Figure 11 : Diversité des protéines G existantes et classées en fonction de leur sensibilité aux toxines CTX ou PTX.....28

Figure 12 : Modèle du complexe ternaire.....30

Figure 13: Modèle étendu aux deux formes R et R*.....30

Figure 14 : Modèle cubique allostérique général.....31

Figure 15 : Modèle d'activation des protéines G.....32

Figure 16 : Courbe dose-effet de l'action des ligands sur la proportion de récepteurs couplés à la protéine G (ou actif).....32

Figure 17 : Probabilité de générer une force rotationnelle sur le segment TM7 du récepteur 5-HT₂R.....34

Figure 18: Désensibilisation des récepteurs à sept segments transmembranaires.....38

Figure 19 : Transduction du signal à partir des récepteurs β-adrénergiques et M2 muscariniques cardiaques.....42

Figure 20: Distribution tissulaire humaine des ARN m du récepteur 5-HT₄ détectés par RT-PCR.....46

Figure 21 : Modélisation du récepteur 5-HT₄47

Figure 22: Isoformes cardiaques du récepteur 5-HT₄ et sites potentiels de phosphorylation, glycolysation et palmitoylation.....48

Figure 23 : Transduction du signal du récepteur 5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains et rôle possible dans la génération d'arythmies.....	49
Figure 24 : Structure chimique des molécules antagonistes GR113808 et ML10375 spécifiques du récepteur 5-HT₄.....	50
Figure 25 : Représentation plane d'une molécule d'AMP cyclique.....	51
Figure 26 : Représentation schématique des adénylates cyclases de mammifères.....	52
Figure 27 : Modèle de fonctionnement d'un complexe AKAP18/15-PKA associé au canal calcique de type L au niveau de la membrane plasmique d'une cellule cardiaque.....	54
Figure 28 : Chemin de transduction des RCPG dans une cellule de mammifère menant à l'activation du facteur de transcription CREB activant l'élément de réponse CRE sur l'ADN.....	55
Figure 29 : Structure d'un récepteur Ryanodine RyR.....	59
Figure 30 : Etincelle calcique ou <i>spark</i> au sein d'un complexe récepteur DHP/récepteur RyR.....	61
Figure 31 : Sous-unité α_1 du canal calcique de type L, ses sites de régulation, ses domaines (I à IV) et ses segments (S1 à S6).....	67
Figure 32 : Physiopathologie de la fibrillation auriculaire : une anarchie dans l'oreillette cardiaque humaine.....	80

I-L'activité cardiaque

A-Rappels anatomiques et histologiques

Le cœur est un muscle composé de deux parties séparées par le septum, le cœur droit et le cœur gauche (figure 1). Ces derniers sont constitués chacun d'une oreillette et d'un ventricule. L'épaisseur de la paroi de ces cavités est proportionnelle à l'activité mécanique développée. Ainsi, la paroi des oreillettes est plus mince que celle des ventricules. De même, pour le ventricule droit par rapport au ventricule gauche, étant donné qu'il travaille contre des résistances plus faibles. Lors de certaines cardiopathies congénitales, ce ventricule doit éjecter du sang vers des régions dont les résistances pulmonaires sont élevées. La paroi de cette cavité peut alors s'épaissir.

Le sang circule du cœur gauche vers le cœur droit. L'existence de valves entre les oreillettes et les ventricules abolit le reflux sanguin. Elles s'ouvrent vers la cavité ventriculaire empêchant le reflux vers les oreillettes (figure 1C). Ces valves sont fibreuses et sont attachées à des piliers musculaires qui leur assurent une ouverture synchrone. Les orifices pulmonaires et aortiques possèdent également un système de valves. Le sang artériel ne peut donc plus revenir dans les ventricules.

Le cœur est formé d'artères et de veines dites coronaires. Les artères coronaires sont les premières de l'arbre vasculaire, et les veines, les dernières du système veineux. Les artères coronaires sont au nombre de deux, les artères coronaires droite et gauche. Elles prennent naissance dans le creux des valves sigmoïdes aortiques antérieures. Puis, elles circulent à la surface du myocarde et plongent dans l'épaisseur du muscle irriguant ainsi le cœur de l'extérieur vers l'intérieur (figure 1). L'artère coronaire droite est présente essentiellement dans le ventricule droit et à la face inférieure du cœur. Alors que, l'artère coronaire gauche assure la vascularisation de la majorité du myocarde. Les veines coronaires se réunissent en un tronc unique qui se déverse dans le sinus coronaire de l'oreillette droite.

Une coupe transversale du cœur montre qu'il est formé de 3 types de tissus: le péricarde, le myocarde et l'endocarde (figure 1B). *Le péricarde* enveloppe le cœur et le début des gros vaisseaux (artère pulmonaire et aorte). Il est formé de cellules épithéliales et de tissu conjonctif. *L'endocarde* est situé sur la face interne du cœur en contact direct avec le sang. Il tapisse les cavités cardiaques, les valves et les cordages. Il est constitué par un endothélium qui se poursuit avec celui des vaisseaux.

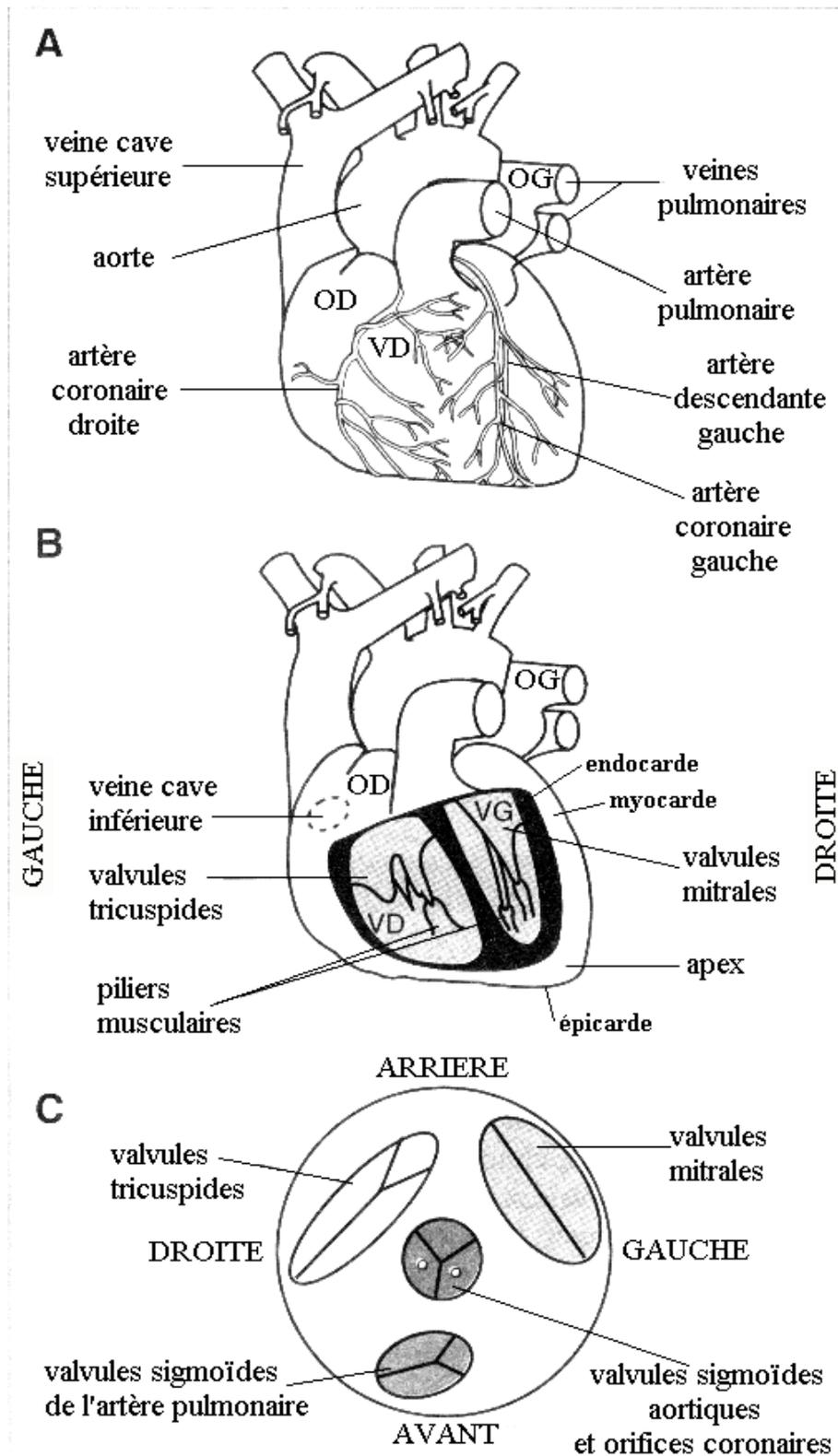


Figure 1 : Anatomie du cœur humain adulte.

OD, OG : oreillettes droite et gauche. VD, VG : ventricules droit et gauche. A) face antérieure du cœur tel qu'il est dans la cage thoracique B) face antérieure vue en coupe C) vue de dessus. Les oreillettes ont été enlevées faisant apparaître les deux ventricules, valves intactes. Reproduit et modifié d'après Swynghedauw, 1995.

Le myocarde forme la paroi du cœur. Il est composé d'environ 50 % de cellules musculaires striées ou myocytes (figure 2), et 50 % de cellules fibroblastiques, endothéliales et vasculaires (Guénard, 1996). Les myocytes étant des cellules de grande taille, ils occupent 80 % du volume tissulaire.

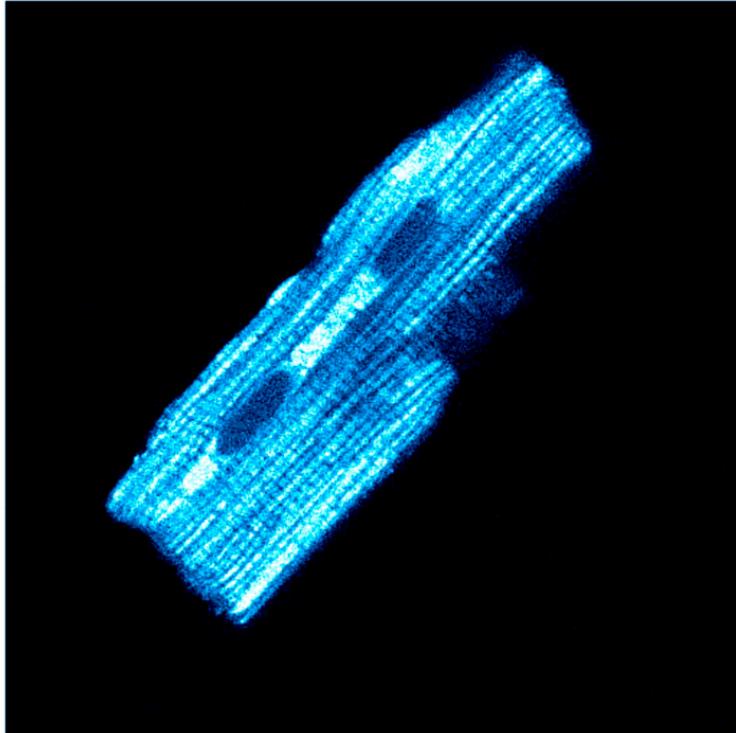


Figure 2 : Myocyte ventriculaire cardiaque isolé.

source : http://www.physiology.wisc.edu/walker/photo_gallery.htm

B-Innervation cardiaque et tissu de conduction

Le cœur est doué d'une activité contractile autonome. En effet, il peut continuer à battre lorsqu'il est isolé de l'organisme. Cette activité est assurée grâce au tissu de conduction (figure 3). Il est composé du nœud sinusal, centre arythmogène ou « pacemaker ». Ce dernier envoie spontanément une impulsion électrique, qui se propage dans tout le cœur par des voies privilégiées tels que le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His et le réseau de Purkinje (figure 3).

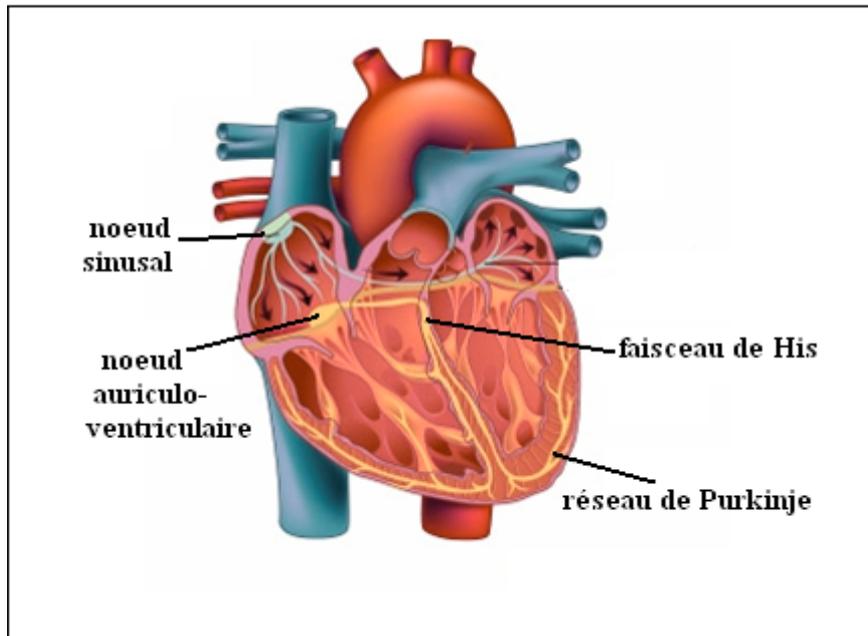


Figure 3 : Tissu de conduction et propagation à partir du pacemaker situé dans le nœud sinusal.
Reproduit et modifié d'après Matthews
Source : <http://www.blackwellpublishing.com/matthews/>

Le nœud sinusal est présent sur le pourtour intracavitaire de la veine cave supérieure. Alors que le nœud auriculo-ventriculaire (d'Aschoff-Tawara) est à la jonction de l'oreillette droite et du septum proche des valves auriculo-ventriculaires. Il se prolonge par le faisceau de His dans le septum et se divise en deux branches, longeant chacune un ventricule. Ce système de conduction se termine par le réseau de Purkinje.

Les innervations sympathique et parasympathique (ou vagale) (figure 4) constituent le système nerveux autonome. Elles permettent l'adaptation du myocarde aux signaux extérieurs. Ces connections nerveuses se propagent sur quatre niveaux différents : un niveau central, préganglionnaire, postganglionnaire et périphérique.

- L'étage central est formé par le cortex (CNS = système nerveux central) et les arcs réflexes médullaires
- L'étage préganglionnaire est constitué par des cellules nerveuses du système sympathique et parasympathique qui sécrètent de l'acétylcholine. Ce neurotransmetteur agit sur les récepteurs nicotiques présents à la surface des cellules postganglionnaires. A ce niveau,

les fibres nerveuses sont blanches et myélinisées. L'étage préganglionnaire du système sympathique cardiaque est situé dans la moelle thoracique. Alors que pour le système parasympathique, il est présent dans le bulbe rachidien.

- Au niveau postganglionnaire, les systèmes sympathique et parasympathique débutent respectivement dans un ganglion cervical inférieur, le ganglion stellaire et terminent dans l'organe cible, le myocarde
- Au niveau périphérique, le neurotransmetteur libéré varie suivant le système stimulé. Pour le système sympathique, la noradrénaline ou norépinéphrine est sécrétée et agit sur les récepteurs β -adrénergiques présents à la surface des myocytes.
- Pour le système parasympathique, l'acétylcholine sera libérée et transmettra l'information aux cellules cardiaques via les récepteurs muscariniques.

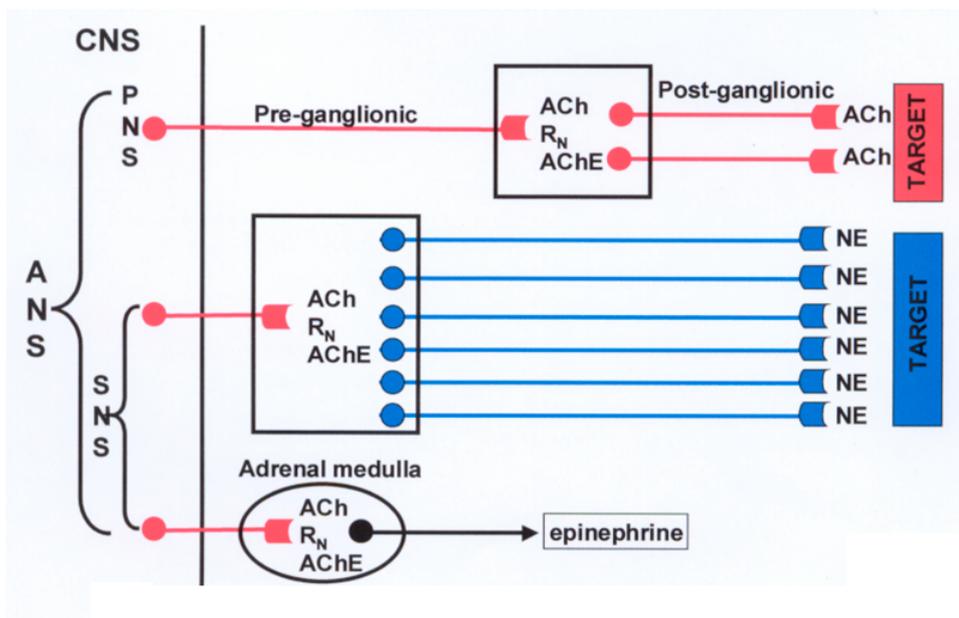


Figure 4 : Système nerveux autonome.

(target : cœur), NE : norépinéphrine, ACh : acétylcholine, R_N : récepteurs nicotiniques, AChE : acétylcholinestérase, SNS : système nerveux sympathique, PNS : système nerveux parasympathique, ANS : système nerveux autonome, CNS : système nerveux central.

Reproduit et modifié, Source : http://www.muhealth.org/~pharm204/autonomic_drugs.html

La stimulation de la branche droite du nerf vague ralentit le cœur en agissant sur le nœud sinusal. Alors que celle du nerf vague gauche agit sur la conduction auriculo-ventriculaire. De même pour le ganglion stellaire, où la stimulation du ganglion droit accélère le cœur et celle du gauche améliore la conduction auriculo-ventriculaire.

C-Activation de la contraction

La contraction cardiaque est déclenchée par les potentiels d'action qui reflètent l'activité électrique du cœur. La transformation du signal électrique en activité mécanique est assurée grâce au mécanisme de couplage excitation-contraction, dont l'élément majeur est le calcium.

1-Potentiel d'action

Le potentiel d'action (PA) est la résultante d'une variation brutale de la différence de potentiels entre les deux faces de la membrane plasmique. Cette inversion de polarité membranaire est la conséquence d'une modification transitoire de la perméabilité de la membrane aux principales espèces ioniques : le sodium, le calcium et le potassium.

Le PA dans le myocarde comprend cinq phases, numérotées de 0 à 4 (figure 5). La phase (0) correspond à une dépolarisation brutale de la membrane due à l'ouverture des canaux sodiques et donc à l'entrée d'ions Na^+ dans les cellules. Puis, survient une phase de repolarisation (1) liée à l'inactivation des ces canaux ainsi qu'à l'ouverture des canaux potassiques transitoires sortants (I_{to}) et retardés (I_k). Cette repolarisation est contre-balançée par une nouvelle dépolarisation provenant de la stimulation des canaux calciques de type L ($I_{Ca2+,L}$). Ils créent un courant entrant de calcium responsable de la formation d'un plateau, caractéristique du myocarde (2). L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ participe au maintien de cette phase. Son sens de fonctionnement dépend des concentrations intra- et extra-cellulaires en calcium et en sodium. Il permet donc la sortie d'un ion calcium des cellules et l'entrée de trois ions sodium. Un courant net entrant est donc créé entretenant la dépolarisation membranaire. La repolarisation cellulaire finale (3) est liée à l'activation tardive des canaux potassiques retardés (I_K) conduisant la membrane vers une courte phase d'hyperpolarisation. Les canaux potassiques rectifiés entrants I_{K1} sont ensuite activés permettant un retour du potentiel membranaire vers son potentiel initial de repos (4).

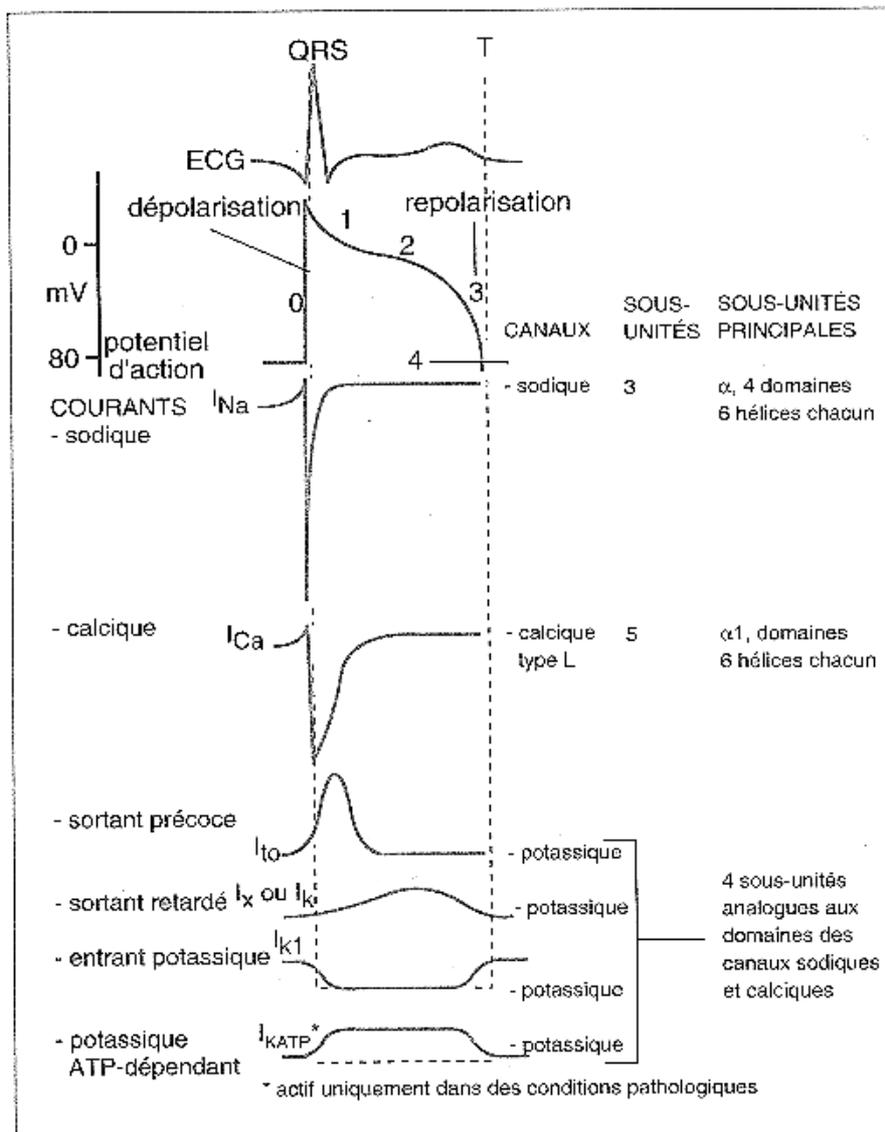


Figure 5 : Représentation d'un ECG.
Des phases d'un potentiel d'action (PA) et des courants intervenant dans la genèse d'un PA.
 Reproduit, d'après Swynghedauw, 1995.

La cellule s'est enrichie en sodium au moment de la phase 0 du PA et s'est appauvrie en K^+ lors de l'hyperpolarisation. La pompe ATPase Na^+/K^+ , ou pompe à sodium, permet le rétablissement de l'équilibre ionique. 3 ions Na^+ sortiront de la cellule contre 2 ions K^+ qui entreront. Cette enzyme joue également un rôle majeur dans l'homéostasie calcique. En effet, l'échangeur Na^+/Ca^{2+} est lui-même sous le contrôle de la concentration intracellulaire en sodium. L'échangeur Na^+/Ca^{2+} et la pompe Na^+/K^+ ATPase sont donc fonctionnellement couplés.

2-Couplage excitation-contraction

Le calcium joue un rôle de messager intracellulaire universel. En 1883, Ringer a remarqué qu'un cœur de grenouille dépourvu de calcium extracellulaire cessait de battre. Le calcium provient soit du milieu extracellulaire, soit d'un réservoir intracellulaire, le réticulum sarcoplasmique (RS) (figure 6).

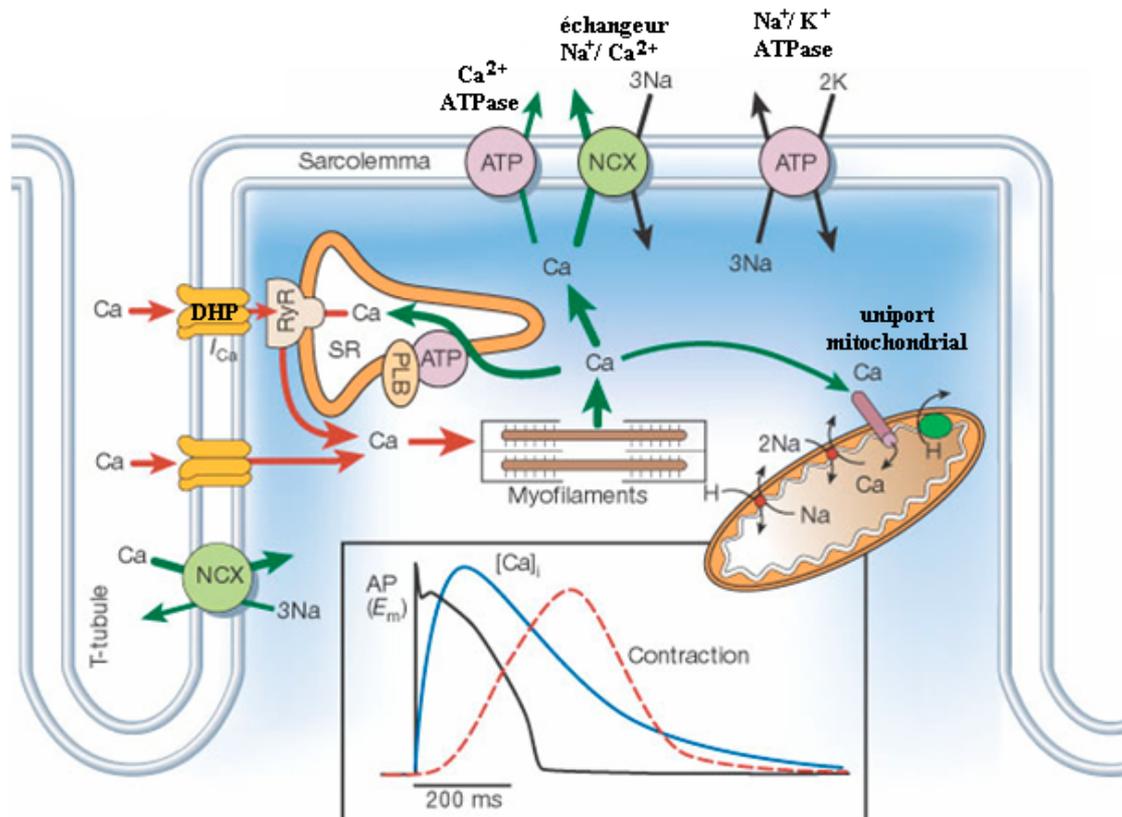


Figure 6 : Transport du calcium et mécanisme de couplage excitation-contraction dans une cellule cardiaque humaine.

PLB : phospholambane ; SR : réticulum sarcoplasmique ; RyR : récepteur de la ryanodine ; DHP : récepteur dihydropyridines ; NCX : échangeur Na⁺/Ca²⁺. Reproduit et modifié, d'après Bers, 2002.

La stimulation électrique d'une cellule cardiaque provoque l'activation des canaux calciques de type L, nommés récepteurs aux dihydropyridines (R-DHP), situés dans des invaginations membranaires, les tubules-T (Bers, 2002). Par un mécanisme de CICR (Calcium induced-Calcium release), l'entrée de calcium induit la libération du Ca²⁺ contenu dans le réticulum sarcoplasmique (Fabiato, 1983 et 1985). En effet, les ions calciques

entrant se fixent sur le récepteur de la ryanodine (RyR) présent dans la membrane du RS, provoquent l'ouverture de ce canal et induisent une sortie de calcium du RS. Dans le cœur, il ne semble pas exister de lien structural entre les récepteurs DHP et les récepteurs RyR, contrairement aux muscles striés squelettiques. Le calcium ainsi libéré dans le cytoplasme pourra se lier aux protéines contractiles situées au niveau des myofilaments et engendrer une contraction musculaire.

3-Appareil contractile

La contraction d'un muscle est due au glissement des myofilaments les uns par rapport aux autres. Ces filaments sont de deux types : *les filaments fins* composés d'actine, de tropomyosine et de troponines et *les filaments épais* formés de myosine (figure 7). Un filament épais se trouve dans un berceau de six filaments minces.

Un filament fin ressemble à un collier de perles dont les perles sont les molécules d'actine et le cordon la tropomyosine (figure 7). Dans les muscles striés, ces filaments portent également le complexe troponine disposé sur les molécules d'actine suivant un intervalle régulier de 40 nm. IL est composé de trois protéines, les troponines I, C et T (figure 7). La troponine T lie le complexe à la tropomyosine. La troponine I, en l'absence de calcium, inhibe l'interaction entre les molécules d'actine et les têtes de myosine. Et enfin, la troponine C fixe le calcium, lève l'inhibition apportée par la troponine I et favorise la contraction musculaire (figure 7).

Les filaments épais sont composés de 300 à 400 molécules de myosine. Ces molécules sont en forme de *canne de hockey*. La crosse, ou tête de myosine, possède une activité ATPasique et interagit avec l'actine formant ainsi les ponts acto-myosines. Le manche constitue le corps du filament épais (figure 7).

Lors d'une excitation électrique, le calcium libéré du RS augmente l'affinité d'interaction entre les protéines contractiles et stimule l'activité ATPasique de la myosine (Bers, 2001 ; Fukuda et al., 2001). Les ponts acto-myosines s'établissent et les myofilaments peuvent glisser les uns par rapport aux autres (figure 7).

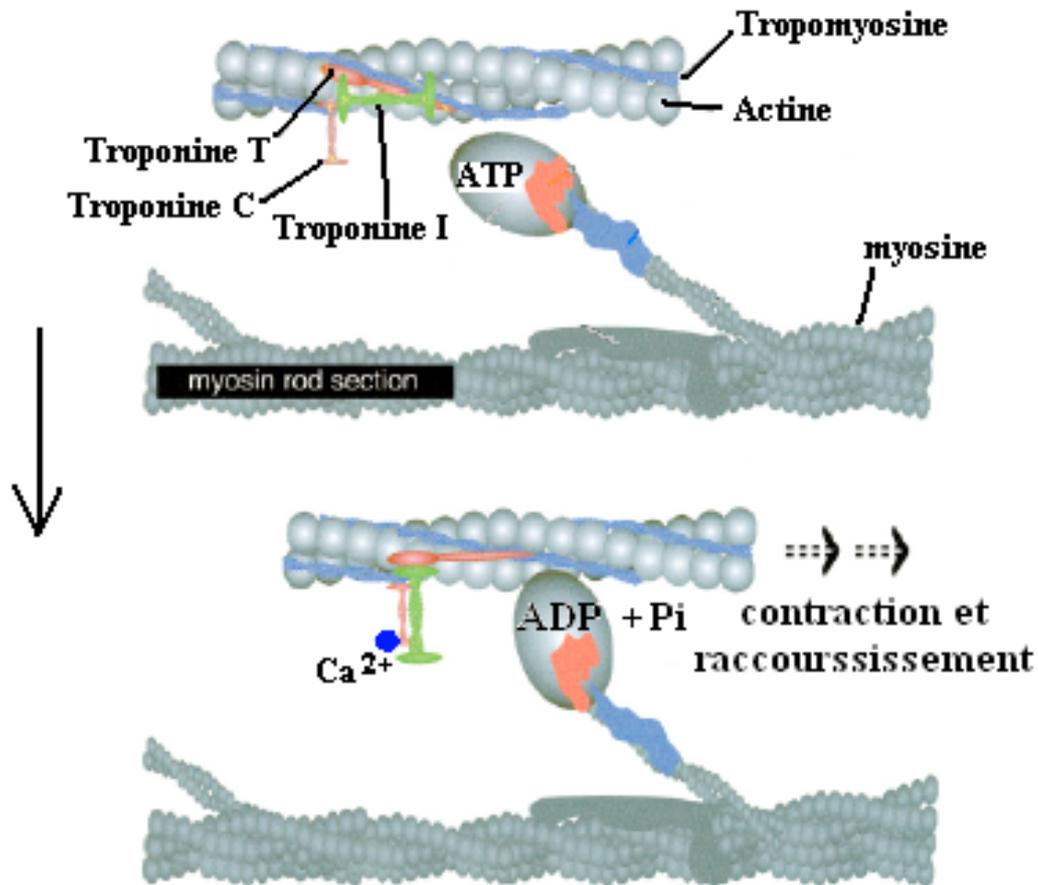


Figure 7 : Mécanisme de glissement des myofilaments suite à une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$. Reproduit et modifié d'après De Tombe, 2003.

La plus petite portion d'un muscle appelé à se raccourcir est le sarcomère (figure 8). Il est délimité par deux stries Z. Lors du glissement des myofilaments, ces stries se rapprochent (figure 8) ainsi que les filaments minces. Dans des situations extrêmes, ces derniers peuvent également se chevaucher (Alberts et al., 1994 ; Guénard, 1996).

RACCOURCISSEMENT DU SARCOMERE

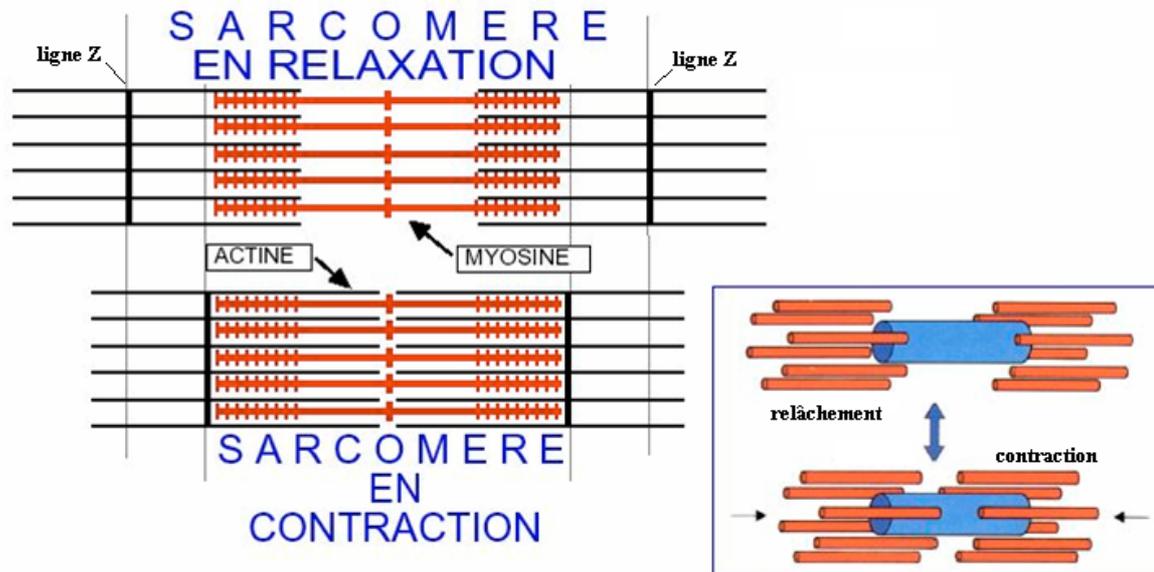


Figure 8 : Raccourcissement d'un sarcomère lors de la contraction.
 Source : <http://homepage.mac.com/danielbalus/teaching.html>

4- Mécanisme de relaxation

Après une contraction, le calcium ressort de la cellule grâce à l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et la pompe ATPase calcique situés dans la membrane plasmique. Il est également recapté dans le RS par une Ca^{2+} ATPase nommée SERCA et dans la mitochondrie à l'aide d'un uniport calcique (figure 6). L'importance de ces voies est différente suivant les espèces animales (Bassani et al., 1994 ; Bers, 2001). L'équilibre intracellulaire calcique étant rétabli, les fibres musculaires se relaxent et reviennent à un état de repos. Ces effets relaxants sont appelés effets lusitropes.

La Ca^{2+} ATPase de la membrane plasmique est activée par le complexe Ca^{2+} /calmoduline. Suite à une augmentation de la concentration de calcium cytosolique, le Ca^{2+} se fixe sur la calmoduline. Puis, ce complexe se lie à la Ca^{2+} ATPase et l'active.

L'ATPase SERCA présente dans la membrane du RS est inhibée dans une cellule au repos par le cofacteur, le phospholambane. Suite à une stimulation, ce facteur est phosphorylé par la protéine kinase PKA. La protéine SERCA n'est donc plus bloquée et peut permettre le repompage du calcium dans le RS. Ce processus nécessite beaucoup d'énergie étant donné

que l'entrée de calcium dans le RS va à l'encontre du gradient de concentration calcique (Bers, 2002).

II- Les Récepteurs couplés aux protéines G

A-Généralités

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment la plus grande famille de récepteurs membranaires. Il existe environ 200 types de RCPG, sans compter les récepteurs olfactifs, dont le nombre est à lui seul estimé entre 400 et 1000 récepteurs différents. Ces récepteurs sont constitués d'une chaîne polypeptidique unique qui traverse sept fois la bicouche lipidique et sont constitués de trois boucles extracellulaires (E1, E2 et E3) ainsi que trois boucles intracellulaires (I1, I2 et I3)(figure 9).

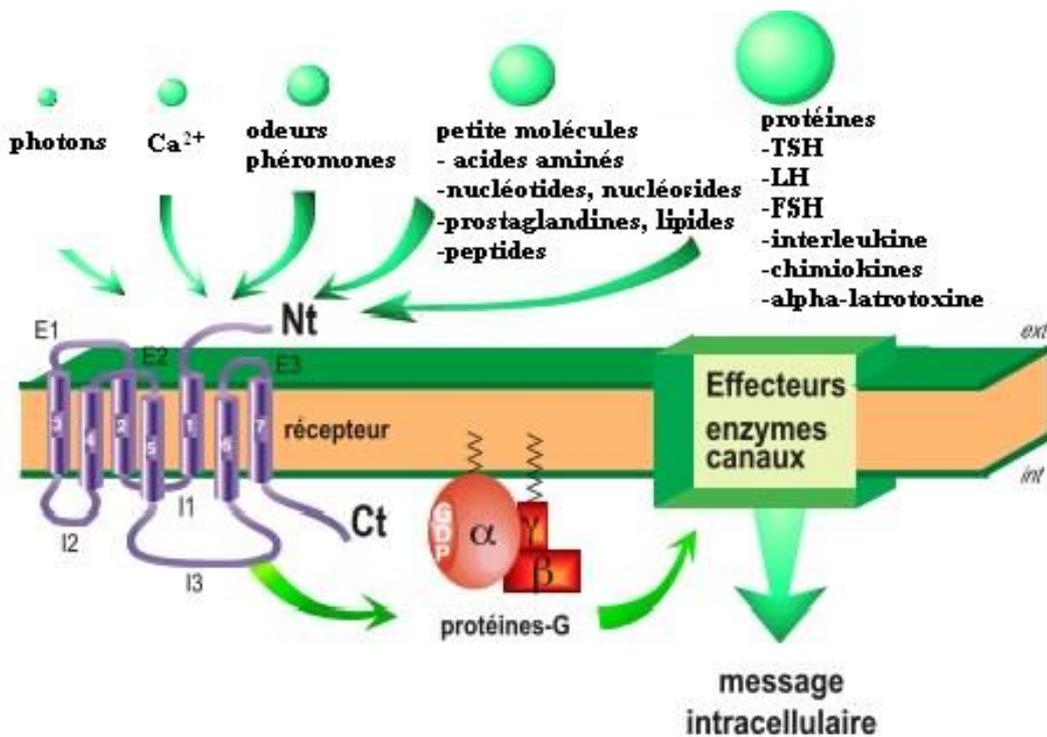


Figure 9 : Diversité des molécules activant les récepteurs couplés aux protéines G.

Nt : extrémité amino-terminale ; Ct : extrémité carboxy-terminale ; E1-3 : boucles extracellulaires ; I1-3 : boucles intracellulaires.

Reproduit et modifié d'après Bockaert et Pin, 1999.

Ces récepteurs participent aux réponses cellulaires via des molécules informatives d'une grande diversité (Strader et al., 1994 ; Ji et al., 1998 ; Bockaert et Pin, 1999 ; Gether, 2000). Ces ligands peuvent être des protéines, des peptides, des acides aminés, des acides

gras.....(figure 9). La fonction de ces molécules varie autant que leur structure (Gether, 2000). Malgré la diversité des ligands, les récepteurs couplés aux protéines G ont une structure tertiaire similaire (Palczewski et al., 2000). Ces récepteurs sont probablement issus d'un ancêtre commun et ont été conservés au cours de l'évolution (Gilman, 1987 ; Birnbaumer et al., 1990 ; Gudermann et al., 1997 ; Bockaert & Pin, 1999).

La stimulation des RCPG par des signaux extracellulaires déclenchent une cascade d'évènements modifiant la concentration d'une ou de plusieurs petites molécules qualifiées de médiateurs intracellulaires, appelées aussi messagers intracellulaires ou second messagers. Les seconds messagers les plus importants sont l'AMP cyclique (AMPC) et les ions calcium (Ca^{2+}).

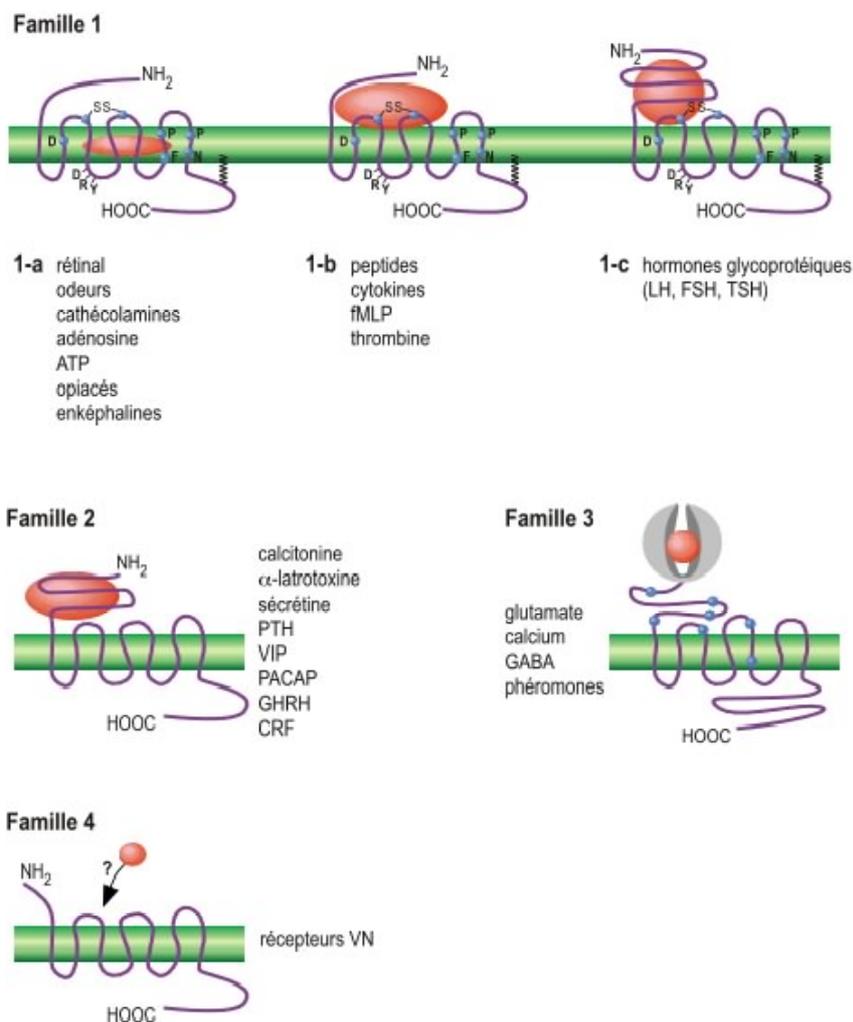


Figure 10 : Classification des récepteurs couplés aux protéines G

fMLP : formyl Met-Leu-Phe ; LH : luteinizing hormone ; FSH : follicule stimulating hormone ; TSH : thyroïd stimulating hormone ; PTH : parathyroïd hormone ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; PACAP : pituitary adenylyl cyclase activating peptide ; GNRH : growth hormone releasing hormone ; CRF : corticotropin releasing hormone ; GABA : gaba-amino-butyric acid ; VN : vomeronasal pheromone.

Reproduit d'après Bockaert et Pin, 1999.

La superfamille des RCPG est classée en 4 groupes en fonction de leur structure et du site d'interaction du ligand (figure 10) (Bockaert et Pin, 1999).

Le groupe 1 comprend les récepteurs qui ont la séquence DRY (acide aspartique, arginine, tyrosine) au niveau de la boucle intracellulaire 2, le pont disulfure entre les boucles extracellulaires E1 et E2 et des acides aminés conservés au sein des différentes hélices. Ce groupe est subdivisé en 3 sous-groupes en fonction du site de fixation du ligand : sous-groupes 1a, 1b et 1c.

Les groupes 2, 3 et 4 rassemblent les RCPG ne possédant ni la séquence DRY, ni le pont disulfure. Une classification a été ensuite faite en fonction des données établies sur le site de fixation du ligand.

L'interaction ligand-récepteur induit l'activation des protéines G hétérotrimériques. Une distorsion conformationnelle de ces protéines serait observée et provoquée par l'énergie de liaison développée lors de l'interaction récepteur/protéine G (Yeagle & Albert, 2003). Une protéine G est composée de trois sous-unités différentes, appelées α , β et γ (figure 9). Chaque sous-unité comporte des sous-types différents : 15 pour la sous-unité α , 6 pour la sous-unité β et 12 pour la sous-unité γ (Rockman et al., 2002). L'intervention fondamentale de ces protéines a été confirmée par l'attribution du prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1994, aux Professeurs A. Gilman et M. Rodbell pour leur découverte des protéines G et de leur rôle dans la transduction du signal cellulaire.

La sous-unité α confère à la protéine G sa spécificité. Ainsi α_s et α_i caractérisent respectivement les protéines G_s et G_i impliquées dans le contrôle de l'activité des adénylates cyclases. La sous-unité α lie et hydrolyse le GTP (Bockaert & Pin, 1998 ; Morris & Malbon, 1999). Les chaînes β et γ forment un complexe ($\beta\gamma$), qui ancre la protéine G à la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Cette fixation a lieu, au moins en partie, grâce à une chaîne lipidique liée covalamment à la sous-unité γ (figure 9). Dans sa forme inactive, la protéine G existe sous une forme trimérique et la sous-unité α porte une molécule de GDP (figure 9). Lorsqu'elle est activée, suite à la liaison avec un récepteur, la sous-unité α échange son GDP contre un GTP et se sépare du complexe $\beta\gamma$. α_s se lie alors directement avec les adénylates cyclases, les active et induit une production d'AMPc. Pour les protéines G_i , la sous-unité α_i inhiberait les adénylates cyclases. Le complexe $\beta\gamma$ participerait également à l'inhibition de la production d'AMPc. Deux processus sont envisagés. Ce complexe inhibe soit directement les adénylates cyclases, soit indirectement en s'associant avec les sous-unités

α_s libres dans la même cellule. Les sous-unités α_s et α_i ont donc des actions opposées sur le même effecteur.

La sensibilité des protéines G_s et G_i vis à vis de certaines toxines sont différentes. La protéine G_s est sensible à la toxine cholérique (CTX). Elle est produite par l'agent responsable du choléra *vibrio cholerae* et active G_s conduisant ainsi à une stimulation continue de l'adénylate cyclase entraînant une accumulation d'AMPc dans les cellules. La protéine G_i est insensible à la toxine cholérique. Toutefois, elle est sensible à la toxine pertussique (PTX). Cette toxine est produite par *Bordetella pertussis*, agent responsable de la coqueluche. La PTX stabilise la protéine G_i dans sa conformation trimérique $\alpha\beta\gamma$ et bloque donc son action. Ces drogues sont utilisées expérimentalement pour caractériser les protéines G. Elles ont permis une classification suivant leur sensibilité à ces substances. Les protéines G sont sensibles soit à la toxine cholérique, soit à la toxine pertussique, ou aux deux toxines. Quatre groupes ont été proposés: les groupes $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$ (figure 11). L'action de ces différentes protéines G sur les RCPG a été répertoriée dans la revue de Seifert & Wenzel-Seifert, 2002.

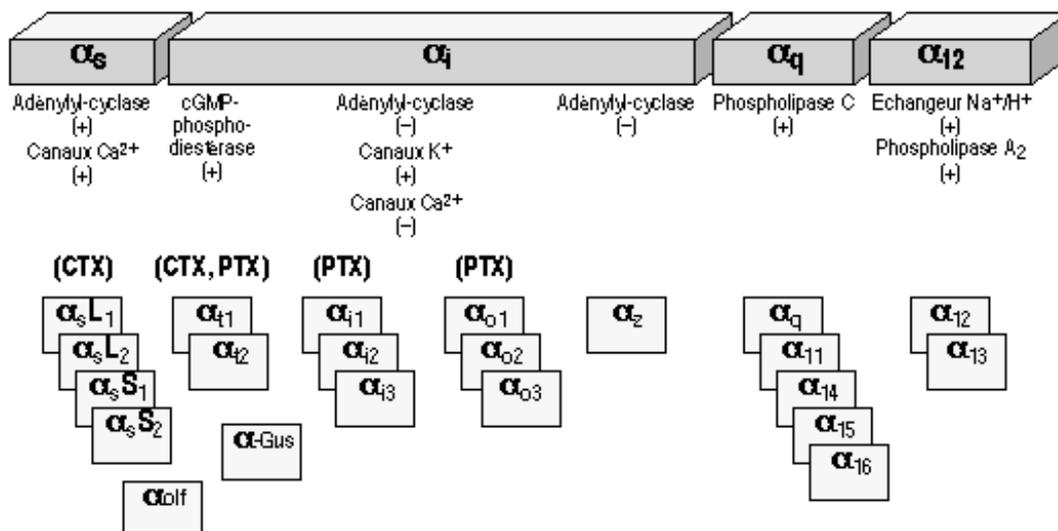


Figure 11 : Diversité des protéines G. Classification en fonction de leur sensibilité aux toxines CTX ou PTX.

Source : <http://www.123bio.net/cours/liaison/partie46.html>

La classe $G\alpha_s$ comporte des protéines G sensibles à la CTX et stimulatrices de l'adénylate cyclase. Ce groupe est composé de quatre types de sous-unités α_s issues d'un épissage alternatif, et d'une sous-unité α_{olf} propre à une protéine G spécifique de l'épithélium olfactif.

La classe $G_{\alpha_{i/o}}$ est composée de protéines G inhibitrices de l'adénylate cyclase. Elle comprend les sous-unités α de deux transducine t_1 et t_2 présentes dans les bâtonnets et les cônes de la rétine, de trois protéines G_i (α_i), de trois protéines G_o (α_o , "o" pour : other) et d'une protéine G_z (α_z). Les protéines α_i sont sensibles à la CTX et la PTX. Alors que, les protéines α_i et α_o sont sensibles à la PTX uniquement. Aucune sensibilité n'a été définie pour la protéine α_z .

La classe $G_{\alpha_{q/11}}$ est composée de protéines G activant la phospholipase C. Elle est constituée de quatre protéines : G_{α_q} , $G_{\alpha_{11}}$, $G_{\alpha_{14}}$, $G_{\alpha_{15}}$, $G_{\alpha_{16}}$.

Enfin, la classe $G_{\alpha_{12}}$ est constituée par des protéines G activant l'échangeur Na^+/H^+ et la phospholipase A2. Elle comporte les sous unités $G_{\alpha_{12}}$ et $G_{\alpha_{13}}$.

Pour les classes $G_{\alpha_{q/11}}$ et $G_{\alpha_{12}}$, aucune sensibilité aux toxines n'a été déterminée.

Les protéines G dominantes dans le cœur sont les protéines G_s , $G_{i/o}$, et G_q (Brodde et al., 1995 ; Jalili et al., 1999).

B-Modèle thermodynamique de l'activation des RCPG

1-De la théorie de l'occupation des récepteurs au modèle cubique ternaire allostérique

Le modèle cubique ternaire allostérique provient de l'accumulation de modèles simplifiés basés sur l'interaction entre un ligand et son récepteur. La présentation de ce modèle est basée sur l'étude de Fong en 1996.

Suivant la théorie de l'occupation des récepteurs élaborée par Hill en 1910, un ligand se lie à un récepteur et forme un complexe. Si ces ligands sont des antagonistes ou des agonistes, les complexes formés sont respectivement inactifs et actifs. Ce modèle a rapidement évolué vers un modèle à deux états grâce aux travaux de Del Castillo et Katz en 1957, réalisés sur les récepteurs canaux. Ces auteurs ont suggéré qu'un complexe inactif pouvait devenir actif grâce à un changement de conformation. Cette proposition a été complétée par Monod en 1965. Il stipulait que les récepteurs en absence de ligand pouvaient être présents dans la membrane sous deux formes : une forme inactive R et une forme active R^* . Il fut également proposé que les formes R^* sans ligand possédaient une activité constitutive à l'origine d'un niveau basal (Costa & Herz, 1989; Samama et al., 1993; Chidiac et al., 1994). Ce modèle à deux états a été adapté aux récepteurs couplés aux protéines G, en incluant un acteur supplémentaire; la protéine G. Le premier modèle thermodynamique de l'activation des RCPG est le modèle du complexe ternaire (figure 12).

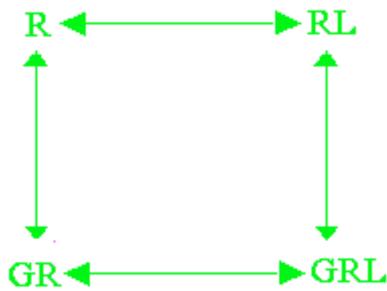


Figure 12 : Modèle du complexe ternaire.
Reproduit et modifié d'après Fong, 1996.

Celui-ci a été complété par les études de Colquhoun en 1987 et ont permis de proposer un modèle étendu aux deux formes R et R* (figure 13). Dans une cellule au repos, les récepteurs sont présents majoritairement sous la forme R dans la membrane. Les agonistes ont une forte affinité pour les formes R*. Leur fixation induit un déplacement de l'équilibre des récepteurs vers la forme R*. Les agonistes inverses ont une forte affinité pour les formes R. Leur liaison induit donc un déplacement des récepteurs vers les formes R. Enfin, un antagoniste ne modifie pas l'équilibre membranaire des récepteurs, car il a la même affinité pour les deux formes R et R*.

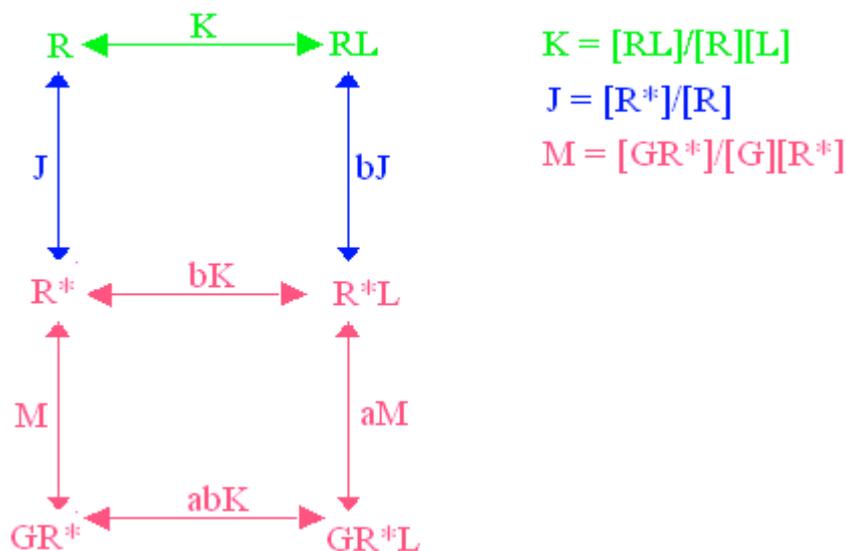


Figure 13: Modèle étendu aux deux formes R et R*.
Reproduit et modifié d'après Fong, 1996.

Dans ce modèle, les protéines G se lient uniquement aux formes R* (figure 13). Cependant, Franke en 1990 a montré, qu'un mutant de la rhodopsine pouvait se lier à une protéine G sans l'activer. Ces travaux ont été confortés par ceux de Costa en 1989, Law en 1993 et Georgoussi en 1995. Il est donc apparu que les protéines G pouvaient se lier aux formes R à l'état basal. Afin d'inclure ces dernières données, un modèle général d'activation des RCPG a été développé (Ballesteros & Weinstein, 1995; Scheer et al, 1996; Fong, 1996; Baldwin et al., 1997; Daeffler & Landry, 2000). Il est représenté par la figure 14 : Modèle cubique allostérique général.

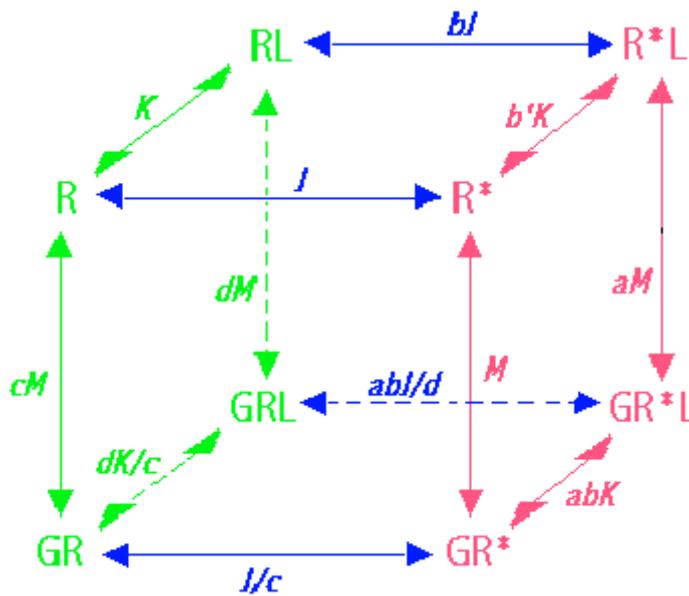


Figure 14 : Modèle cubique allostérique général.

Reproduit et modifié, d'après Fong, 1996. J : constante d'isomérisation des récepteurs; M : constante d'association à la protéine G; K : constante d'équilibre de fixation du ligand; a, b, c, d : multiples en fonction des états du récepteur.

G représente la protéine G hétérotrimérique liée au GDP. Ce modèle général associe trois mécanismes : 1) l'interaction entre le ligand et le récepteur, 2) l'isomérisation des récepteurs et 3) le couplage des récepteurs aux protéines G. Toutes modifications apportées à un processus induira une modification des deux autres. Ces changements peuvent provenir de mutations ou de modifications chimiques. Les équilibres membranaires représentés en pointillés sont théoriquement possibles mais cellulièrement improbables. Le mécanisme d'échange du GDP par le GTP est représenté dans la figure 15.

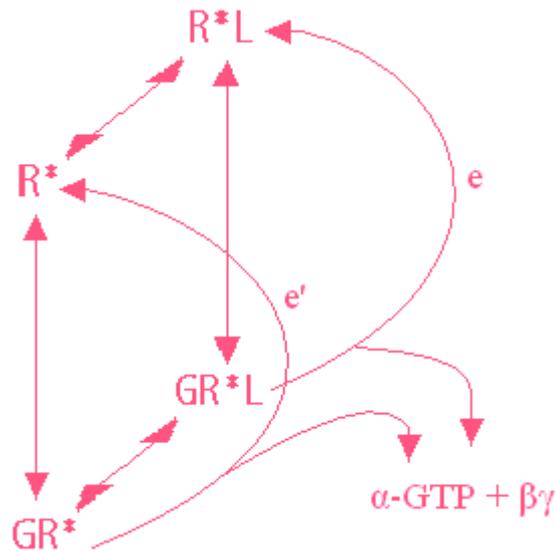


Figure 15 : Modèle d'activation des protéines G.
Reproduit et modifié, d'après Fong, 1996.

Cette représentation décrit également l'efficacité d'un agoniste. Elle est caractérisée par le produit de la constante e et de la concentration de récepteurs complexés $[GR^*L]$. L'efficacité est dépendante du type de ligand (agoniste inverse, antagoniste ou agoniste).

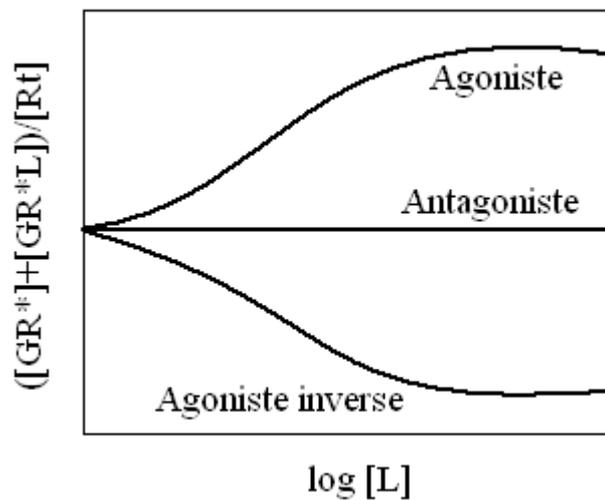


Figure 16 : Courbe dose-effet de l'action des ligands sur la proportion de récepteurs couplés à la protéine G.
Reproduit et modifié, d'après Fong, 1996.

En effet, les proportions de récepteurs couplés aux protéines G est fonction de la nature du ligand fixé (Kenakin et al., 1995). Elles sont illustrées sur la figure 16 en relation avec les concentrations croissantes de ligand L, tendant vers l'infini.

L'application de concentrations croissantes d'agonistes induit une augmentation sigmoïdale du nombre de récepteurs couplés aux protéines G. Alors que, les agonistes inverses provoquent une diminution de ce nombre. Enfin, les antagonistes conservent les mêmes proportions que celles observées à l'état basal sans stimulation. Ces proportions sont corrélées avec les effets fonctionnels observés en présence de ces différentes substances. En effet, les agonistes amplifient le nombre de récepteurs couplés et provoquent une augmentation de l'activité basale intracellulaire. Les antagonistes (ou agonistes neutres) ne modifient pas le nombre de récepteurs couplés et ne changent pas la réponse cellulaire basale. De même pour les agonistes inverses qui diminuent le couplage des récepteurs et diminuent l'activité basale.

Même si toutes ces données servent de bases structurales dans la compréhension du mécanisme d'activation des RCPG, le modèle ternaire allostérique général est considéré maintenant comme un modèle trop simplifié (Kenakin, 1997 et 2001). Actuellement, nous savons que les agonistes stabilisent les récepteurs R* sous plusieurs états, permettant ainsi la stimulation de différentes voies de transduction (Kenakin, 2001). En effet, Ghanouni et al., 2001 ont montré que les formes des récepteurs β_2 -adrénergiques stabilisés par des agonistes entiers ou partiels étaient différentes. De même Clayesen et al., 2001 ont proposé grâce à l'analyse de mutations présentes au niveau de la partie C-terminale et de la boucle intracellulaire 3 de ce récepteur, que le récepteur 5-HT₄ pourrait avoir différentes conformations actives. Cette même équipe a également montré que face à des agonistes inverses, le récepteur 5-HT₄ présentait plusieurs conformations. Trois populations de récepteurs 5-HT₄ ont donc été proposées : R_g, R et R* stabilisés respectivement par un agoniste inverse, un antagoniste et un agoniste (Joubert et al., 2002). La population de récepteurs R_g a été définie en mutant une série d'acides aminés Asp-100/Phe-275/Trp-272 inclus dans la poche hydrophobe. Les substances agonistes inverses ne pouvaient plus se lier. Toutefois, la fixation des agonistes et le processus d'activation du récepteur ont été conservés. L'ensemble de ces données indiquent que les formes R* peuvent exister sous différentes conformations suivant l'agoniste lié. Il est vraisemblable qu'il en soit de même pour la population des récepteurs dits inactifs R (Joubert et al., 2002).

D'un point de vue clinique, les agonistes inverses sont susceptibles de fournir une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des maladies impliquant une activité constitutive de certains récepteurs (Leurs et al., 1998; De Ligt et al., 2000). Une des conséquences de cette thérapie est une régulation positive (upregulation) de la densité des récepteurs au sein de la membrane (Milligan & Bond, 1997; Daefler & Landry, 2000).

L'arrêt du traitement pourrait alors engendrer un phénomène d'hyper-sensibilisation transitoire pouvant avoir un effet contraire à la médication (Milligan & Bond, 1997).

2-Processus d'activation microscopique des RCPG

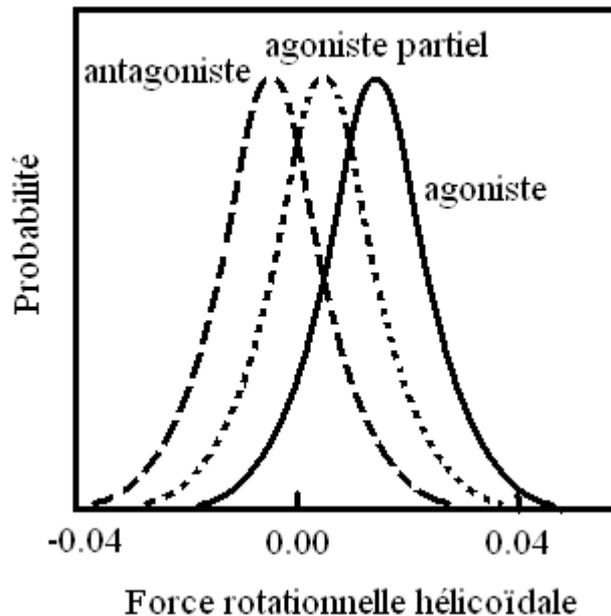


Figure 17 : Probabilité de générer une force rotationnelle sur le segment TM7 du récepteur 5-HT_{2R}
Reproduit et modifié, d'après Fong, 1996.

Afin de bien comprendre le mécanisme d'action des RCPG, un modèle structural à l'échelle microscopique a été réalisé (figure 17). Il est basé sur une simulation de la dynamique moléculaire du récepteur 5-HT_{2A} en fonction de la liaison de différents ligands. Une rotation hélicoïdale des segments transmembranaires de ce récepteur serait le premier événement conduisant au changement conformationnel observé suite à la liaison d'un ligand (Luo et al., 1994). Les auteurs de ces travaux ont proposé que l'agoniste produit une force positive de rotation hélicoïdale (valeurs positives en abscisse sur le graphique 17), en particulier sur l'hélice transmembranaire 7 (TM7). Alors que, l'antagoniste induirait une force négative donc opposée à celle-ci. L'agoniste partiel développerait une force de rotation positive moins importante que celle de l'agoniste entier sur ce segment. Les agonistes seraient donc des substances capables de générer une force rotationnelle qui permettraient la liaison entre le récepteur et les protéines G. Cette interaction correspondrait à un changement de conformation dit *productif* du récepteur. A l'inverse, les antagonistes induiraient une force de rotation conduisant à un changement de conformation non *productif* : les récepteurs n'interagiraient pas avec les protéines G. Cette étude a donc permis de proposer que le changement conformationnel des récepteurs ayant fixé leur ligand correspondrait à une

torsion de l'hélice TM7. D'autres segments transmembranaires sembleraient être également impliqués dans ces processus, telles que TM3, TM6 (Lin et Sakmar, 1996) et la portion cytoplasmique de TM7 appelée hélice 8 ou extension horizontale de TM7 (Altenbach et al., 2001a,b; Gether et al., 2002). Les mécanismes moléculaires contrôlant le mouvement des segments transmembranaires ne sont pas complètement résolus, du fait de la complexité des RCPG. Néanmoins, les phénomènes de protonation de certains acides aminés conservés dans le motif cytoplasmique de TM3 (acides aspartiques ou glutamiques) pourraient être impliqués dans les mécanismes d'activation des RCPG (Arnis et al., 1994; Gether et al., 2002 ; Hunyady et al., 2003).

Les changements conformationnels ne sont pas les seuls événements à considérer dans le processus d'activation des RCPG. La cinétique de mise en place de ce phénomène est également un facteur important (Karnik et al., 2003). En effet, elle est différente suivant les types de RCPG étudiés. Elle peut nécessiter des millisecondes pour la rhodopsine et des minutes pour le récepteur β_2 -adrénergique. Leur temps de demi-activation $t_{1/2}$ est respectivement de quelques millisecondes (Farahbakhsh et al., 1993) et de 2 minutes (Gether et al., 1995 et 1997; Ghanouni et al., 2001; Jensen et al., 2001). Ces études ont été réalisées en dehors de toute régulation par des protéines G. Elles auraient pu toutefois modifier les valeurs de ces cinétiques.

L'ensemble de ces données permet de relier la probabilité à générer une force rotationnelle productive aux constantes d'équilibre bJ , abJ/d et J (figures 14 et 15) entre les formes RL et R*L, GRL et GR*L ou bien encore entre R et R*. Ces travaux établissent un lien entre les propriétés macroscopiques et microscopiques du mécanisme de couplage entre les récepteurs et les protéines G.

3-Limites du modèle thermodynamique cubique ternaire allostérique

Le modèle thermodynamique cubique allostérique considère l'interaction entre un ligand, un récepteur et une protéine G avec une stoechiométrie de 1:1:1 (Furchgott, 1966; De Lean et al., 1980; Lefkowitz et al., 1993). Cependant, ce modèle ne prend pas en compte la liaison d'un récepteur avec plusieurs protéines G (Wurch & Pauwels, 2001). En effet dans une cellule, environ 17 000 complexes protéine G-adénylate cyclase peuvent potentiellement se former. Alors que le nombre total d'isoformes de protéines G retrouvées dans une cellule est seulement de 1300 (Kim et al., 1994). Dans les systèmes d'expression, la réponse à un ligand peut être fortement amplifiée à cause de la surexpression des récepteurs et de la proximité des protéines G et des effecteurs au sein de la membrane favorisant ainsi les couplages (Kenakin, 1997; Hermans, 2003). Il semble de plus, que cette multiplicité d'interaction soit dépendante de l'agoniste considéré. La formation de ces complexes dans les systèmes d'expression est

peut être une propriété intrinsèque des récepteurs couplés aux protéines G (Hermans, 2003). En effet, il semble que les RCPG soient organisés en unités fonctionnelles afin de favoriser la spécificité d'action. Plus de 50 récepteurs RCPG différents peuvent s'associer et constituer ces unités qui participeraient ainsi à une transduction ciblée du signal (Bockaert et al., 2003). Cette répartition membranaire semble être privilégiée actuellement par rapport aux notions de « cross-talk » entre les voies de transduction du signal établies initialement (Bockaert et al., 2003).

L'existence d'une homo- ou hétéro-oligomérisation des RCPG est un autre facteur qui n'a pas été considéré dans ce modèle. L'idée d'une dimérisation et même d'une oligomérisation des RCPG est largement acceptée actuellement (Salahpour et al., 2000). De nombreuses études immunochimiques ont permis de mettre en évidence la présence de monomères, de dimères (George et al., 2000; Lee et al., 2000), de tétramères (Nimchinsky et al., 1997; George et al., 1998; Lee et al., 2000) voire dans de plus rares cas de trimères et de pentamères de RCPG dans la membrane. Les travaux de Milligan et al., et de Lee et al., en 2003 proposent en plus l'existence d'homo-oligomères (Marshall, 2001; George et al., 2002) et d'hétéro-oligomères formés entre différents RCPG (Bouvier, 2001; George et al., 2002) dans la membrane plasmique. Les interactions entre ces récepteurs ont été détectées et quantifiées au niveau de la cellule entière grâce à des techniques de transfert d'énergie à résonance fluorescente, le FRET (fluorescence resonance energy transfer) et bioluminescente, le BRET (bioluminescence resonance energy transfer). Les hétéro-oligomères semblent posséder des caractéristiques fonctionnelles distinctes de celles des homo-oligomères (Abd Alla et al., 2001; Pfeiffer et al., 2001 ; George et al., 2002). Les études de Lee et al., 2003 sur le récepteur D2 dopaminergique, indiquent que les monomères, les dimères et les tétramères des RCPG présentent des caractéristiques de liaison du ligand différentes. Les substances antagonistes auraient une meilleure affinité pour les récepteurs monomériques plutôt que pour les formes dimériques et tétramériques. L'étude d'Herbert et al., 1996, a montré qu'un peptide mimant la région transmembranaire VI du récepteur β_2 -adrénergique était capable d'interférer avec la dimérisation des récepteurs et les capacités de stimulation de l'adénylate cyclase par ce récepteur. Ces résultats ont mis en évidence le rôle clef de l'hélice VI transmembranaire et l'activité fonctionnelle des RCPG sous forme de dimères. Ces données ont été supportées par Mijares et al., 2000, montrant qu'un anticorps bivalent stimulait le récepteur β_2 -adrénergique, alors qu'un fragment Fab se comportait comme un antagoniste. Mais ce schéma n'est pas exclusif. En effet, les hélices transmembranaires I et II semblent jouer également un rôle majeur dans l'oligomérisation des récepteurs « yeast α factor » (Overton & Blumer, 2002),

ainsi que la région transmembranaire IV dans l'homo-dimérisation des récepteurs D2 dopaminergiques (Guo et al., 2003). Les régions transmembranaires III et V semblent aussi impliquées dans ces processus (Bai, 2004). Par ailleurs, la liaison du ligand semblerait induire soit l'oligomérisation des récepteurs (Cornea et al., 2001; Kroeger et al., 2001; Zhu et al., 2002), soit la dissociation des oligomères (Cheng & Miller, 2001; Latif et al., 2002). Pour un même récepteur, différentes propositions ont été faites. En effet, des études suggèrent que l'interaction du ligand avec les récepteurs CXCR4 aux chemokines induit une dimérisation des RCPG initiatrice de la transduction du signal (Vila-Coro et al., 1999; Mellado et al., 2001). Alors que, d'autres travaux montrent que ce ligand n'a pas d'effet sur ces récepteurs (Babcock et al., 2003). Il semble donc qu'une proportion d'oligomères soit présente dans la membrane de façon constitutive et qu'une autre se forme suite à la fixation du ligand. Bien que les processus de dimérisation et les mécanismes d'activation des récepteurs RCPG soient différents, ils semblent impliqués tous les deux des éléments similaires tels que les segments transmembranaires (Lee et al., 2003; Bai et al., 2004).

D'autres éléments ont été omis dans ce modèle :

1) La régulation des protéines G par les protéines RGS (Regulators of G-protein signalling) (Weng et al., 1998 ; Hepler, 1999 ; Wieland & Chen, 1999). Suite à une stimulation des RCPG, le GTP lié sur la sous-unité libre α est hydrolysé en GDP. Ce processus dure quelques minutes. Afin d'accélérer la vitesse d'hydrolyse du GTP et permettre un nouveau cycle d'activation des protéines G, des protéines régulatrices RGS sont impliquées (Ishii & Kurachi, 2003 ; Bernstein et al., 2004 ; Hollinger & Hepler, 2004). Leur rôle est de stimuler l'activité GTPase de la sous-unité α (GAP ou GTPase-activating proteins) (Ishii & Kurachi, 2003).

2) La régulation des RCPG par les phénomènes de désensibilisation. Ces systèmes arrêtent la stimulation des récepteurs et la transduction intracellulaire des signaux (Bockaert & Pin, 1998 ; Bunemann et al., 1999). Deux types de désensibilisation ont été répertoriés : la désensibilisation homologue et la désensibilisation hétérologue (figure 18).

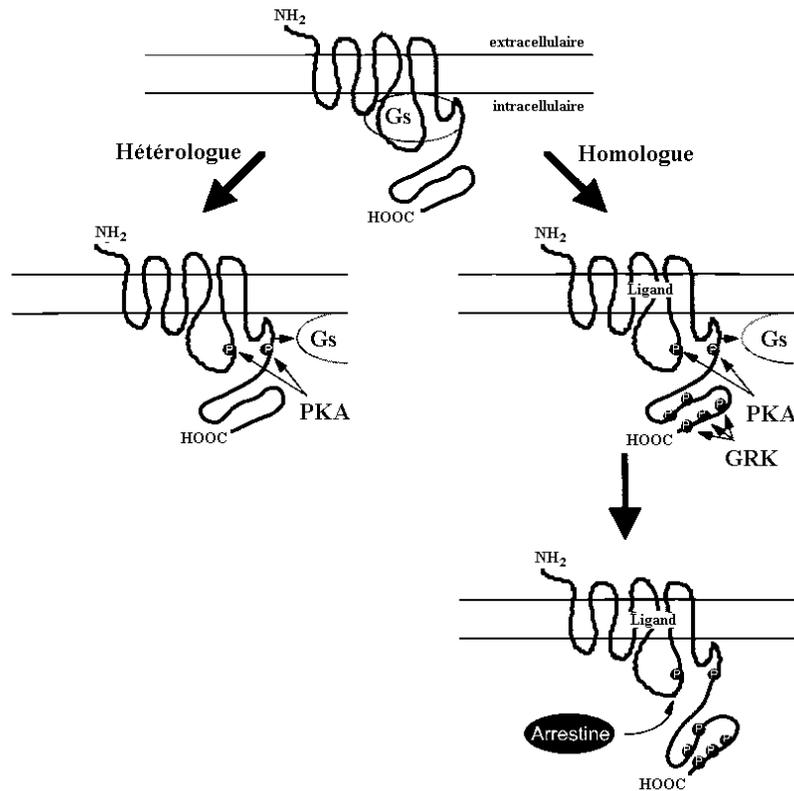


Figure 18: Désensibilisation des récepteurs à sept segments transmembranaires. Désensibilisation « hétérologue » non spécifique de la fixation du ligand (fait intervenir PKA et PKC). Désensibilisation « homologue » en présence du ligand produit des phosphorylations supplémentaires dues au GRK permettant la fixation de l'arrestine, à l'origine du découplage durable des protéines G du récepteur. Reproduit et modifié d'après Hausdorff, 1990.

Ces deux processus impliquent la phosphorylation des récepteurs. La désensibilisation homologue correspond à la phosphorylation des RCPG au niveau de la partie C-terminale cytoplasmique par une protéine kinase appartenant à la famille des GRKs (G protein-coupled receptor kinases), suite à l'application d'un agoniste spécifique (Lefkowitz, 1998 ; Pitcher et al., 1998). Les complexes $\beta\gamma$ des protéines G participent également dans ce processus. Ils activent les protéines β -arrestines qui interagissent avec la région phosphorylée des récepteurs (figure 18). Les RCPG seront alors découplés des protéines G et seront internalisés dans les cellules. La désensibilisation hétérologue est obtenue grâce à la phosphorylation de la partie C-terminale sous membranaire des RCPG activés, par des protéines kinases, de type PKA et PKC (figure 18). Ce mécanisme de désensibilisation est mis en place lorsqu'une cellule est stimulée par plusieurs ligands agissant sur différents récepteurs, ou familles de récepteurs. Par exemple, lorsqu'un individu mange dans des conditions stressantes, l'organisme mettra des

priorités d'action. S'il favorise les processus de digestion, les récepteurs de l'insuline auront une activité privilégiée. Au niveau cellulaire, ces phénomènes se traduiront par une désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques, stimulés par le stress, *via* les récepteurs de l'insuline. Ces récepteurs activeront une PKA qui phosphorylera les récepteurs β -adrénergiques et éteindra les voies de transduction liées au stress (Giros, 1998 ; Zastrow, 2003).

C-Les récepteurs cardiaques couplés aux protéines G

1-Récepteurs adrénériques

Les récepteurs adrénériques sont de deux types et sont nommés les récepteurs α - et β -adrénériques. Il existe au moins neuf sous-types de récepteurs (Hoffman & Lefkowitz, 1996). L'identification de leur structure et leur mode de fonctionnement a bénéficié du développement récent de la biologie moléculaire. Mais leur histoire remonte au début du XX^{ième} siècle. En 1906, Dale a observé « l'inversion » des effets de l'adrénaline par certaines substances. L'adrénaline contracte le muscle utérin de lapine, mais le relaxe en présence d'alcaloïdes de l'ergot de seigle. Il émet alors l'hypothèse de l'existence de deux types de récepteurs adrénériques. Alquist en 1948 observe que le classement de plusieurs molécules par ordre de puissance (adrénaline, noradrénaline, isoprénaline) n'est pas le même que celui observé au niveau de différents organes tels que le coeur, les vaisseaux, l'intestin, l'utérus. Il suggère donc l'existence de récepteurs différents, qu'il appellera α et β . Les récepteurs α induisent des effets de type « constriction » et « contraction » sur les organes sauf au niveau de l'intestin. La puissance des récepteurs α classés suivant un ordre décroissant est : adrénaline > noradrénaline > isoprénaline. Les récepteurs β quant à eux induisent en général des effets inhibiteurs. A l'exception du muscle cardiaque, où la fixation de la noradrénaline et de l'adrénaline stimule l'activité du coeur. L'ordre de puissance des substances est : isoprénaline > adrénaline > noradrénaline. Les récepteurs α -adrénériques sont présents en plus faible quantité que les récepteurs β -adrénériques dans le myocarde humain. Le ratio est de 1 pour 10 (Rockman et al., 2002).

L'adrénaline est issue de la méthylation de la noradrénaline. Ces substances sont synthétisées à partir de la tyrosine. L'isoprénaline est une molécule de synthèse. Ces trois substances appartiennent à la famille des catécholamines. La noradrénaline est un neurotransmetteur physiologique des terminaisons sympathiques, alors que l'adrénaline est une hormone sécrétée par la médullo-surrénale. Ces catécholamines stimulent les récepteurs α

et β -adrénergiques. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G.

a)-Récepteurs α -adrénergiques

Ces récepteurs ont été subdivisés en récepteurs α_1 et α_2 selon leur affinité pour diverses substances pharmacologiques. Les récepteurs α_1 possèdent une haute affinité pour la méthoxamine (agoniste) et la prazosine (antagoniste), alors que les récepteurs α_2 ont une haute affinité pour la clonidine (agoniste), la yohimbine et le piperoxane (antagonistes). Les récepteurs α_1 sont couplés à la phospholipase C, *via* les protéines G_q , et induisent la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). Alors que, les récepteurs α_2 régulent l'activité des canaux calciques voltage-dépendant (Wurch & Pauwels, 2001 ; Seifert & Wenzel-Seifert, 2002), *via* une protéine G_i . Les récepteurs α_1 -adrénergiques sont localisés dans le cœur de certaines espèces (mouton, chien et rat, excepté l'Homme), les vaisseaux et les muscles lisses, alors que les récepteurs α_2 -adrénergiques sont situés au niveau des vaisseaux coronariens, du système nerveux central, du pancréas et des plaquettes.

Le nombre exact de sous types de récepteurs alpha exprimés réellement chez l'homme est incertain. Une meilleure connaissance de ces récepteurs ainsi qu'une distribution tissulaire plus précise pourraient aboutir au développement de médicaments sélectifs pour certains lits vasculaires comme par exemple la circulation coronarienne. Leurs effets cardiaques sont les suivants:

- Récepteurs α_1 -adrénergiques : Une stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques provoque une vasoconstriction suivie d'une augmentation de la pression artérielle. Une activation des barorécepteurs et une baisse de la fréquence cardiaque sont alors induites par une diminution du tonus sympathique et une augmentation du tonus vagal.
- Récepteurs α_2 -adrénergiques : Une stimulation des récepteurs α_2 -adrénergiques engendre une diminution du tonus sympathique central réduisant la pression artérielle et induit une augmentation du tonus parasympathique provoquant une baisse de la fréquence cardiaque. Cette stimulation n'induit cependant pas d'hypotension orthostatique. Car, elle n'empêche pas le fonctionnement du baro-réflexe régulant la pression artérielle lors du passage en position debout. Lors de l'administration intraveineuse rapide de substances agonistes des récepteurs α_2 -adrénergiques telle que la clonidine ou suite à une section de la moelle épinière, une vasoconstriction ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle seront observables. Ces effets apparaissent en activant les récepteurs α_2 -vasculaires. Les

récepteurs centraux ne peuvent pas exercer leur action inhibitrice sur le tonus sympathique.

b)-Récepteurs β -adrénergiques

Les récepteurs β -adrénergiques ont été classés en récepteurs β_1 et β_2 selon leur affinité pour les substances tels que l'isoprotérénol, l'adrénaline et la noradrénaline. Le classement par ordre décroissant d'affinité proposé pour les récepteurs β_1 est: isoprénaline > adrénaline = noradrénaline. Pour les récepteurs β_2 , l'ordre est : isoprénaline > adrénaline > noradrénaline. Dans le cœur, la proportion respective des récepteurs β_1 et β_2 varie en fonction des espèces, de la région du cœur considérée et de l'état physiologique (sain ou pathologique). Ainsi, les récepteurs β_1 sont prédominants au niveau cardiaque et représentent 75 à 80 % des récepteurs β -adrénergiques totaux (Rockman et al., 2002). Les récepteurs β_2 sont plus exprimés au niveau des vaisseaux et des bronches (Brodde et al., 1993). Grâce aux techniques de biologie moléculaire, deux autres types de récepteurs ont pu être identifiés, les récepteurs β_3 et β_4 -adrénergiques (Gauthier et al., 2000 ; Kitamura et al., 2000 ; Konkar et al., 2000; Cheng et al., 2001 ; Kaumann et al., 2001). Ils seraient également présents dans le cœur dans des proportions beaucoup plus faibles que celle des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques. Leur pharmacologie est moins bien définie.

Les récepteurs β -adrénergiques sont des récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés à l'adénylate cyclase par une protéine G_s (figure 19). Leur stimulation induit la formation d'AMP cyclique. Ce second messager active la protéine kinase A, qui à son tour phosphoryle diverses protéines intracellulaires (Bockaert & Pin, 1998) (figure 19). Les récepteurs β_2 et β_3 -adrénergiques peuvent également se coupler à la protéine G_i .

Les principales propriétés fonctionnelles des différents récepteurs β -adrénergiques dans le cœur vont maintenant être présentées :

- Récepteurs β_1 -adrénergiques

La stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques cardiaques peut induire principalement 4 types de réaction :

(1) *Effet inotrope positif : augmentation de la force contractile cardiaque*

Suite à un potentiel d'action, l'amplitude de la force de contraction cardiaque dépendra de l'influx calcique intracellulaire provoqué par l'ouverture des canaux calciques (figure 19), et du degré de phosphorylation de ces canaux et du phospholambane (figure 19) (Lohse et al., 2003). Une stimulation β_1 -adrénergique augmentera l'intensité de cette force contractile.

(2) *Effet chronotrope positif : augmentation de la fréquence cardiaque*

La vitesse de dépolarisation spontanée des cellules sinusales est fonction du courant pacemaker I_f . Il est activé par l'AMPC produit après la stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques et est inhibé par la stimulation des récepteurs muscariniques de type M2 (Biel et al., 2002).

(3) *Effet dromotrope positif : Augmentation de la vitesse de conduction auriculoventriculaire*

Une stimulation β_1 -adrénergique induit une augmentation de l'influx calcique dans les cellules sinusales. Celle-ci augmente la vitesse de dépolarisation initiale des fibres du nœud auriculoventriculaire et augmente ainsi la vitesse de propagation. La vitesse de conduction à travers le nœud auriculoventriculaire est ainsi accélérée (Zhao et al., 1994).

(4) *Effet bathmotrope positif : augmentation de l'excitabilité ventriculaire.*

L'activation des récepteurs β_1 -adrénergiques entraîne la phosphorylation des canaux calciques. L'amplitude de ce courant est alors augmentée. Ces phénomènes peuvent être à l'origine de certains troubles du rythme ventriculaire en donnant naissance à des automatismes anormaux et en provoquant une hyper-excitabilité des myocytes.

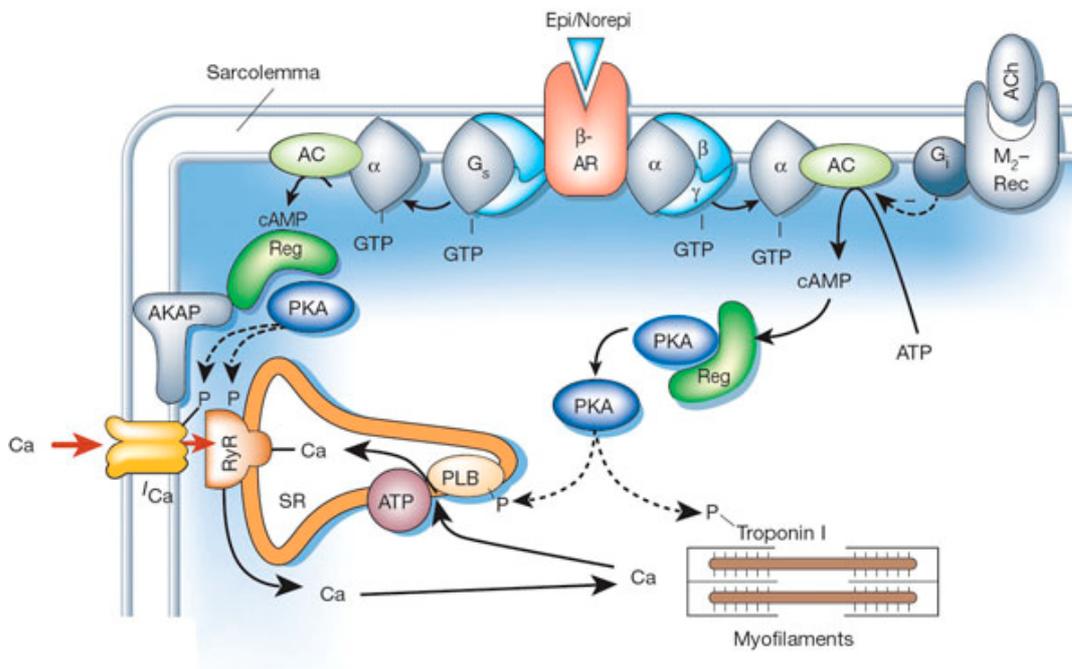


Figure 19 : Transduction du signal à partir des récepteurs β -adrénergiques et M2 muscariniques cardiaques.

Activité fonctionnelle de la PKA sur les effecteurs I_{Ca} , myofilaments, récepteur RyR, et phospholambanes PLB. Reproduit d'après Bers, 2002.

- Récepteurs β_2 -adrénergiques

Les récepteurs β_2 -adrénergiques agissent principalement au niveau des tissus vasculaires et bronchiques (Brodde et al., 1993). Ils stimulent également le cœur. Les effets cardiaques induits ont cependant une intensité plus faible que ceux observés avec les récepteurs β_1 -adrénergiques (voir paragraphe précédent), bien que ces récepteurs soient couplés plus efficacement avec l'adénylate cyclase (Brodde & Michel, 1999). Les études développées avec le bloqueur spécifique ICI 118551 des récepteurs β_2 -adrénergiques sur les myocytes humains ont permis de montrer que ce récepteur pouvait être couplé avec deux types de protéines G : les protéines G_i et G_s (Daaka et al., 1997 ; Kuschel et al., 1999; Xiao et al., 1999 ; Devic et al., 2001; Gong et al., 2002). Récemment, sur des myocytes humains, une nouvelle voie de transduction a été mise en évidence. Elle implique le couplage du récepteur β_2 -adrénergique avec une protéine G_i et le recrutement de la phospholipase A2. Lors de pathologie, cette voie de transduction semble remplacer la cascade défectueuse : récepteurs β_1/β_2 -adrénergiques /protéine G_s /adénylate cyclase (Pavoine et al., 2003).

- Récepteurs β_3 -adrénergiques

Les récepteurs β_3 -adrénergiques ont été récemment identifiés. Ils sont présents au niveau de cardiomyocytes humains et des tissus adipeux (Chamberlain et al, 1999 ; Lohse et al., 2003). Leur rôle physiologique reste cependant à déterminer. Leur abondance au niveau du tissu adipeux pourraient suggérer un rôle dans certaines formes d'obésité. De nombreuses substances agonistes ou antagonistes de ces récepteurs ont été synthétisées et sont actuellement en essai. Leur stimulation induit expérimentalement une vasodilatation, un inotropisme cardiaque négatif (Kohout et al., 2001) et une activation de la voie NO/GMPc (Gauthier, 1998).

- Récepteurs β_4 -adrénergiques

Les effets cardiostimulants induits par l'antagoniste CGP12177 et perdurant malgré le blocage des récepteurs par le propranolol ont permis de postuler l'existence d'un nouveau récepteur β_4 -adrénergique (Kaumann et al., 2001). Cependant, des études de knock-out des récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques indiquent que les effets des récepteurs β_4 -adrénergiques seraient médiés par les récepteurs β_1 -adrénergiques (Konkar et al., 2000 ; Kaumann et al., 2001).

De nombreux travaux proposent une compartimentalisation des récepteurs β -adrénergiques au niveau cardiaque (Steinberg & Brunton, 2001). Les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques principalement seraient localisés dans des régions différentes au sein de la membrane plasmique. De plus, ces récepteurs seraient placés à proximité des effecteurs (Rybin et al., 2000 ; Ostrom et al., 2001). En effet, Davare et al., en 2001 ont montré une co-localisation du récepteur β_2 -adrénergique avec le canal calcique de type L. De plus, suite à la stimulation des récepteurs adrénergiques, le signal de transduction se propagerait uniquement au sein des microdomaines (Bers & Ziolo, 2001 ; Davare et al., 2001 ; Zaccolo et al., 2002). L'AMPc produit serait dégradé par les phosphodiesterases localisées exclusivement dans ces compartiments spécialisés (Rich et al., 2001 ; Zaccolo & Pozzan, 2002).

2-Récepteurs muscariniques :

L'acétylcholine est synthétisée à partir de l'acide acétique et de la choline au niveau du corps cellulaire des neurones cholinergiques. Elle est ensuite stockée dans des vésicules présentes dans le bouton synaptique des terminaisons nerveuses. Lorsqu'une fibre cholinergique est stimulée, les canaux calciques voltage dépendant sont activés et permettent l'entrée d'ions calciques. L'élévation de calcium intracellulaire induit l'exocytose des vésicules provoquant ainsi la libération d'acétylcholine dans la fente synaptique (10^6 molécules d'acétylcholine). Ce neurotransmetteur se fixe ensuite sur les récepteurs post-synaptiques comprenant les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine et les récepteurs muscariniques. L'activation des récepteurs canaux nicotiques provoque l'entrée d'ions Na^+ dans les cellules musculaires striées (cœur, squelettique) suivie du développement d'un potentiel d'action post-synaptique. La dépolarisation membranaire induit alors une activation des récepteurs DHP initiateurs du couplage excitation-contraction (voir chapitre C2). Il existe plusieurs types de récepteurs muscariniques, notés de M1 à M5 (Caulfield, 1993 ; Eglén et al., 1996 ; Balligand et al., 1999). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Van Koppen & Kaiser, 2003). Les récepteurs M2, M3 et M4 sont présents au niveau du cœur. Toutefois, la forme M2 prédomine au niveau cardiaque chez les mammifères (figure 19). Les récepteurs M2 et M4 sont couplés à une protéine G_i inhibitrice de l'adénylate cyclase (Sterin-Borda et al., 1995 ; Balligand et al., 1999). Les autres formes sont couplées positivement à une phospholipase C. Les effets muscariniques cardiaques (Hartzell, 1988) sont de trois natures : (1) *inotrope négatif*, provenant de l'inhibition des adénylates cyclases par la protéine G_i ; (2) *chronotrope négatif*, issue de l'ouverture du canal potassique I_{k-Ach}

induite par la protéine G_i et produisant une hyperpolarisation ; (3) *dromotrope négatif*, liée à une diminution de la vitesse de conduction auriculoventriculaire. L'activité des récepteurs muscariniques inhibe l'action stimulatrice des récepteurs β -adrénergiques.

L'acétylcholine se fixe également sur des récepteurs pré-synaptiques dont le rôle est de freiner la libération de cette substance. L'action de ce neurotransmetteur est interrompue par l'acétylcholinestérase située dans les membranes post-synaptiques, qui entraîne son hydrolyse. L'acétylcholine diffuse également hors de la fente synaptique et est transformée par les choline-estérases présentes dans le plasma et le foie.

3-Récepteurs sérotoninergiques de type 4

La sérotonine, (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) est un peptide appartenant au groupe des indolamines et présente un poids moléculaire apparent de 213 daltons. Elle exerce ses actions sur les cellules du système nerveux central et sur les cellules d'organes périphériques (Hegde & Eglén., 1996), dont les intestins et le cœur par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques. La sérotonine est synthétisée et sécrétée principalement par les neurones sérotoninergiques. Cependant, une fraction circulante existe. En effet, elle est également synthétisée par les cellules chromaffines retrouvées dans les intestins et le cœur. La 5-HT circule dans le sang et est stockée dans les mastocytes et les plaquettes. Elle peut être libérée de ces dernières dans des conditions pathologiques telle qu'une agrégation plaquettaire liée à une circulation sanguine stagnante, de lésions auriculaires dues au vieillissement ou à des facteurs hémodynamiques altérés (Kaumann, 1994). Les effets de la sérotonine sur le système nerveux central et sur les cellules des organes périphériques impliquent des récepteurs membranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Bockaert & Pin., 1998). Son interaction au niveau du récepteur se fait dans la poche hydrophobe membranaire (groupe 1a, figure 10) avec des acides aminés impliqués dans la formation d'interactions ioniques avec le ligand : Ser 197, Asp 100 et Tyr 302 (Mialet et al., 2000a). Il a été mis en évidence au moins 15 sous-types de récepteurs à la sérotonine, notés de 5-HT₁ à 5-HT₇, et classés en fonction de leurs propriétés pharmacologiques (Saxena & Villalon., 1990). Seuls les récepteurs 5-HT₃ ne sont pas des RCPG. Ils sont plutôt des récepteurs canaux.

Les effets de la sérotonine sur le système cardiovasculaire sont complexes. Ils induisent des bradycardies ou des tachycardies (Le Meussurirer et al., 1959), une hypo- ou une hypertension et une vasodilatation ou une vasoconstriction. Ces effets sont médiés par quatre récepteurs sérotoninergiques principaux 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ et 5-HT₄ (Saxena &

Villalon., 1990). Kaumann et al. en 1990 ont montré que l'effet sérotoninergique au niveau du cœur passait par un récepteur ayant des analogies fonctionnelles avec le récepteur à la sérotonine décrit dans les cellules nerveuses embryonnaires de souris, le récepteur 5-HT₄ (Dumuis et al., 1988).

Le récepteur 5-HT₄ (figure 21) est le seul récepteur sérotoninergique retrouvé dans le cœur. Il est localisé dans les oreillettes droite (Kaumann et al., 1990) et gauche (Sanders & Kaumann, 1992). Ce récepteur est exprimé sous sa forme active uniquement chez l'homme et le porc (Jahnel and al., 1992; Eglen et al., 1995). Certaines études contradictoires suggèrent la présence (Bach et al., 2001) ou l'absence (Blondel et al., 1997 et 1998a) d'ARNm codant pour le récepteur 5-HT₄ au niveau des ventricules. Actuellement, il est admis que ce récepteur est absent au niveau ventriculaire. La distribution tissulaire humaine des ARNm codant pour le récepteur 5-HT₄ semble varier en fonction de l'isoforme étudiée (figure 20). En effet, l'isoforme (e) est présente particulièrement dans l'oreillette cardiaque et le cerveau (Mialet et al., 2000b) alors que les isoformes (a) et (b) semblent être plus largement représentées dans l'oreillette cardiaque, le cerveau, le colon et le petit intestin (Bach et al., 2001).

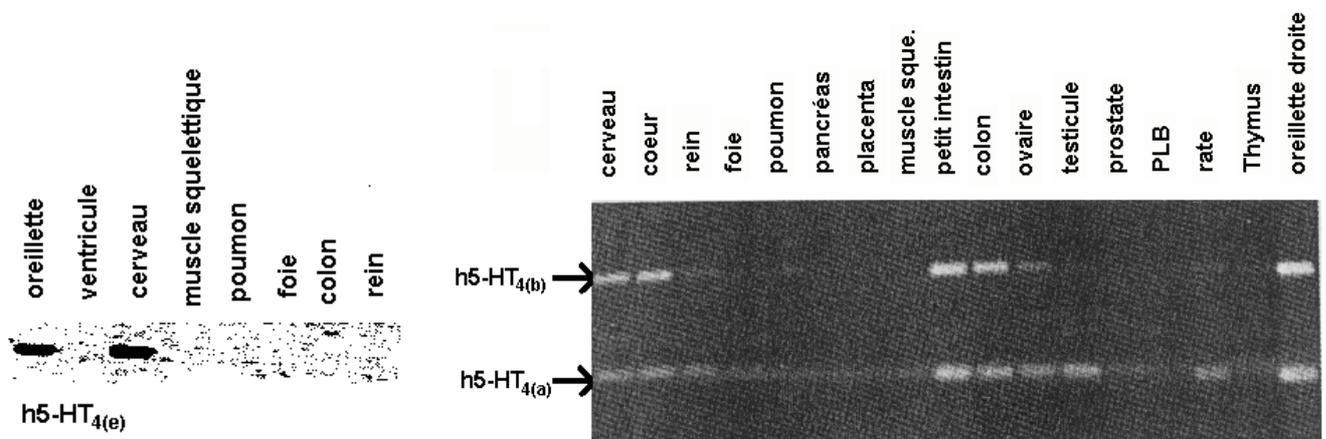


Figure 20: Distribution tissulaire humaine des ARN m du récepteur 5-HT₄ détectés par RT-PCR.

Reproduit et modifié, d'après Mialet et al., 2000b et Bach et al., 2001.

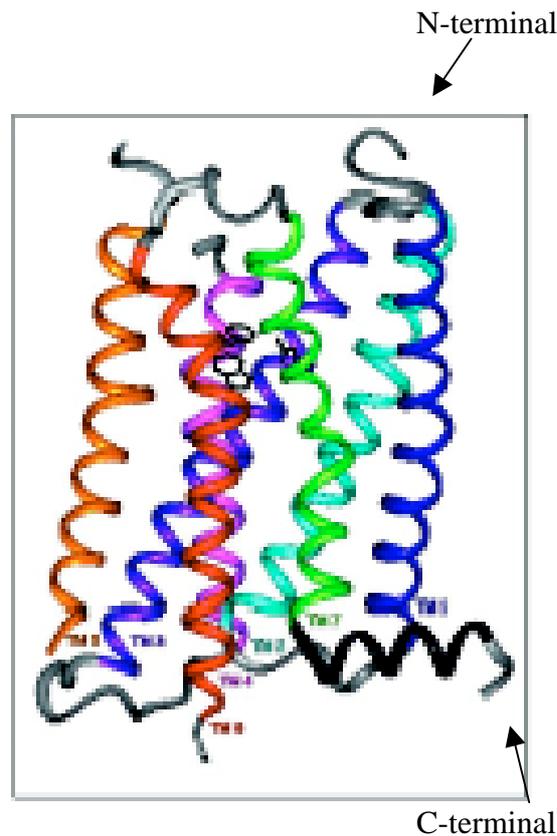


Figure 21 : Modélisation du récepteur 5-HT₄.

Modèle présentant dans la poche hydrophobe les chaînes carbonées des acides aminés Asp 100, Trp 272 et Phe 275 intervenant dans la fixation des ligands agoniste inverse (basée sur la structure de la rodhopsine). TM 1-7 : hélices transmembranaires 1 à 7. Reproduit et modifié, d'après Joubert et al., 2002.

Le récepteur 5-HT₄ a été cloné pour la première fois en 1995 par Gérald et al., chez le rat. Deux isoformes provenant d'un épissage alternatif des ARNm ont été identifiés : une forme courte dans sa partie C-terminale (5-HT_{4s}) et une forme longue (5-HT_{4L}). Au niveau des cellules atriales de rat, seul l'ARNm de l'isoforme 5-HT_{4s} a été détectée. Le récepteur 5-HT₄ cardiaque humain a été cloné en 1997 (Blondel et al., 1997). Quatre isoformes ont été identifiées : 5-HT_{4(a)}, 5-HT_{4(b)}, 5-HT_{4(c)} and 5-HT_{4(e)}. Le clonage du cDNA codant pour ce récepteur a permis de déduire sa structure primaire. Il est constitué de 387 acides aminés en moyenne et présente un poids moléculaire apparent de 42 kDa. Ces isoformes résultent d'un épissage alternatif du même gène et diffèrent au niveau de la leucine 358 située dans l'extrémité C-terminale (figure 22)(Blondel et al., 1998a ; Mialet et al., 2000a). Actuellement, ce récepteur existe dans l'organisme sous huit isoformes différentes notées : a, b, c, d, e, f, g et n (Langlois & Fischmeister, 2003; Bockaert et al., 2004).

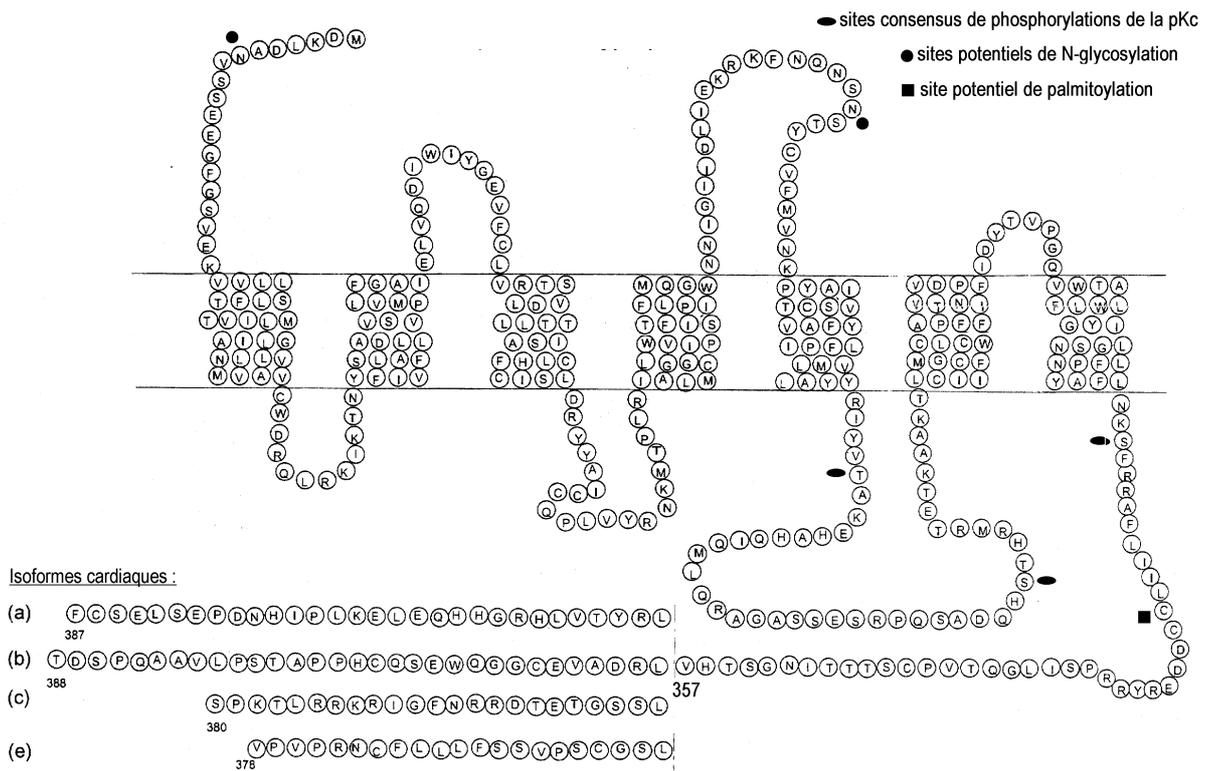


Figure 22 : Isoformes cardiaques du récepteur 5-HT₄ et sites potentiels de phosphorylation, glycolysation et palmitoylation. Reproduit et modifié d’après Mialet et al., 2000a.

Le récepteur 5-HT₄ humain cardiaque est couplé positivement à l’adénylate cyclase par une protéine G_s, amenant la production d’AMPc (figure 23) (Ouadid et al., 1991). Ce second messager active la PKA (figure 23), qui phosphoryle plusieurs protéines clefs intervenant dans le mécanisme d’excitation-contraction tels que les canaux calciques de type L (figure 23) (Jahnel et al., 1992). L’AMPc peut également agir directement sur les canaux « funny » impliqués dans l’automatisme cardiaque (figure 23) (Di Francesco & Tortora, 1991). Ces évènements induisent une augmentation de l’intensité des courants I_{Ca2+,L} et pacemaker I_f (Pino & al., 1998) dans les myocytes atriaux humains.

Il semblerait que ces récepteurs auriculaires soient également impliqués dans la genèse d’arythmies telles que les fibrillations auriculaires (Kaumann, 1994 ; Workman & Rankin, 1998). Les perspectives thérapeutiques de ces récepteurs sont d’autant plus intéressantes car leur localisation unique auriculaire éviterait les effets pro-arythmiques ventriculaires observés lors de traitements inhibant les canaux Na⁺ et/ou K⁺.

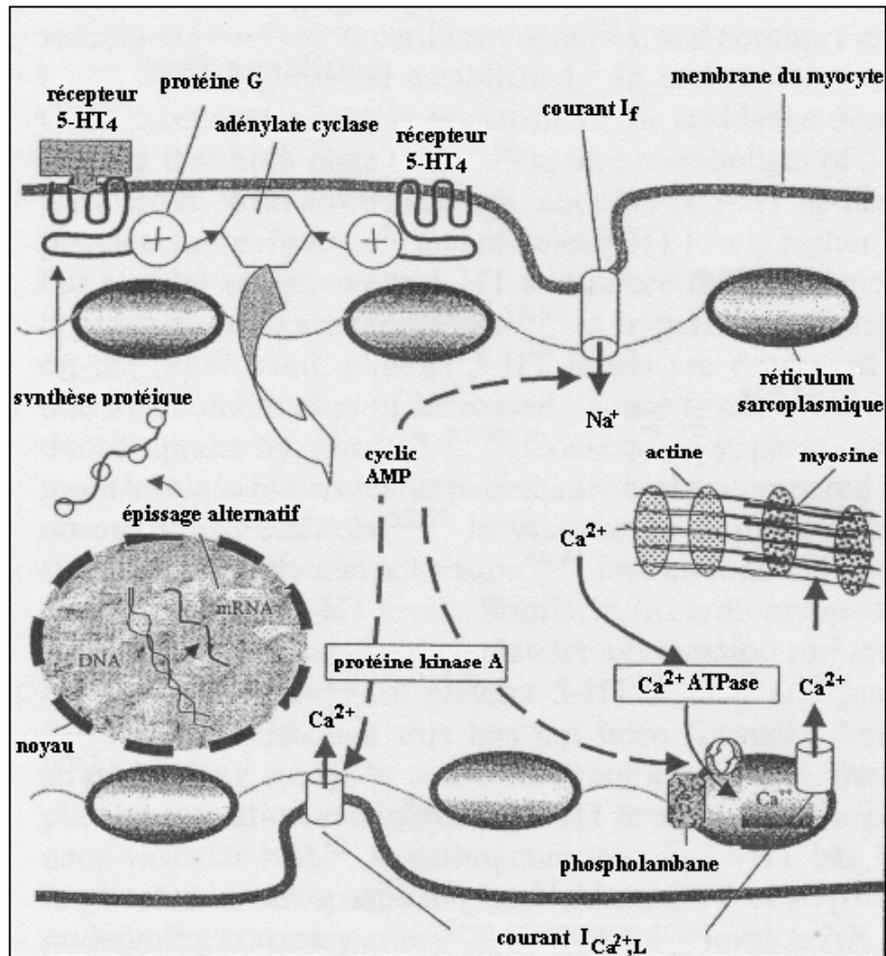


Figure 23 : Transduction du signal du récepteur 5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains et rôle possible dans la génération d'arythmies. Reproduit et modifié, d'après Yusuf et al., 2003.

Le profil pharmacologique du récepteur 5-HT₄ est le suivant :

1) substances agonistes :

Les dérivés de la tryptamine ont un effet agoniste sur ce récepteur. Ces substances présentent toutefois des affinités différentes et ont été classées par ordre décroissant d'affinité: cizapride > 5-HT > renzapride > 5-MeOT > zacopride > α -methyl-5-HT > 5-CT > tryptamine > 2-méthyltryptamine (Branchek, 1995; Gerhart et al., 1997, Langlois & Fischmeister, 2003, Bockaert et al., 2004).

2) substances antagonistes :

Suivant les isoformes du récepteur, ces substances peuvent être des antagonistes ou des agonistes inverses. Le premier répertorié est le tropisetron ICS 205-930. Ont été principalement étudiés, le SB 207710 (Kaumann et al., 1994), le GR 113808 (Claeysen et al.,

2000 ; Mialet et al., 2000b ; Bach et al., 2001; Pindon et al., 2001 ; Ponimaskin et al., 2002) , le ML10375 (Blondel et al, 1998 ; Mialet et al., 2000b ; Ponimaskin et al., 2002), le SB 207266 (Wardle et al., 1996; Joubert et al., 2002), le GR 125487, SB 204070, RO116-0086 et le RO116-1148 (Joubert et al., 2002). Pour plus de détails, l'ensemble des molécules agonistes et antagonistes des récepteurs 5-HT₄ ont été répertoriées dans la revue de Fischmeister & Langlois, 2003.

Les molécules antagonistes utilisées dans la suite de cette étude sont le GR113808 et le ML10375 (figure 24). Ces molécules ont pour particularité de posséder des propriétés de liaison et d'efficacité de transduction similaires (Mialet et al., 2000b) bien que leur propriétés fonctionnelles diffèrent entre un effet antagoniste ou agoniste inverse selon la substance utilisée et l'isoforme de récepteur 5-HT₄ étudiée.

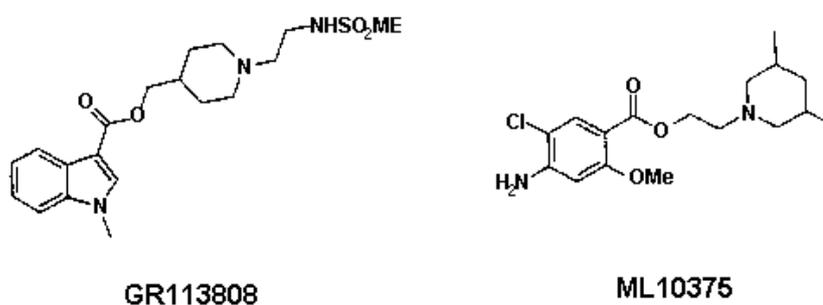


Figure 24 : Structure chimique des molécules antagonistes GR113808 et ML10375 spécifiques du récepteur 5-HT₄. Reproduit, d'après Mialet et al., 2000a.

En effet, ces substances sont antagonistes sur l'isoforme (a) (Claeyssen et al., 2000 ; Ponimaskin et al., 2002) et (b) (Bach et al., 2001) du récepteur 5-HT₄ et sont agonistes inverses sur l'isoforme (e) du récepteur (Mialet et al., 2000b). Le ML10375 est de plus agoniste inverse de l'isoforme (c) du récepteur 5-HT₄ (Blondel et al., 1998b).

Au contraire, une stimulation par un agoniste induit une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire, qui est fonction de l'isoforme étudiée (Blondel et al, 1998b; Mialet et al., 2000b). L'extrémité C-terminale des différentes isoformes module l'efficacité de couplage entre le récepteur et les adénylates cyclases. Cette région cytoplasmique participe à l'activité constitutive de ce récepteur (Claeyssen et al., 1999; Ponimaskin et al., 2002). En effet, des délétions de l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{4(a)}, ont montré une augmentation de cette activité. Ces résultats suggèrent que plus les formes 5-HT_{4(a)} sont courtes et plus les formes R* du récepteur sont favorisées. De nombreuses protéines intracellulaires interagissent avec cette extrémité C-terminale et participent à la régulation allostérique de ces récepteurs

ainsi qu'à la transduction du signal. Ces différents facteurs ont été récemment reportés dans la revue de Bockaert et al., 2003, indiquant l'importance thérapeutique de cette région.

III-Les voies de transduction du signal des récepteurs couplés aux protéines G

A-Les seconds messagers intracellulaires des récepteurs couplés aux protéines G

L'AMP cyclique (figure 25) et l'ion calcium sont les deux principaux seconds messagers qui assurent la transmission des signaux intracellulaires.

1-L'AMP cyclique

L'AMP cyclique a été identifié pour la première fois en 1959 comme étant un médiateur intracellulaire en réponse à une stimulation hormonale. Il s'agit d'une molécule informative présente dans la majorité des cellules eucaryotes.

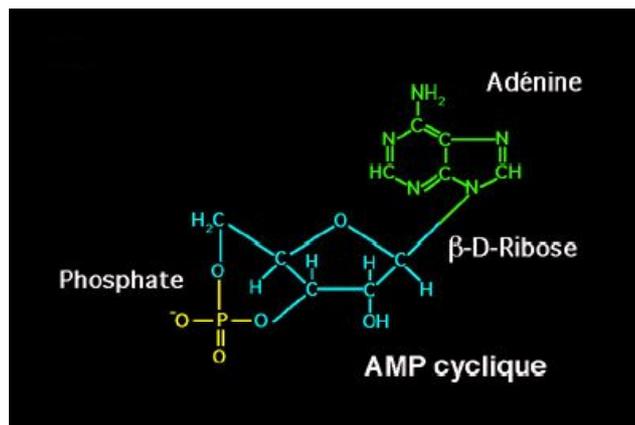


Figure 25 : Représentation plane d'une molécule d'AMP cyclique (ou Adénosine monophosphate).

Source : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/Mibioch/POLY.chP.1.23.html>

Dans une cellule au repos, sa concentration est inférieure à 10^{-7} M. Au cours d'une stimulation hormonale, elle peut varier d'un facteur 5 en quelques secondes. Une telle sensibilité de réponse impose un équilibre entre une synthèse et une dégradation rapide. L'AMPc est synthétisé à partir de l'ATP par une enzyme liée à la membrane plasmique, l'adénylate cyclase.

a)-Les adénylates cyclases

Les adénylates cyclases (AC) sont des enzymes qui répondent à l'action des hormones et des neurotransmetteurs extracellulaires *via* une interaction avec les sous-unités α_s et α_i des

protéines G. Les sous-unités α_s activent les AC, alors que les α_i les inhibent. La famille des AC catalyse la formation d'AMPc à partir d'ATP. Elles ont besoin d'un cofacteur ; le magnésium (Hurley, 1998). Le clonage moléculaire de ces enzymes a permis de mettre en évidence neuf isoformes notées de AC1 à AC9 (Dessauer et al., 1999 ; Defer et al., 2000). Elles ont des profils d'activation et des localisations tissulaires différentes dans l'organisme. Les AC sont formées d'une région N-terminale cytoplasmique, de deux domaines transmembranaires constitués de six segments appelés M1 et M2 et d'une queue C-terminale cytoplasmique composée de deux parties C1(a et b) et C2 (a et b) (figure 26). C1 fait le lien entre M1 et M2 et C2, homologue à C1, est situé au niveau C-terminal (Tesmer & Sprang, 1998 ; Dessauer et al., 1999 ; Simonds, 1999).

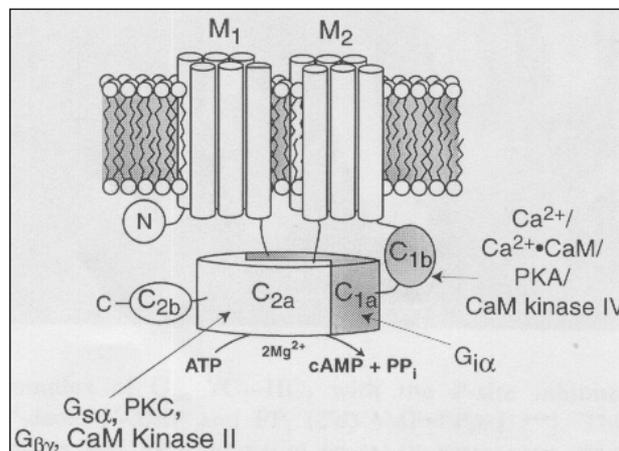


Figure 26 : Représentation schématique des adénylates cyclases de mammifères. M1 et M2 possèdent 6 domaines transmembranaires. C1b et C2b sont des domaines variables selon les adénylates cyclases. C1a et C2a, forment un hétérodimère représentant le core enzymatique où se fixe la forskoline. Reproduit, d'après Tesmer & Sprang, 1998.

C1a et C2a forment un hétérodimère constituant le core catalytique (figure 26). Le domaine C1a lie les protéines G inhibitrices α_i et C2a fixe les protéines G_s . Le domaine C2a peut être phosphorylé par la protéine kinase C et la calmoduline kinase II. La région C1b est le site de régulation de la Ca^{2+} -calmoduline, de la protéine kinase A et de la calmoduline kinase IV.

Les adénylates cyclases ressemblent à la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette membrane transporters*). Toutefois, actuellement aucune donnée n'a permis de montrer que ces protéines fonctionnaient comme un canal ou une pompe (Simonds, 1999). Les neuf AC identifiées sont modulées par la protéine G_s et la forskoline, à l'exception de

l'AC9. La forskoline est un diterpène qui se fixe dans une poche hydrophobe et forme un pont stabilisateur entre les domaines cytoplasmiques C1 et C2 (Simonds, 1999).

Les adénylates cyclases présentent des sensibilités différentes aux divers régulateurs tels que les protéines kinases, la calmoduline et le calcium. Les formes AC5 et AC6, prédominantes dans le cœur, sont inhibées par des concentrations de calcium de l'ordre du micromolaire d'une façon calmoduline-indépendante. Une régulation directe des adénylates cyclases par le calcium présent à des doses physiologiques dans les cellules natives n'a pas été montrée à ce jour (Defer et al., 2000). Dans tous les cas, une concentration d'un millimolaire de calcium inhibe l'ensemble des adénylates cyclases. Les AC5 et AC6 peuvent aussi être bloquées par la protéine kinase A. La protéine kinase C et les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G constituent également des facteurs inhibiteurs de l'AC6 (Simonds, 1999). D'autres adénylates cyclases telles que AC1, 2, 3, 4, 7 et 9 sont sensibles au complexe $\beta\gamma$. Cette régulation est cependant insuffisante pour affecter l'activité de ces protéines. La co-transfection de différentes isoformes des protéines G $\beta\gamma$ avec des adénylates cyclases a montré la complexité du processus de régulation des AC par les protéines G (Simonds, 1999). Ces études suggèrent que les mécanismes modulant l'activité des adénylates cyclases impliqueraient différents acides aminés du complexe $\beta\gamma$. La sous-unité β contient un site de liaison à la calmoduline qui pourrait être un site compétitif entre les adénylates cyclases et la calmoduline.

b)-La protéine kinase A : cible de l'AMPc

L'AMPc exerce ses effets dans les cellules animales principalement en activant une enzyme, la PKA (Scott, 1991). Elle catalyse le transfert du groupement phosphate terminal de l'ATP sur des résidus sérines ou thréonines de protéines cibles. Cette phosphorylation module l'activité de ces protéines. Dans son état inactif, la PKA est un complexe constitué de deux sous-unités catalytiques C et de deux sous-unités régulatrices R (figure 28). Trois isoformes de la sous-unité catalytique existent α , β , γ et deux types de sous-unité régulatrice RI (α et β) et RII (α et β) (Scott, 1991 ; Beebe, 1994). RI α , RII α , C α et C β sont les sous-unités prédominantes dans le cœur (Krall et al., 1999). La liaison de l'AMPc aux sous-unités régulatrices induit un changement conformationnel responsable de la dissociation de ces sous-unités du complexe. Chaque sous-unité R possède deux sites de fixation de l'AMPc. Leur libération s'effectue grâce à un mécanisme de coopération nécessitant la liaison de plus de deux molécules d'AMPc sur le tétramère (Scott, 1991). Les sous-unités catalytiques libres deviennent alors actives. Il existe au moins deux types de PKA dans la majorité des cellules

de mammifère: PKAI et PKAII. Le type I est principalement localisé dans le cytosol, tandis que le type II est fixé (Krall et al., 1999), *via* sa sous-unité régulatrice, à la membrane plasmique. Cette liaison se fait par l'intermédiaire des protéines AKAP (A-kinase Anchoring Proteins), protéines d'ancrage aux membranes plasmiques, endoplasmiques et nucléaires et aux microtubules (figure 27) (Colledge & Scott, 1999 ; Skalhegg & Tasken, 2000 ; Feliciello et al., 2001 ; Kapiloff, 2002).

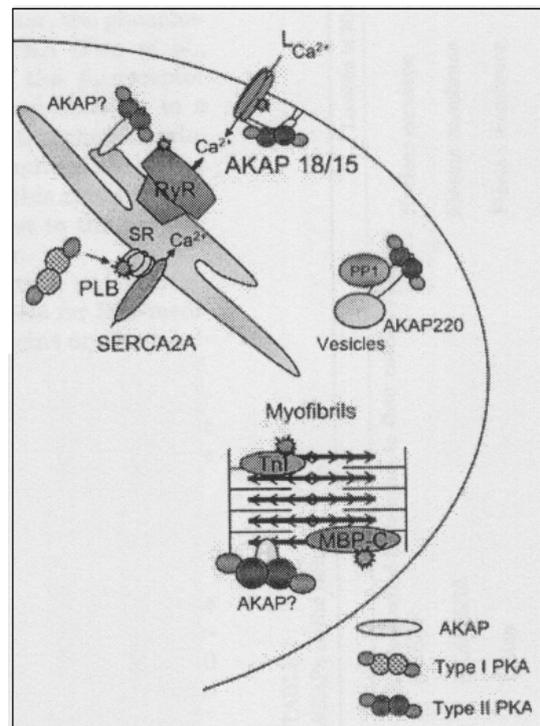


Figure 27 : Modèle de fonctionnement d'un complexe AKAP18/15-PKA associé au canal calcique de type L au niveau de la membrane plasmique d'une cellule cardiaque.

Sont présentés le RS, le canal calcique RyR et un complexe AKAP -PKA associé ; une vésicule cytosolique et un complexe AKAP-PKA-phosphatase (PP1) associé ; les phospholambanes (PLB) liés à la pompe SERCA2A qui sont la cible d'une PKA ; les myofibrilles qui sont également la cible d'une PKA.

Reproduit et modifié, d'après Kapiloff, 2002.

Lorsque les sous-unités catalytiques sont libérées et activées, elles peuvent phosphoryler leurs substrats (Lodish et al., 1997). Les PKA phosphorylant les canaux ioniques tel que le canal calcique $I_{Ca^{2+},L}$, ont une activité enzymatique dépendante des protéines AKAP (Fink et al., 2001 ; Hulme et al., 2001). Le site d'interaction entre la PKA et l'AKAP 18/15 cardiaque liant le canal calcique est de type leucine-zipper (figure 27). Ces PKA agiraient donc de façon compartimentalisée au sein d'un complexe (Kapiloff, 2002).

La phosphorylation protéique dépendante de l'AMP cyclique fut d'abord révélée par des études du métabolisme du glycogène dans les cellules du muscle squelettique. Dans les cellules animales, une augmentation de la concentration en AMPc active la transcription de gènes spécifiques (figure 28). Ces gènes contiennent une région régulatrice appelée CRE (cyclic AMP response element) (figure 28). Cette séquence d'ADN est reconnue par une protéine de liaison CREB (CRE-binding protein) (figure 28). Lorsque la protéine CREB est phosphorylée par la PKA sur un résidu sérine (figure 28), son activité fonctionnelle est stimulée sans pour autant modifier ses propriétés de liaison à l'ADN. La transcription du gène concerné est alors induite.

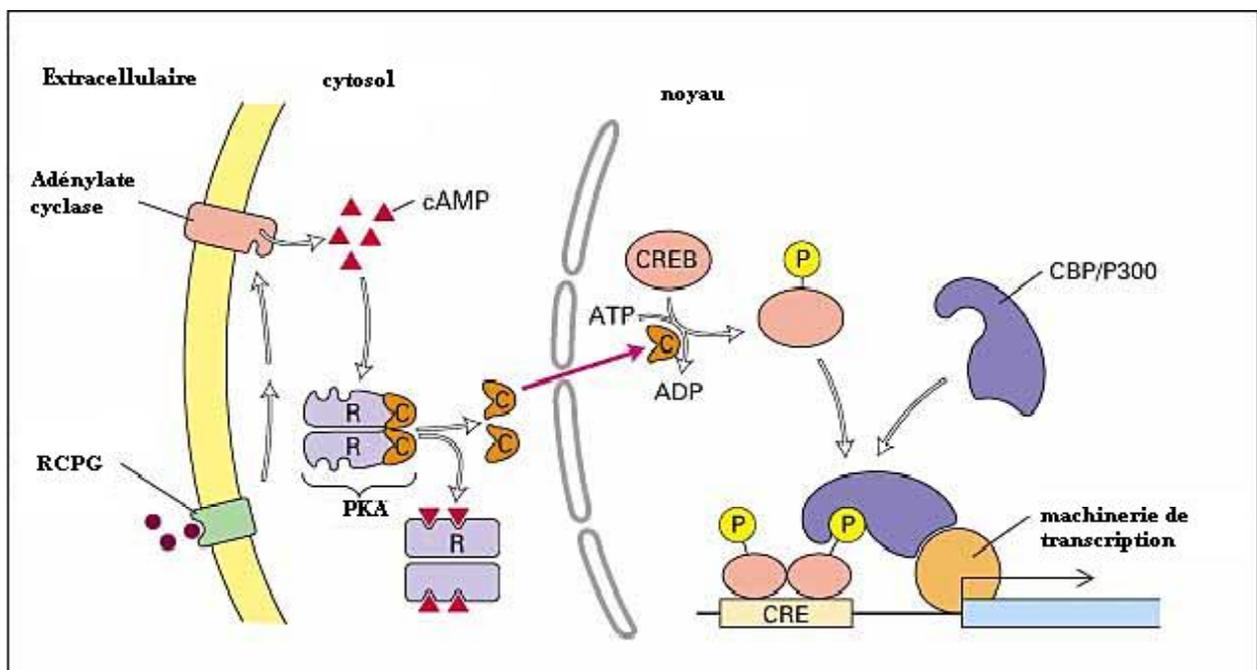


Figure 28 : Chemin de transduction des RCPG dans une cellule de mammifère menant à l'activation du facteur de transcription CREB activant l'élément de réponse CRE sur l'ADN. La PKA est présentée avec ses sous-unités régulatrices (R) et catalytiques (C) ; CBP/P300 est un facteur de transcription associé à CREB. Reproduit et modifié, d'après Lodish et al., 1997.

c)-Les protéines phosphatases : facteurs régulateurs des PKA

Les effets de l'AMPc doivent être transitoires. Les cellules sont capables d'éliminer les groupements phosphates des résidus sérines et thréonines des protéines phosphorylées par la PKA. Ce processus est catalysé par quatre groupes de phosphatases à sérine/thréonine : les phosphatases I, IIA, IIB et IIC. A l'exception de la protéine phosphatase IIC, ces enzymes sont composées d'une sous-unité catalytique complexée à une ou plusieurs sous-unités régulatrices. La protéine phosphatase I joue un rôle important dans la réponse à l'AMPc. La protéine phosphatase IIA a une large spécificité et semble être la principale phosphatase

responsable de la suppression de nombreux groupements phosphates sur des résidus sérines ou thréonines. Elle a un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire. La protéine phosphatase IIB, aussi appelée calcineurine, est activée par le calcium et est particulièrement abondante dans le cerveau. L'activité des protéines modulées par des phosphorylations dépend de l'équilibre à un instant donné entre les activités des kinases et des phosphatases en permanence actives.

d)-Les phosphodiesterases : régulateur de la concentration en AMPc intracellulaire

Les phosphodiesterases (PDE) forment une famille d'enzymes dont les substrats sont deux messagers intracellulaires, l'AMPc et le GMPc. Le rôle des PDE est de les dégrader. La concentration de ces messagers intracellulaires est donc la résultante de leur synthèse moins leur dégradation. Les PDE possèdent un site catalytique et un site de régulation. Une cinquantaine d'enzymes existent et proviennent de 19 gènes (Conti & Jin, 2000). Dans le cœur, seuls 4 types de PDE ont été identifiés : PDE1, PDE2, PDE3 et PDE4. Ces protéines sont retrouvées soit dans le cytosol et la membrane plasmique (PDE2, PDE3 et PDE4) soit uniquement dans le cytoplasme (PDE1) (Stoclet et al., 1995). Les formes présentes au niveau de la membrane seraient fixées par des protéines similaires aux AKAP (Dodge et al., 2001 ; Verde et al., 2001). Les PDE 1, 3 et 4 possèdent des sites de phosphorylation pour la PKA. L'IBMX, la théophylline et la caféine appartenant à la famille des xanthines, sont couramment utilisés comme des inhibiteurs non spécifiques de ces enzymes. Les propriétés de ces quatre PDE sont les suivantes (Beavo, 1995 ; Verde et al., 1999 ; Conti & Jin, 2000):

- *La PDE1* : Elle est activée par la Ca^{2+} /calmoduline et a pour cible l'AMPc et le GMPc. Ses inhibiteurs spécifiques sont le MIMX et la nimodipine.
- *La PDE2* : Elle est activée par le GMPc et a pour cible les deux acides nucléiques. Son inhibiteur spécifique est l'EHNA.
- *La PDE3* : Elle est inhibée par le GMPc et a pour cible l'AMPc et le GMPc. Ses inhibiteurs spécifiques sont le milrinone et la cilostamide.
- *La PDE4* : Elle n'est pas modulée par le GMPc et a pour cible uniquement l'AMPc. Son inhibiteur est le rolipram.

L'action des PDE semble être localisée au sein de microdomaines. Les effets fonctionnels induits par l'AMPc intracellulaire seraient liés à une compartimentalisation physique et/ou fonctionnelle de l'AMPc (Bers & Ziolo, 2001 ; Steinberg & Brunton, 2001) avec les PDE régulatrices (Georget et al., 2003). La concentration d'AMPc ne serait pas la même dans tous les domaines (Lipskaia et al., 2000). Elle serait fonction des PDE présentes

dans ces microsites. L'ensemble AMPc, PKA et PDE fonctionnerait alors en microdomaines et serait co-localisé avec les effecteurs tel que le canal calcique de type L. Cette répartition permettrait d'avoir une action plus ciblée et plus rapide sur les effecteurs membranaires. Ces caractéristiques auraient un rôle protecteur pour la cellule en empêchant le signal de perdurer (Georget et al., 2003). Les cellules au repos présentent un niveau basal d'AMPc. Il semble être régulé par les PDE (Levi et al., 1989 ; Méry et al., 1991 et 1995; Rivet-Bastide et al., 1997). La PDE 2 serait impliquée dans la régulation de cette activité constitutive dans les cellules atriales humaines (Verde et al., 1999).

e)-Efflux d'AMPc hors de la cellule : autre élément régulateur de la concentration en AMPc intracellulaire

L'AMPc extracellulaire est métabolisé par les phosphodiésterases (Orlov & Maksimova, 1999) et la 5'-nucléotidase extracellulaires. Il est alors transformé en adénosine. Cette substance peut ensuite activer les récepteurs à adénosine A₂, couplés positivement à l'adénylate cyclase. Dans l'étude de Orlov & Maksimova en 1999, l'accumulation d'AMPc extracellulaire est analysée sur des fibroblastes de rat. Le modèle mathématique proposé est le suivant : $a(t) = k_0 c(t)$, $c(t)$ varie dans un intervalle de temps $[0 ; T]$. a et c sont les quantités d'AMPc accumulées respectivement dans les milieux extra- et intracellulaire de la cellule. Ce modèle suggère que l'efflux d'AMPc est proportionnel à la production intracellulaire sans saturation du pore faisant transiter le messager, pendant un certain laps de temps. La constante k_0 varie en fonction des tissus étudiés. La cinétique d'efflux de l'AMPc suggère donc l'implication d'un transport passif au travers d'un canal spécifique. Toutefois, la protéine membranaire impliquée n'a pas été identifiée. Chez les procaryotes, il semblerait que cette protéine appartienne à la famille des transporteurs ABC. Le même modèle mathématique a été décrit pour l'efflux de GMPc. Ces travaux ont permis d'indiquer que le taux d'AMPc est régulé à 85 % par les phosphodiésterases et 15 % par le système d'efflux extracellulaire durant la première heure d'activation des adénylates cyclases. Ensuite, la contribution respective de ces systèmes passe à 40 % pour les phosphodiésterases et 60 % pour le système d'efflux. Cette étude montre donc l'importance d'une autre voie de régulation du taux d'AMPc intracellulaire encore mal connue.

L'efficacité de transmission d'un signal à l'intérieur d'une cellule dépend de l'amplification et de l'extinction de ce signal. L'extinction détermine la période réfractaire du système, pendant laquelle la cellule retrouve ses capacités de réponse à de nouvelles

stimulations. Cette période est dépendante du temps nécessaire au découplage des récepteurs avec les protéines G_s et des phosphodiésterases. Ces critères sont valables uniquement pour des temps courts d'activation de l'adénylate cyclase.

2-Le second messenger : l'ion Ca^{2+}

La concentration en calcium libre cytosolique est extrêmement faible ($\leq 10^{-7}$ M), alors qu'elle est élevée dans l'espace extracellulaire (environ 10^{-3} M) et le réticulum sarcoplasmique. Il existe donc un fort gradient de concentration qui tend à faire pénétrer le Ca^{2+} dans le cytosol à travers la membrane plasmique. Lorsqu'un signal active les récepteurs aux dihydropyridines (DHPR) présents dans la membrane plasmique; les ions Ca^{2+} entrent dans le cytosol, et provoquent une libération du calcium présent dans le réticulum sarcoplasmique *via* le mécanisme de CICR (calcium induced calcium released) décrit au chapitre I. Ce messenger active les protéines intracellulaires sensibles au Ca^{2+} dans la cellule. La modulation du courant calcique peut donc influencer la quantité de calcium libéré par le RS et donc agir sur l'amplitude de la force de contraction.

a)-Rôle du récepteur à l' IP_3

Lorsqu'un RCPG couplé à la protéine G_q est stimulé par son ligand, la protéine G_q active à son tour une phospholipase C- β . En moins d'une seconde, cette enzyme clive le PIP_2 pour donner deux produits : l'inositol triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG). L' IP_3 active les récepteurs canaux à l' IP_3 situés dans la membrane du RS induisant ainsi une sortie de calcium dans le cytosol. Le DAG, le calcium ainsi que le phosphatidylsérine activent une protéine kinase C, qui phosphoryle des protéines régulatrices de l'expression de gènes spécifiques. Cette voie de transduction n'est pas la voie principale de transmission du signal à l'intérieur des cellules cardiaques, car sa cinétique d'action est lente et la sortie de calcium est faible (Woodcock et al., 1998).

b)-Rôle du récepteur à la ryanodine

Le récepteur à la ryanodine (RyR) est composé de quatre sous-unités de 560 kDa incluses dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (Meissner et al., 1994) (figure 29). L'extrémité C-terminale est une région hydrophobe constituant le pore du canal calcique (Takeshima et al., 1989). Alors que, la séquence N-terminale est très hydrophile et forme une structure de grande taille qui se projette dans le cytosol vers les tubules T (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Ces récepteurs sont des canaux calciques sélectifs aux cations.

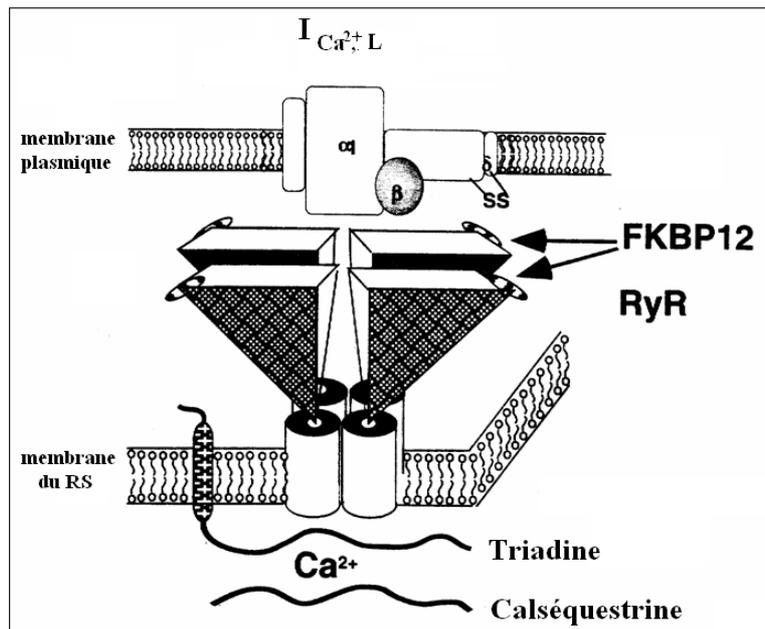


Figure 29 : Structure d'un récepteur Ryanodine RyR.

RyR est à proximité d'un canal calcique de type L au niveau d'un tubule T. FKBP12 est une protéine de maintien des extrémités N-terminale du récepteur.

Reproduit et modifié, d'après Marks, 1997.

Il existe trois types de récepteurs RyR chez les mammifères (Dulhunty & Pouliquin, 2003) : RyR1, RyR2 et RyR3. RyR1 est présent essentiellement dans le muscle squelettique. Alors que, RyR2 est exprimé principalement dans le muscle cardiaque (Sutko & Airey, 1996). Enfin, RyR3 est localisé plus particulièrement dans le cerveau. Il est également présent dans le cœur en plus faible quantité (Takeshima et al., 1996 et 1998). Ces isoformes présentent 65 à 70 % d'homologies entre elles.

Divers sites de régulation sont localisés sur la partie N-terminale. L'activité des récepteurs RyR est modulée par le calcium, le magnésium, l'ATP, le pH intracellulaire ainsi que la protéine FKBP12 (Marx et al., 2000). A l'état de repos, les canaux calciques fixent une molécule immunosuppressive FK-506, diminuant la probabilité d'ouverture des canaux calciques. Lors d'une stimulation, la protéine de liaison FKBP12 (*FK binding protein*) se fixe sur FK-506 et favorise l'ouverture des récepteurs RyR (figure 29). De plus, ces canaux peuvent également être phosphorylés par les protéines PKA, PKC, PKG, et la protéine kinase dépendante du complexe calcium-calmoduline de type II (CaM kinase II) (Korzick, 2003). Deux phosphatases I et IIA, ainsi que la calmoduline (Fruen et al., 2000) semblent aussi moduler l'activité des récepteurs RyR.

De nombreuses études biochimiques et de biologie moléculaire ont permis d'identifier plusieurs protéines associées à ces récepteurs. Nous pouvons citer : 1) la calséquestrine, qui est présente dans la partie luminale des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique jonctionnel (figure 29). Son rôle est de fixer le calcium libre du RS (Bers, 2002) ; 2) la jonctine et la triadine qui interagissent physiquement avec les récepteurs RyR dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (figure 29) ; 3) La sorcine et plusieurs types d'annexines ont également été identifiées. Les protéines des points 2) et 3) régulent le mécanisme d'ouverture du canal calcique (Zhang et al., 1997).

Les récepteurs RyR s'ouvrent sous l'effet d'une augmentation locale et rapide de la concentration en calcium cytosolique, située entre 1 et 100 μM . Deux à quatre ions calciques se fixent par récepteurs RyR et induisent le mécanisme de CICR provoquant ainsi une libération du calcium contenu dans le RS. Puis, ces canaux se ferment lentement sans pour autant que ce phénomène soit un processus de désensibilisation puisqu'il conserve la capacité de répondre à une nouvelle variation calcique de plus grande amplitude (Hattem et al., 1999). Les récepteurs à la ryanodine sont sensibles essentiellement à la ryanodine et à la caféine. La ryanodine produit deux effets opposés sur RyR2. En effet à faible concentration (nM à μM), elle stimule l'ouverture du canal calcique. Alors qu'à forte concentration ($> 0.3 \text{ mM}$), elle bloque ce canal (Bers & Perez-Reyes, 1999). L'effet de la caféine est également dépendant des doses utilisées. A forte concentration ($> 1 \text{ mM}$), elle entraîne une libération massive de calcium pouvant induire une contracture, alors qu'à faible dose, de l'ordre de 0.5-1 mM, elle potentialise le courant calcique (Eisner et al., 1998). D'un point de vue clinique, une mutation de ce canal induit des morts subites dues à des troubles du rythme cardiaque (Marks, 2002).

c)-Oscillations calciques

Les récepteurs DHP et RyR forment une unité fonctionnelle. A l'état de repos, une libération constitutive de calcium est observée (figure 30). Ces événements élémentaires correspondent aux « calcium sparks » ou étincelles calciques (Bers, 2002). Ils sont rares et de faible amplitude. Cette libération basale correspond à l'activation d'un groupe (*cluster*) de 6 à 20 récepteurs RyR (Cheng et al., 1993 ; Wier & Balke, 1999 ; Bridge et al., 1999 ; Lukyanenko, 2000). Suite à un potentiel d'action, plusieurs milliers d'étincelles calciques sont déclenchées de façon synchronisée. Ce processus est amplifié grâce à un deuxième

mécanisme de CICR situé entre les récepteurs RyR. En effet, les récepteurs RyR activés par le calcium extracellulaire libèrent le calcium du RS. Ce calcium activera à son tour les récepteurs RyR les plus éloignés des récepteurs DHP. Ces derniers pourront également

participer à la libération du calcium sarcoplasmique. L'ensemble de ces phénomènes permettent la formation d'une vague calcique immédiate ou d'oscillations calciques. L'ouverture des canaux calciques de type L augmente la probabilité de la survenue de ces étincelles sans pour autant modifier leur durée et leur amplitude.

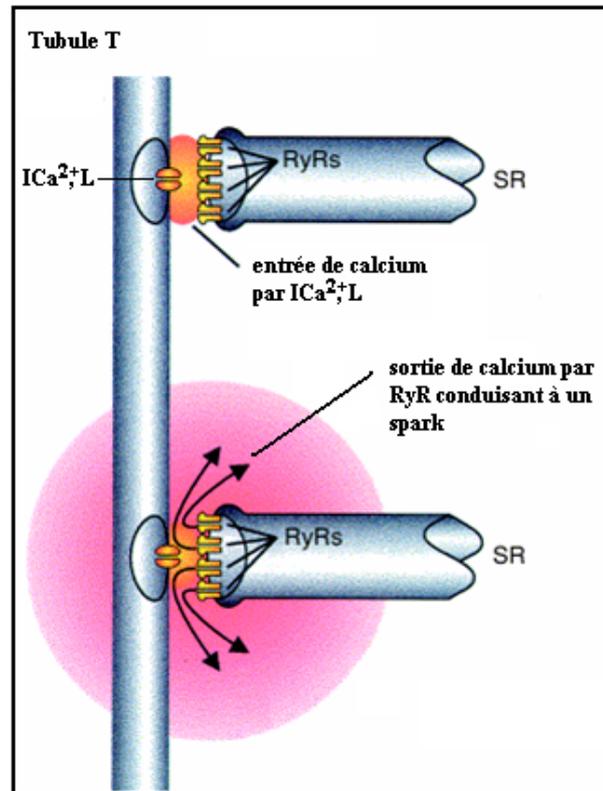


Figure 30 : Etincelle calcique ou *spark* au sein d'un complexe récepteur DHP/récepteur RyR. Activation du $I_{Ca^{2+},L}$ suivie d'une sortie de calcium des récepteurs RyR provoquant le spark. La vague calcique est le résultat de la sommation de ces événements élémentaires. Reproduit et modifié d'après Cannell & Soeller, 1998.

d)-Pompes et échangeurs : maintien de l'homéostasie calcique cellulaire

Une fois le couplage excitation-contraction effectué, la relaxation provient de la dissociation du calcium de la troponine C et de l'intervention de la troponine I. Le calcium ainsi libéré doit être recapté, afin que la relaxation soit complète. Pour cela, trois processus sont responsables : l'ATPase calcique sarcoplasmique ou SERCA qui est proposée être le principal acteur de la relaxation ; l'échangeur Na^+/Ca^{2+} et l'ATPase calcique de la membrane plasmique ou PMCA.

Les ATPases calciques : SERCA et PMCA:

Trois isoformes de pompes SERCA ont été identifiées : SERCA1, SERCA2 et SERCA3. Elles sont codées par trois gènes différents. Ces protéines sont indispensables pour le maintien de l'homéostasie calcique. Elles permettent l'entrée du calcium cytosolique dans la lumière du RS, malgré le gradient de concentration calcique élevé. Ces pompes transportent deux moles de Ca^{2+} par mole d'ATP hydrolysée. La protéine SERCA2 est présente dans le muscle cardiaque. Dans le cœur, le RS contient une protéine de bas poids moléculaire appelée phospholambane. Actuellement, la stoechiométrie exacte de fonctionnement n'est pas connue. Celle proposée est de une à deux molécules de phospholambane pour une ATPase calcique (Bers, 2002). A l'état de repos, ce facteur inhibe l'activité de cette pompe (Ravens & Dobrev, 2000). Suite à une stimulation, le phospholambane est phosphorylé par la PKA principalement et la calmoduline kinase. L'inhibition de la protéine SERCA est alors levée. Le calcium est donc recapté dans le RS. Les effets lusitropes sont également liés à la troponine I qui favorise la dissociation du calcium des myofilaments (Li et al., 2000).

Les pompes ATPases calciques du sarcolemme PMCA ont une activité similaire à celle des protéines SERCA. Cependant, elles extrudent le calcium cytosolique dans l'espace extracellulaire. Les caractéristiques de ces protéines ne seront pas détaillées dans ce mémoire (pour revue, voir Carafoli & Brini, 2000).

Les ATPase SERCA recaptent environ 70 % du calcium cytosolique. L'homéostasie calcique est également maintenue grâce à la participation des PMCA (1%) et de l'uniport calcique présent dans la membrane des mitochondries (1 %). Peu de données sont connues sur ce transporteur (Carafoli & Brini, 2000 ; Bers, 2002).

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$:

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transporte 3 ions Na^+ contre 1 ion Ca^{2+} (Bers, 2002), ce qui produit un courant ionique électrogène ($I_{\text{Na/Ca}}$). L'échangeur est réversible et peut soit faire sortir les ions Ca^{2+} de la cellule, soit les faire entrer (Fujioka et al., 2000 ; Egger & Niggli, 2000). Dans le cas d'une sortie d'ions Ca^{2+} , le courant $I_{\text{Na/Ca}}$ net sera entrant. A l'inverse, le courant de l'échangeur sera sortant. De fortes concentrations de calcium intracellulaire favorisent l'efflux calcique, alors que de fortes concentrations de sodium intracellulaire favorise l'influx de calcium. A l'état de repos, l'efflux calcique est favorisé. Lors du potentiel d'action, l'activation du canal calcique voltage dépendant induit un courant entrant de Ca^{2+} , qui est suivi de la stimulation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ce dernier favorise une sortie de Ca^{2+} de la cellule et donc une entrée de Na^+ . Les ions Na^+ participent alors au maintien du plateau du

potentiel d'action cardiaque (Leblanc & Hume, 1990 ; Trafford et al., 1995). Lors de la repolarisation, l'échangeur conserve ce sens de fonctionnement. Celui-ci agit physiologiquement dans le sens de la sortie de calcium de la cellule. Certaines conditions expérimentales forcent le système à changer de sens et entraînent une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ . Ces observations ont lieu lors de l'utilisation de digitaliques (bloqueurs des ATPases Na^+/K^+), de l'inhibition du courant Ca^{2+} et du prolongement de la durée du potentiel d'action (Dipla et al., 1999). La participation de ce dernier au maintien de l'homéostasie calcique est d'environ 28 % dans le muscle cardiaque humain. Aucun inhibiteur spécifique n'est disponible pour cet échangeur .

3-Interactions entre seconds messagers :

L'ion Ca^{2+} et l'AMPc ne sont pas des messagers indépendants l'un de l'autre (Zaccolo & Pozzan, 2003). Ils agissent en synergie pour générer des réponses cellulaires. Les arguments en faveur de cette interaction sont les suivants (Guénard, 1996) :

- l'AMPc module les propriétés cellulaires du Ca^{2+} , et inversement
- l'AMPc contrôle la sensibilité au calcium de certaines protéines
- les protéines-kinases dépendantes du Ca^{2+} ou de l'AMPc phosphorylent les mêmes protéines
- le Ca^{2+} et l'AMPc contrôlent des activités cellulaires similaires, comme la sécrétion et la contraction musculaire

Des travaux récents sont en faveur d'interactions entre ces deux voies de signalisation (Gorbunova & Spitzer, 2002 ; Zaccolo & Pozzan, 2003). En effet, dans les cellules neurales d'embryon de Xénope, les étincelles calciques spontanées sont accompagnées d'un changement transitoire de la concentration intracellulaire d'AMPc. Ces observations indiquent que les oscillations calciques et le taux d'AMPc sont strictement dépendants les uns des autres. De plus, les auteurs ont montré qu'une faible fréquence d'étincelles calciques génère des oscillations dans la concentration d'AMPc. Alors qu'avec une plus grande fréquence de sparks, aucun changement est induit. Les oscillations calciques influenceraient donc la concentration intracellulaire en AMPc. (Alberts et al., 1994; Guénard, 1996).

Ce fonctionnement synarchique explique la grande plasticité de la réponse cellulaire malgré une action stéréotypée de ces deux messagers pris isolément. Nous ne rentrerons pas plus dans les détails des modalités permettant la réalisation de cette synergie cellulaire (voir les références : Rapp & Berridge, 1977 ; Cooper et al., 1995 ; Houslay & Milligan, 1997).

B-la signalisation par l'intermédiaire de récepteurs - enzymes

Les récepteurs à activité enzymatique sont des protéines transmembranaires, dont le site de liaison du ligand est située dans la partie extracellulaire de ces récepteurs. N'étant pas associé à une protéine G trimérique, ils possèdent soit une activité enzymatique intrinsèque au niveau du domaine cytosolique, soit des interactions avec des protéines kinases intracellulaires. A la différence d'un récepteur couplé aux protéines G, ces récepteurs « catalytiques » sont formés généralement d'un seul domaine transmembranaire.

Cinq classes de récepteurs sont connues : (1) à *activité guanylate cyclase*. Ils catalysent la production de GMP cyclique; (2) à *activité tyrosine kinase*. Ils phosphorylent des protéines au niveau des résidus tyrosines; (3) à *activité sérine/thréonine kinase*. Ils phosphorylent des protéines sur des résidus sérines ou thréonines; (4) à *activité tyrosine phosphatase*. Ces récepteurs enlèvent les groupements phosphates des résidus tyrosines, et (5) *les récepteurs associés aux tyrosines kinases*. Ils interagissent avec des kinases spécifiques des résidus tyrosines.

La guanylate cyclase est une enzyme ubiquitaire qui catalyse la formation de GMPc à partir du GTP (Hobbs, 1997). Ce second messenger agit ensuite sur une protéine kinase spécifique, la PKG. Cependant, contrairement à l'adénylate cyclase, la guanylate cyclase n'est pas contrôlée par une protéine G. Cette enzyme existe sous deux formes : une forme membranaire constituant les récepteurs à activité guanylate cyclase citée précédemment (exemple : récepteur des peptides atriaux natriurétiques) et une forme soluble cytoplasmique. L'enzyme soluble est un hétérodimère formé de deux sous-unités, α et β , associées à un hème. Elle est activée par l'acide arachidonique ainsi que par les substances contenant du monoxyde d'azote (NO).

Le fonctionnement des récepteurs à activité tyrosine kinase est encore mal connu. La tyrosine kinase phosphoryle des résidus tyrosines appartenant au récepteur lui-même (auto-phosphorylation) et/ou présents sur différentes protéines intracellulaires. C'est la cas du récepteur à l'insuline ou des récepteurs aux facteurs de croissance. Il existe également des récepteurs à activité tyrosine phosphatase, dont l'activation conduit à la suppression des groupements phosphates sur des résidus tyrosines. Enfin, comme pour la guanylate cyclase, des tyrosines phosphatases cytosoliques ont également été décrites.

IV- Le canal calcique de type L

A-Généralités

L'intervention du calcium dans le potentiel d'action cardiaque fut tout d'abord évoquée par Coraboeuf et Weidmann dès 1949. Puis, Fatt et Katz en 1953, décrivent la participation des ions calcium dans le potentiel d'action des fibres musculaires de crabe. Il a fallu attendre la fin des années 60 pour que Reuter et Rougier *et al.* (1968 et 1969) mettent en évidence la présence d'un courant lent au niveau cardiaque activé par la dépolarisation et porté par les ions calcium. La mesure du courant transitant au niveau d'une cellule isolée n'a été permise qu'à partir du développement de la technique de « patch clamp » (Hamill et al., 1981).

Les canaux calciques sont des protéines membranaires qui régulent la concentration intracellulaire d'ions calcium. Ils sont activés par le voltage et sont essentiels dans la fonctionnalité de la cellule cardiaque. Dans beaucoup de pathologies du myocarde, les dysfonctionnements des canaux calciques sont largement impliqués. Ils génèrent une activité électrique anormale ainsi que des arythmies. Deux classes de canaux ont été identifiés : (1) Des protéines avec un bas seuil d'activation LVA (Low-voltage activated) et (2) des protéines à haut seuil d'activation, HVA (high-voltage activated). Des études de biologie moléculaire ont permis de distinguer trois types de canaux LVA et deux types de canaux HVA. Les trois protéines LVA correspondent aux canaux calciques de type T (transient) différenciés par leurs sous-unités α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} . Les deux protéines HVA sont constituées par : (1) les canaux calciques de type L (long-lasting) distingués par leurs sous-unités α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} et α_{1S} (2) les canaux calciques de type P (Purkinje), de type N (neither L neither T) et de type R (remaining) différenciés par leurs sous-unités α_{1A} , α_{1B} et α_{1E} respectivement (Hofmann et al., 1999). Les canaux calciques les plus abondants au niveau cardiaque sont les canaux HVA de type L contenant la sous-unité α_{1C} .

B-Le canal calcique de type L cardiaque

Le calcium provenant de ces canaux intervient dans le phénomène de contraction et le courant entrant constitué contribue au maintien du plateau du potentiel d'action. Dans les conditions physiologiques, le potentiel membranaire d'activation du courant calcique macroscopique $I_{Ca^{2+},L}$ est autour de -40 mV. L'amplitude du courant maximal est atteinte vers $0/+10$ mV. La conductance unitaire de ce canal est dépendante de l'espèce ionique perméante et elle est de 25 pS en présence de 100 mM de baryum (Ba^{2+}) (McDonald et al., 1994). La conductance élevée de cette protéine ainsi que la durée d'activation longue du

courant (300 ms) contribuent conjointement à une augmentation sous-membranaire de la concentration en calcium (atteinte de 10^{-6} à 10^{-3} M de Ca^{2+} intracellulaire). Elle est suffisante pour activer et déclencher une libération du calcium par le RS. D'un point de vue pharmacologique, le canal $\text{I}_{\text{Ca}^{2+},\text{L}}$ est bloqué par trois classes de bloqueurs organiques : les dihydropyridines (DHP), les phénylalkylamines (PAA) et les benzothiazepines (BTZ). Il est le produit de quatre gènes codant pour les sous-unités $\alpha_{1\text{C}}$, $\alpha_{2\delta}$, β et γ . La sous-unité $\alpha_{1\text{C}}$ (figure 31) forme le pore du canal ionique et comporte le filtre de sélectivité ionique, la sensibilité au voltage ou « voltage sensor », des sites d'interactions pour les sous-unités auxiliaires $\alpha_{2\delta}$ et β , pour les calmodulines, ainsi que pour les substances pharmacologiques modulant ce canal. Le canal calcique de type R ($\alpha_{1\text{E}}$) est également présent dans le cœur et plus particulièrement dans les cellules endocrines cardiaques.

1-La sous-unité $\alpha_{1\text{C}}$

La forte homologie entre les différentes sous-unités α_1 des canaux calciques, Na^+ et K^+ suggère qu'elles proviennent d'un même gène ancestral ayant donné naissance à une famille de gènes codant pour les canaux dépendants du potentiel (Hofmann et al., 1999 ; Striessnig, 1999). Le poids moléculaire de $\alpha_{1\text{C}}$ se situe entre 170 kDa et 190kDa. Cette sous-unité est formée de quatre domaines de six segments transmembranaires (figure 31).

Le segment S4 de chaque répétition contient cinq à six acides aminés chargés positivement sensibles au potentiel membranaire. Lors des variations du potentiel membranaire vers des valeurs positives ces segments S4 modifient leur conformation et interviennent dans l'ouverture du canal. La région du pore ionique (région P) est formée par un connecteur liant les segments S5 et S6 dans chaque répétition. La sélectivité ionique du canal calcique est déterminée par quatre acides glutamiques (E413, E731, E1140 et E1441) situés dans la région P de chaque répétition. Les canaux LVA possèdent au contraire des acides aspartiques dans cette région, à l'origine d'une sélectivité différente (Perez-Reyes, 1998). Ces quatre acides glutamiques forment un unique site de liaison à haute affinité pour le calcium dans le pore. Les glutamates de chaque domaine interviennent différemment dans l'affinité du calcium (Perez-Reyes & Schneider, 1994), la sélectivité et la vitesse de perméation. Le profil de sélectivité proposé pour le canal calcique à partir de son potentiel d'inversion est le suivant : $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} \gg \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Mg}^{2+}$ (Hille, 1992). La région P joue également un rôle dans la réaction de la cellule face à l'acidification extracellulaire avec un site de liaison aux ions H^+ au niveau du pore. Plusieurs propriétés de la sous-unité $\alpha_{1\text{C}}$ telles que la dépendance au voltage, la cinétique et l'amplitude du courant des

canaux calciques sont modulés par la co-expression de la sous-unité β . Le site d'interaction de la sous-unité β avec α_{1c} est localisé au niveau de la boucle intracellulaire reliant les domaines I et II de la sous-unité α_{1c} (Walker & De Waard, 1998) (figure 31). L'absence de la région s'associant à la sous-unité β ainsi que celle du motif E-F qui fixe le calcium, sont encore des différences avec les canaux calciques LVA. Il est à noter qu'une nouvelle nomenclature des canaux calciques a été proposée distinguant trois groupes : les canaux calciques HVA sensibles aux DHP, insensibles aux DHP et les LVA appelés respectivement Ca_v1 , Ca_v2 et Ca_v3 (Ertel et al., 2000).

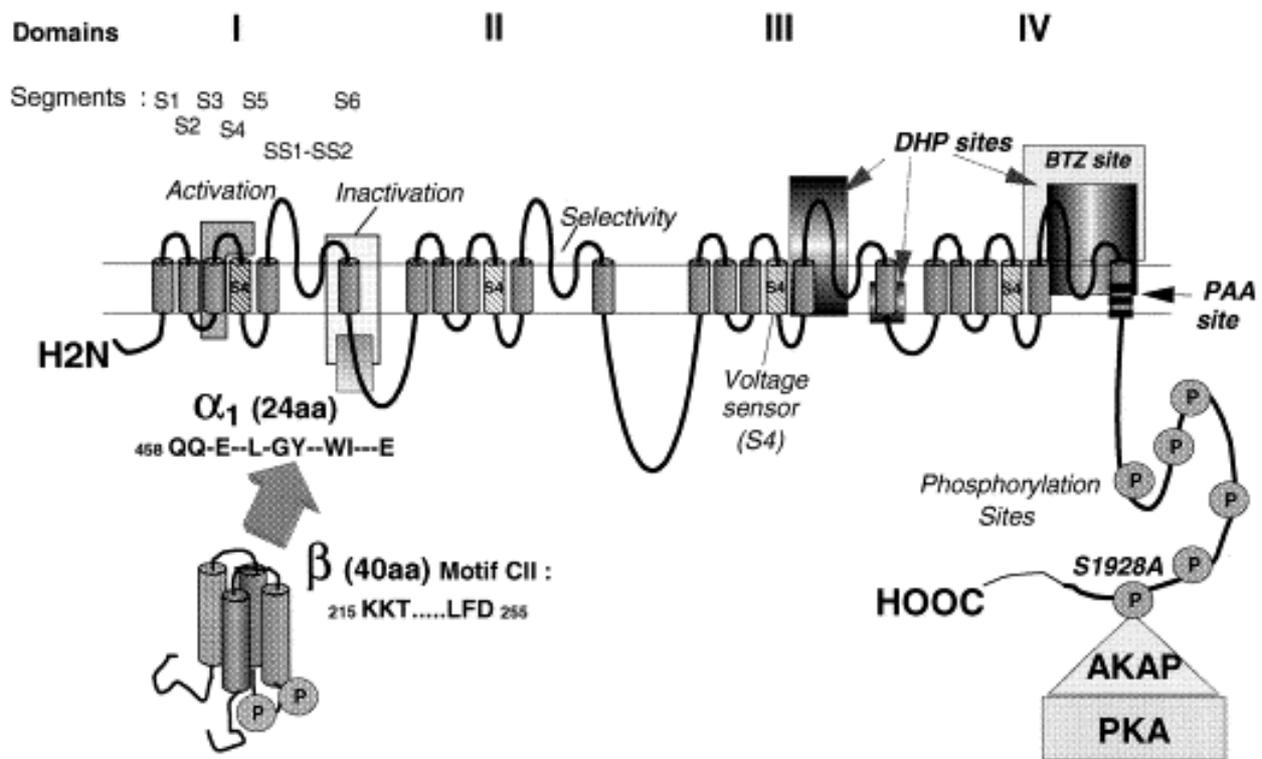


Figure 31 : Sous-unité α_{1c} du canal calcique de type L, ses sites de régulation, ses domaines (I à IV) et ses segments (S1 à S6), Reproduit d'après Richard et al., 1998.

2-La sous-unité β

La sous-unité β (figure 31) est une protéine localisée au niveau intracellulaire possédant cinq domaines et d'un poids moléculaire situé entre 50 et 72 kDa selon l'isoforme concernée. Celles-ci proviennent de quatre gènes (β_1 à β_4) donnant plusieurs variants d'épissage. β_1 est située plus spécifiquement dans le cerveau, le foie et les muscles squelettiques. β_2 est exprimée abondamment dans le cœur et en moindre quantité au niveau de l'aorte, de la trachée, des poumons et du cerveau. β_3 est détectée dans le cerveau et les

muscles lisses. β_4 est retrouvée dans le cerveau. Ces protéines ont une structure primaire possédant une séquence centrale commune (de D2 à D4) alors que les extrémités N-terminale (D1) et C-terminale (D5) ainsi qu'une partie de la région centrale sont très largement différentes (Hofmann et al., 1999). Toutes les sous-unités β ont un rôle de modulation du canal. Elles accélèrent les processus d'activation et d'inactivation et déplacent la courbe d'inactivation vers des potentiels membranaires plus hyperpolarisés (Cens et al., 1998 ; Hurley et al., 2000). Le canal calcique de type L cardiaque est exclusivement associé avec la sous-unité cardiaque β_{2a} . La modulation de la cinétique et de la dépendance au voltage de la sous-unité α_1 par les sous-unités β , dépend d'un motif conservé qui relie les deux types de sous-unités entre elles. Ce motif est un domaine de quarante acides aminés qui est localisé au niveau de l'extrémité N-terminale (figure 31). Toute modification dans cette région change ou abolit la stimulation du courant calcique ainsi que la liaison à la sous-unité α_{1c} (Pragnell et al., 1994).

3- La sous-unité $\alpha_2\delta$:

Cette sous-unité est hautement glycosylée (125 kDa). Les isoformes sont codées par trois gènes qui possèdent 30 % à 50 % de similitude. α_2 et δ sont reliées par un pont disulfure et proviennent d'un clivage protéolytique post-traductionnel (De Jongh et al., 1991). δ est reliée à la sous-unité α_{1c} par l'intermédiaire d'un unique segment transmembranaire et α_2 est localisée au niveau extracellulaire se servant de δ comme point d'ancrage. $\alpha_2\delta-1$ est ubiquitaire, $\alpha_2\delta-2$ est retrouvée dans différents tissus dont le cœur et $\alpha_2\delta-3$ est exprimée exclusivement dans le cerveau. La co-expression des sous-unités $\alpha_2\delta$, α_{1c} et β déplace la dépendance au voltage vers des potentiels hyperpolarisés et accélère les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant. Cette co-expression conduit également à une modulation du « gating » du canal. Au niveau cardiaque il n'est pas encore défini quelle sous-unité ($\alpha_2\delta-1$ ou $\alpha_2\delta-2$) est complexée à la sous-unité α_{1c} (Hofmann et al., 1999).

4- La sous-unité γ :

Les isoformes de cette sous-unité sont codées par cinq gènes (γ_1 à γ_5). Elles sont formées par quatre hélices transmembranaires possédant leurs extrémités N et C-terminales au niveau intracellulaire. Ces protéines sont formées de 222 acides aminés et ont un poids moléculaire de 25 kDa. Elles sont fortement glycosylées et possèdent deux sites extracellulaires de N-glycosylation. γ_1 est retrouvée uniquement au niveau du muscle squelettique. γ_2 possède 25 % de similitude avec γ_1 et est trouvée dans le cerveau (Letts et al.,

1998). γ_3 et γ_4 sont très similaires à γ_2 et sont trouvées dans différentes régions du cerveau. γ_5 possède 25 % de similitude avec γ_1 / γ_2 , est présente dans les muscles et dans d'autres tissus d'origine non neurale (Hofmann et al., 1999). La co-expression de la sous-unité γ avec α_{1c} , $\alpha_2\delta$ et β déplace la courbe d'inactivation vers des potentiels membranaires plus hyperpolarisés. Au niveau cardiaque, il semble que la sous-unité γ_5 puisse être associée à α_1 afin de former le canal calcique de type L ou de type T. Cependant, son expression en système cellulaire n'induit aucun effet électrophysiologique (Klugbauer et al., 2000). Il n'est toujours pas prouvé que la sous-unité γ soit réellement présente dans le cœur (Klugbauer et al., 2000).

C- Régulation du canal calcique de type L par le voltage, le calcium et les bloqueurs

L'activation du canal calcique se fait suivant une variation de potentiel (dépolariation) conduisant à une augmentation de la probabilité d'ouverture du pore (Po) formé par α_{1c} et laissant ainsi transiter les ions calcium. Le processus d'activation est également dépendant des autres sous-unités composant le canal. La variation de Po en fonction du potentiel de membrane est décrite par une équation de Boltzmann représentée par une sigmoïde (McDonald *et al.*, 1994). Si la dépolariation persiste, le canal peut également empêcher les ions calcium de transiter : c'est le phénomène d'inactivation. Il est également décrit par une équation de Boltzmann représentant la disponibilité des canaux (Argibay et al., 1988). Les phénomènes d'activation et d'inactivation du canal sont régulés par plusieurs facteurs, dont le potentiel de membrane, le calcium intracellulaire et la phosphorylation.

1-Régulation par le voltage

Les canaux calciques activés par le voltage, sont régulés par le potentiel membranaire. Les segments S4 du pore contenant des acides aminés chargés positivement, interviennent dans son ouverture par mouvement intramembranaire. Ce déplacement de charges génère un courant microscopique appelé courant de « gating » de type capacitif reflétant l'ouverture du canal. A l'état fermé, les constituants du pore sont positionnés dans la membrane proche de la surface intracellulaire. Ils traversent la membrane de l'intérieur vers l'extérieur afin d'ouvrir le canal (Jiang et al, 2003a et b). Ce mécanisme a été mis en évidence pour le canal potassique par R. Mackinnon lui conférant ainsi le prix Nobel en Octobre 2003 et est appliqué au canal calcique par analogie.

2-Inactivation et facilitation dépendantes du calcium

Les canaux calciques de type L présentent deux types d'inactivation : une lente et une rapide. L'inactivation lente serait dépendante du voltage et l'inactivation rapide serait provoquée par les ions calciques perméants (Argibay et al., 1988 ; Mc Donald et al., 1994). La proportion de ces deux phénomènes est dépendante de l'état stimulé ou non du récepteur couplé aux protéines G comme l'a montré Findlay, 2002 pour le récepteur β_2 -adrénergique dans les myocytes ventriculaires de cobaye. L'inactivation dépendante du calcium est un mécanisme de rétrocontrôle négatif par lequel l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire accélère l'inactivation du canal et prévient d'une surcharge calcique intracellulaire délétère. Ce type d'inactivation est important non seulement dans le cœur mais également dans les muscles lisses. Elle requiert un motif EF, (DeLeon et al., 1995) site putatif de fixation du calcium sur la partie proximale de la séquence C-terminale. Un motif IQ en aval fixe une calmoduline induisant ainsi une inactivation calcium-dépendante plus rapide (Peterson et al., 1999 ; Zühlke et al., 1999 ; Anderson, 2001 ; Maier & Bers, 2002). La contribution du phénomène d'inactivation dépendant du calcium ainsi que sa régulation sont résumées dans la revue de Findlay, 2003.

D'autre part, les canaux calciques de type L, possèdent un phénomène de facilitation. Il correspond à une potentialisation de l'amplitude du courant et est déclenché par une augmentation modérée et locale de la concentration calcique (Noble & Shimoni, 1981 ; Gurney et al., 1989 ; Dolphin, 1996). Il semble que le motif IQ trouvé sur l'extrémité C-terminale intervienne dans ce phénomène (Zuhlke et al., 1999 ; Qin et al., 1999). Cependant, la facilitation peut requérir l'intervention d'une PKA (Dolphin, 1996). Elle est décrite comme un rétrocontrôle positif associé à un ralentissement de l'inactivation dépendante du calcium (Fedida et al., 1988). Celui-ci serait en partie dû à une diminution de la libération de calcium du RS (Delgado et al., 1999).

3-Régulation par les bloqueurs

Le canal calcique est une cible d'un grand nombre de substances à intérêt thérapeutique. Les trois grandes classes de médicaments sont les DHP, PAA et BTZ (figure 31). Ils se lient uniquement sur la région transmembranaire du domaine IV (figure 31) de la sous-unité α_{1C} alors que les DHP se lient également sur des sites additionnels des domaines I et III (Striessnig et al., 1998 ; Zahradnikova et al., 1998). Cette classe est constituée d'inhibiteurs et d'activateurs du canal. Leur affinité est de l'ordre du nanomolaire. Elle augmente pour des potentiels membranaires plus dépolarisés indiquant que les canaux

inactivés par le voltage contiennent des sites de liaison à haute affinité pour les DHP (Sanguinetti & Kass, 1984). En raison de sa grande affinité pour les DHP, le canal calcique est également appelé récepteur aux DHP. Les PAA et BTZ sont des antagonistes calciques (Mc Donald et al., 1994) agissant du côté intracellulaire pour les PAA alors que les BTZ agissent sur le canal à partir du côté extracellulaire.

La régulation du canal se fait également par des bloqueurs inorganiques. Ils sont constitués d'ions qui entrent en compétition avec le calcium (La^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} et Mg^{2+}) (Hille, 1992). Le calcium lui-même à des concentrations inférieures à 1 μM peut agir comme bloqueur. Il se fixera sur un ou plusieurs sites intrapores et empêchera le passage des autres ions trop faiblement concentrés pour le déplacer (Hess & Tsien, 1984 ; Tsien et al., 1987).

D- Régulation du canal calcique de type L par les hormones

1-Modulation par une phosphorylation AMPc-dépendante

L'inotropisme cardiaque positif observé suite à des stimulations adrénérgiques et sérotoninergiques est principalement due à une augmentation de l'influx de calcium via les canaux calciques de type L. L'amplitude du courant calcique cardiaque est augmentée grâce à la phosphorylation du canal par la PKA. Un site majeur de phosphorylation est situé au niveau de la sous-unité α_{1C} sur le résidu sérine 1928 (Ser 1928) à l'extrémité C-terminale (De Jongh et al., 1996). Deux autres sites sont situés au niveau de la sous-unité β_2 régulatrice (Puri et al., 1997). Ces phosphorylations augmentent la probabilité d'ouverture du canal (Hille, 1992 ; Mc Donald et al., 1994 ; Herzig & Neumann, 2000). Cependant, le mécanisme précis impliqué dans ces changements n'est pas complètement compris.

Différents protocoles expérimentaux ont été utilisés afin de comprendre les mécanismes de régulation du canal calcique. Ces études consistent soit à activer directement les protéines G_s et l'AC (Hartzell & Fischmeister, 1987), soit inhiber spécifiquement les PDE et les phosphatases (Mc Donald et al., 1994) ou à introduire de l'AMPc dans la cellule (Fischmeister & Hartzell, 1986). Tous ces essais provoquent une activation du canal.

2-Modulation par une phosphorylation PKC-dépendante

Suite à la stimulation d'un RCPG couplé à une protéine G_q , la PKC est activée et entraîne une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux Ca^{2+} de type L cardiaques, neuronaux et du muscle lisse. L'intensité du courant $I_{\text{Ca}^{2+}, L}$ est alors amplifiée. La PKC est activée par le calcium extrudé du RS après une stimulation par l' IP_3 . Elle migre

ensuite vers la membrane plasmique et s'ancre au niveau du DAG produit après le clivage du PIP2 en IP₃.

L'activation du canal par la PKC est généralement biphasique constituée par une augmentation de l'activation suivie d'une diminution tardive de celle-ci. Son action a lieu au niveau de l'extrémité C-terminale de la sous-unité α_{1C} (Gao et al., 1997 ; Shistik et al., 1998 ; Dai et al., 1999). Cependant, il a été récemment montré que le canal calcique cardiaque pouvait être inhibé par la PKC (McHugh et al., 2000) après fixation de celle-ci au niveau de l'extrémité N-terminale de la sous-unité α_{1C} .

3-Modulation par le GMPc

Le GMPc est produit par les récepteurs-enzymes à activité guanylate cyclase. Il régule le canal calcique de type L suivant deux voies : (1) une voie directe via la PKG et (2) une voie indirecte par les PDE et l'AMPc puisque le GMPc active certaines PDE et accélère ainsi la dégradation de l'AMPc. La PKG diminue l'intensité du courant calcique en phosphorylant le canal (Mc Donald *et al.*, 1994 ; Sperelakis *et al.*, 1996). Les sites de phosphorylation de la PKG sont les mêmes que ceux pour la PKA. Le résidu sérine 1371 de l'extrémité C-terminale de la sous-unité α_{1C} de lapin constituerait un site plus spécifique de la PKG (Jiang et al., 2000). Le GMPc ne modifie pas le courant calcique basal dans la plupart des espèces (Hartzell & Fischmeister, 1986). Deux exceptions sont à noter, les cellules auriculaires humaines (Rivet-Bastide et al., 1997) et ventriculaires de lapin (Han et al., 1998). Chez certaines espèces la dégradation du GMPc diminue le courant calcique stimulé par la voie AMPc (Hartzell & Fischmeister, 1986 ; Fischmeister & Hartzell, 1987 ; Levi et al., 1989 ; Méry et al., 1991). Cependant, une stimulation de $I_{Ca^{2+},L}$ par le GMPc a également été observée pour des concentrations non saturantes d'isoprotérénol (Ono & Trautwein, 1991). Ces résultats hétérogènes selon l'espèce et la préparation sont expliqués par l'intervention relative des PDE 2 (activée par le GMPc) et 3 (inhibée par le GMPc) et de la voie PKG (Ono & Trautwein, 1991).

V- Les RCPG cardiaques impliqués dans des maladies d'origine auto-immune

L'organisme est en contact permanent avec des agents étrangers (bactéries, virus, parasites, pollen, ...) susceptibles de l'envahir et d'altérer son bon fonctionnement. Ces éléments sont appelés antigènes. Le corps d'un individu combat ces agresseurs grâce à son

système immunitaire. Chaque personne possède son propre système immunitaire, qui s'enrichit au fur et à mesure des rencontres avec de nouveaux antigènes.

La surface de toutes nos cellules est parsemée d'une immense variété de molécules protéiques, les protéines du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Quand notre système immunitaire est bien « programmé », ces auto-antigènes ou marqueurs du *soi* ne sont pas étrangers ou antigéniques pour notre organisme. Toutefois, ils le sont fortement pour l'organisme d'une autre personne. Chaque molécule du CMH possède un sillon profond qui présente habituellement un peptide. Dans les cellules saines, tous les peptides sont issus de la dégradation protéinique cellulaire qui se produit lors du recyclage normal des protéines. Dans les cellules infectées, les protéines du CMH se lient aussi avec des fragments antigènes étrangers. Cette liaison joue un rôle crucial dans la mobilisation du système immunitaire.

Le corps réagit à l'aide de deux systèmes de défense intrinsèques qui fonctionnent à la fois individuellement et de façon coopérative :

- *Le système de défense non spécifique (héréditaire ou inné)*. Il est toujours prêt et réagit rapidement pour protéger l'organisme contre toute substance étrangère. Deux barrières sont érigées : la première est assurée par une peau et des muqueuses saines. La deuxième est liée à la mobilisation de signaux chimiques, de cellules immunitaires (phagocytes) lorsque les défenses externes ont été enfreintes. Cette barrière est développée afin d'empêcher les envahisseurs de se répandre dans tout l'organisme.

- *Le système de défense spécifique (acquise)*. Il est communément appelé système immunitaire. Cette protection est activée lorsque les premiers moyens de défense n'ont pas été suffisants et ont laissé entrer des particules étrangères dans l'organisme. Ce système attaque des substances étrangères spécifiques. Nous pouvons alors distinguer deux types d'immunité : 1) l'immunité à médiation humorale. Ce phénomène est assuré par les anticorps élaborés par les lymphocytes (B) et les plasmocytes. Ils circulent dans les liquides de l'organisme (le sang et la lymphe) et se fixent aux agents étrangers afin de favoriser leur destruction ; 2) l'immunité à médiation cellulaire. Elle est assurée par les lymphocytes T (T_H , lymphocytes T « helper » ; les T_c , lymphocytes T cytotoxiques) et les macrophages.

Cinq classes différentes d'anticorps existent et sont identifiées selon leur rôle biologique : les IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Ils ont pour fonction de se lier spécifiquement à un antigène, afin de le détruire.

Les réactions auto-immunes correspondent à un dysfonctionnement du système immunitaire, qui dans ce cas réagit contre son propre organisme. Il ne fait plus la différence entre ses protéines, les protéines du *soi*, et les protéines étrangères, protéines du *non soi*. Il

existe deux types de réactions auto-immune : (1) les auto-réactions dites «physiologiques», présentes chez tous les individus sains ; et (2) les auto-réactions source de pathologies. L'autoréactivité «physiologique» de l'organisme est un phénomène normal qui correspond à la mise en place d'un processus de tolérance vis à vis des constituants du *soi*. Elle est acquise au cours du développement selon des mécanismes différents pour les lignées lymphocytaires T et B. Ce mécanisme n'est pas la source de pathologies. Une défaillance des mécanismes d'induction et de maintien de la tolérance naturelle vis à vis des constituants du *soi* peut favoriser l'émergence d'une maladie auto-immune à caractère pathologique. Toutefois, il semblerait que ce dysfonctionnement du système immunitaire ne soit pas suffisant à lui seul pour déclencher une maladie auto-immune. L'implication d'autres facteurs seraient donc nécessaire, telles que les réactions immunologiques croisées.

L'auto-immunité peut être responsable de nombreuses maladies aussi diverses que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la sclérose en plaques, le diabète juvénile ou diabète insulino-dépendant de type I. Dans les pays industrialisés, les maladies auto-immunes occupent le troisième rang après les maladies cardio-vasculaires et le cancer. Il s'agit le plus fréquemment de maladies à évolution chronique, entrecoupées de poussées aiguës, où la vie du patient est souvent menacée. De nombreux efforts sont actuellement déployés afin d'aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes favorisant le déclenchement des maladies auto-immunes.

Les causes de ces réactivités sont diverses. Celle qui nous intéresse correspond à l'infection d'un individu par un antigène étranger qui possède un épitope proche de celui d'un constituant du *soi*. Les anticorps destinés à combattre cet agent reconnaissent donc également les protéines du patient par une réaction croisée (Alberts et al., 1994). Cette réponse immunitaire a été observée contre certains RCPG cardiaques tels que les récepteurs β -adrénergiques.

A-Pathologies cardiaques décrites dans le contexte d'une maladie auto-immune

1-Maladie de Chagas

La maladie de Chagas est une pathologie endémique provoquée par le parasite *Trypanosoma cruzi*. Ce dernier a été identifié pour la première fois par Carlos Chagas en Amérique Latine (Mijares, 1996a). Cette maladie atteint plus de vingt millions de personnes dans ce pays. Les patients infectés développent quelques années plus tard (10 à 20 ans après) une cardiomyopathie. Elle se caractérise par une insuffisance cardiaque due à une nécrose

myocardique et/ou par des troubles du rythme essentiellement ventriculaire (extrasystoles, tachycardie) et un bloc auriculo-ventriculaire (BAV) parfois mortel (Mijares, 1996a, 1997).

L'hypothèse proposée actuellement est que cette cardiomyopathie observée chez les malades proviendrait d'une réaction auto-immune de l'organisme par mimétisme moléculaire. Certaines protéines parasitaires auraient des épitopes suffisamment proches de certains constituants du *soi* pour engendrer la perte de la tolérance du *soi* et induire une réaction croisée. Des anticorps dirigés contre le parasite pourraient alors reconnaître certains composants du *soi* des patients.

L'analyse immunologique du sérum de patients Chagasiques montrent en effet, que les anticorps produits contre la protéine P0 du parasite reconnaissent également certaines protéines membranaires des patients, tels que les récepteurs cardiaques couplés aux protéines G de type β_1 -, β_2 -adrénergiques (Borda et al., 1984 ; Ferrari et al., 1995 ; Elies et al., 1996) et M2-muscariniques (Goin et al., 1994). Ces auto-anticorps sont dirigés plus spécifiquement contre la seconde boucle extracellulaire de ces récepteurs (Mijares et al., 1996b ; Lebesgue et al., 1998 ; Sterin-Borda et al., 1999). Ils ont une activité de type agoniste. La fraction IgG purifiées des sérums Chagasiques entraîne un effet chronotrope positif sur les cellules cardiaques de rats nouveau-nés en culture. Le phénomène est potentialisé en présence d'atropine et est partiellement inhibé par un bloqueur spécifique des récepteurs β_2 -adrénergiques. Ces résultats suggèrent que ces fractions IgG contiennent donc des auto-anticorps dirigés contre les récepteurs β_2 -adrénergiques. De plus, ils présentent une activité de type agoniste sur ces récepteurs (Elies et al., 1996).

2-La cardiomyopathie dilatée idiopathique

La cardiomyopathie dilatée idiopathique (CMD) est une maladie primitive du myocarde se caractérisant par une dilatation du ventricule gauche ou des deux ventricules, ainsi que par une altération de la fonction contractile du myocarde. Son évolution est défavorable en raison de la survenue inéluctable d'une insuffisance cardiaque et d'un risque de mort subite lié fréquemment à des troubles du rythme ventriculaire (Michikado et al., 2001). Cette pathologie représente la principale cause de transplantation cardiaque et constitue donc un problème majeur de santé publique.

Son origine reste imprécise. Cependant, il semblerait que plusieurs facteurs soient impliqués dans l'apparition de cette pathologie. Dans un premier temps, une composante génétique a été proposée et décrite (Tesson et al., 1999). Actuellement, une réponse auto-immune de l'organisme suite à une myocardite virale primaire est proposée. Des

auto-anticorps dirigés contre les récepteurs cardiaques couplés aux protéines G, β_1 -adrénergiques (Wallukat & Wollenberger, 1987 ; Limas et al., 1989 ; Michikado et al., 2001) et M2-muscariniques (Fu et al., 1993) ont été identifiés dans le sérum de ces patients. Ces immunoglobulines induisent des effets de type agoniste sur ces récepteurs. Comme pour la maladie de Chagas, le sérum de ces patients contient également des auto-anticorps dirigés contre des antigènes intracellulaires telle que la myosine (Caforio et al., 1996). Une lyse des cellules a donc eu lieu au préalable. Le rôle physiopathologique de ces anticorps n'étant pas déterminé, leur présence constitue plutôt un marqueur de la maladie.

Bien que la CMD idiopathique a une origine indéterminée, des analogies avec la maladie de Chagas ont permis de suggérer que des protéines virales, bactériennes ou parasitaires mimant la structure d'une protéine humaine seraient susceptibles d'induire la production d'auto-anticorps dirigés contre les composant du soi par le système immunitaire.

3-Lupus érythémateux disséminé et syndrome lupique néonatal

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune systémique assez commune qui survient surtout chez les jeunes femmes (environ 1 personne sur 1000). La mortalité liée à cette pathologie décroît dans le monde, car le diagnostic et le traitement sont faits plus précocement. Les signes cliniques du LED sont variés, avec des manifestations cutanées et musculo-squelettiques. Les signes pulmonaires, neuropsychiatriques et des blocs auriculo-ventriculaires (BAV) sont moins fréquents, mais potentiellement plus graves. La pathologie comprend une réaction inflammatoire, des anomalies vasculaires et des troubles immunologiques. Parmi ces derniers figurent des anticorps dirigés contre une variété de tissus du patient. Le LED est le plus souvent associé à la présence d'anticorps dirigés contre des protéines nucléaires appartenant au complexe ribonucléoprotéique, et plus particulièrement la protéine SSA/Ro52.

Dans de rares cas, les mères souffrant de LED symptomatiques ou asymptomatiques peuvent donner naissance à un enfant atteint de lupus érythémateux néonatal (LEN). Le syndrome lupique néonatal est caractérisé très souvent chez ces enfants par l'existence d'un BAV. La présence du LEN est généralement associée à l'existence d'anticorps dirigés contre la protéine SSA/Ro52 (Buyon et al., 1989) dans le sérum de la mère. L'hypothèse proposée est que ces anticorps traverseraient la barrière placentaire et induiraient une réaction précoce dans le myocarde du fœtus. Si cette réaction est sévère, la mort fœtale ainsi que l'avortement spontané seront observés. Si elle est régressive, les enfants présenteront une fibrose des voies de conduction myocardique responsable d'un BAV plus ou moins complet.

Pendant très longtemps, la présence des anticorps anti-Ro52 dans le sérum des mères lupiques ont servi uniquement de marqueur du LEN. Actuellement, des liens sont établis entre ces anticorps et la survenue de BAV. Des épitopes communs ont été trouvés entre la protéine SSA/Ro52 et la seconde boucle extracellulaire du récepteur humain cardiaque h5-HT₄ (Eftekhari et al., 2000). De plus, un anticorps dirigé contre un peptide mimant cette seconde boucle (anticorps anti-G21V) bloque l'activité du courant calcique de type L induit par la sérotonine dans des myocytes atriaux humains (Eftekhari et al., 2000 ; Sallé et al., 2001). Il a été également montré que des bloqueurs du canal calcique de type L pouvaient induire des blocs de conduction (Eftekhari et al., 2000). Ces données suggèrent donc que le récepteur h5-HT₄ cardiaque pourrait être la cible des auto-anticorps anti-SSA/Ro52 et participer aux BAV.

B-Production d'anticorps et effets sur les récepteurs cardiaques couplés aux protéines G

Pour reproduire et analyser les effets des auto-anticorps sur l'activité des RCPG cardiaques, des études ont été réalisées à l'aide d'IgG antipeptidiques. Des anticorps poly- et monoclonaux ont donc été produits en immunisant des lapins et des souris avec un peptide mimant la séquence de la seconde boucle extracellulaire de ces récepteurs.

Cette région a été choisie, car elle possède les caractéristiques d'un site immunogénique (Hoebeke, 1995). En effet, une région antigénique doit être : (1) facilement accessible, (2) suffisamment longue pour constituer un épitope de type B, et (3) être hydrophile. Selon l'ensemble de ces critères, la seconde boucle extracellulaire apparaissait être le meilleur candidat. L'existence de ponts disulfures situés, au sommet de la seconde boucle extracellulaire et entre les boucles 1 et 2 rend encore plus favorable la constitution d'un épitope B particulièrement accessible dans cette zone (Hoebeke, 1995). La première et la troisième boucle extracellulaire peuvent également constituer un site antigénique, bien qu'étant relativement courtes. Des IgG anti-première boucle des récepteurs β_1 -adrénergiques (Wallukat et al., 1995), ainsi que des IgG anti-troisième boucle des récepteurs muscariniques M2 (Retondaro, 1999) ont été identifiées respectivement dans le sérum de patients atteints de CMD et de la maladie de Chagas.

Les résultats obtenus à partir de différentes études montrent que les anticorps antipeptidiques produits contre les récepteurs β_1 -adrénergiques et M2 muscariniques miment les effets des auto-anticorps identifiés dans le sérum de patients atteints de CMD (Fu, 1995, Matsui et al., 1997). De plus, les IgG anti-récepteurs β_2 -adrénergiques provoquent une augmentation de l'amplitude des courants calciques $I_{Ca^{2+},L}$ et $I_{Ca^{2+},T}$ (Mijares et al., 1996b ;

Lebesgue et al., 1998 ; Mijares et al., 2000) sur les cellules ventriculaires de cobaye. Ils induisent également un effet inotrope positif sur les cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture (Lebesgue et al., 1998). Par ailleurs, ces anticorps reconnaissent spécifiquement la conformation R* des récepteurs β_2 -adrénergiques (Mijares et al., 1996b). Les anticorps anti-récepteur M2 muscariniques induisent quant à eux un effet chronotrope négatif sur les cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture (Elies et al., 1998). Ces immunoglobulines miment donc les effets des auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints de la maladie de Chagas ou de CMD. Ils constituent alors de bons outils pour étudier les cardiomyopathies ayant une origine auto-immune.

Contrairement aux molécules agonistes des RCPG, les anticorps antipeptidiques dirigés contre ces récepteurs n'induisent pas leur désensibilisation (Magnusson et al., 1994 ; Elies et al., 1998 ; Wallukat et al., 1995). Cette caractéristique pourrait être à l'origine des effets néfastes observés avec ces anticorps dans la maladie de Chagas ou de certaines CMD. Bien que les IgG se fixent sur un site différent de celui du ligand, les voies de transduction du signal sont les mêmes. En effet, les anticorps dirigés contre les récepteurs β -adrénergiques, ainsi que l'isoprotérénol activent la voie AMPc, et conduisent à une augmentation de l'intensité du courant calcique de type L, *via* la PKA.

C-Les fibrillations auriculaires et le récepteur 5-HT₄

La fibrillation auriculaire est de loin le trouble du rythme cardiaque le plus fréquent. Elle correspond à des contractions rapides et irrégulières de plusieurs régions du myocarde. La fibrillation auriculaire est due à la désynchronisation des cellules atriales probablement liée à une surcharge calcique (Allessie et al., 2002). Lors de ce trouble, de multiples foyers de dépolarisation s'activent à tout instant et induisent une activité atriale anarchique, irrégulière et extrêmement rapide (figure 32). Ces foyers désynchronisés induisent le processus de réentrée (figure 32, A). Elle serait due au ralentissement de la conduction et parallèlement à un raccourcissement et une inhomogénéité des périodes réfractaires atriales. La transmission de l'activité électrique des oreillettes aux ventricules est plus ou moins filtrée au travers du noeud auriculo-ventriculaire (figure 32, AV). Cependant, lors de fibrillation auriculaire, cette activité reste anarchique, aléatoire, et entraîne de ce fait l'apparition d'arythmie ventriculaire (figure 32,V).

La désynchronisation des cellules atriales entraîne une absence de contraction des oreillettes et donc la perte de la systole atriale. Deux conséquences essentielles sont alors observées:

- Une stagnation de la masse sanguine dans les oreillettes, source de thrombi, et éventuellement d'embolies systémiques.

- Un risque d'insuffisance cardiaque lié au mauvais remplissage des ventricules, et des effets délétères provenant du rythme ventriculaire rapide (Bounhoure, 2000).

Deux formes de fibrillations auriculaires existent : les fibrillations *permanentes* et *paroxystiques*. Elles se distinguent par leur durée pendant la crise arythmique. Les fibrillations *permanentes* sont présentes depuis plus de 24 heures et ne se réduisent pas spontanément. Elles représentent en général, une étape évolutive importante dans le déroulement d'une cardiopathie hypertensive, valvulaire ou ischémique. Elles représentent un facteur important de risque d'embolie et d'insuffisance cardiaque gauche. Les fibrillations *paroxystiques* sont brèves, de quelques minutes à quelques heures. Elles surviennent dans 30 % des cas sur un cœur sain et sont dangereuses par leur risque embolique (Bounhoure, 2000).

Une fibrillation sur trois, *permanente* ou *paroxystique*, n'a pas d'origine déterminée (Zipes, 1997). Elles sont appelées des fibrillations auriculaires isolées idiopathiques. Cependant, cette situation est plus fréquemment rencontrée lors de fibrillations paroxystiques (Bounhoure, 2000).

Les fibrillations auriculaires sont également associées à des altérations des propriétés électrophysiologiques du myocarde (Olsson et al., 1971 ; Cotoi et al., 1972 ; Attuel et al., 1982 ; Wijffels et al., 1995 ; Franz et al., 1997 ; Allessie, 1998). Ces modifications correspondent à un remodelage des protéines membranaires afin de contre-balancer le dysfonctionnement cellulaire responsable des troubles du rythme auriculaire. Chez des patients atteints de fibrillations auriculaires *permanentes*, un raccourcissement de la durée du PA et des périodes réfractaires a été observé. Cette modification est due à une diminution de l'amplitude du courant calcique de type L (Bosch et al., 1999 ; Van Wagoner et al., 1999 ; Skasa et al., 2001) provoquée par une réduction du nombre de ces canaux à la surface des cellules (Brundel et al., 1999 ; Gaspo et al., 1999 ; Lai et al., 1999 ; Grammer et al., 2001). La sous-expression membranaire de ces canaux serait cohérente avec la proposition d'une surcharge calcique à l'origine du déclenchement des fibrillations auriculaires (Allessie et al., 2002). Peu d'études électrophysiologiques ont été réalisées sur des patients atteints de fibrillation auriculaire paroxystique. Cependant, il semblerait que cette pathologie ne soit pas due à une réduction du nombre des canaux calciques (Grammer et al., 2001).

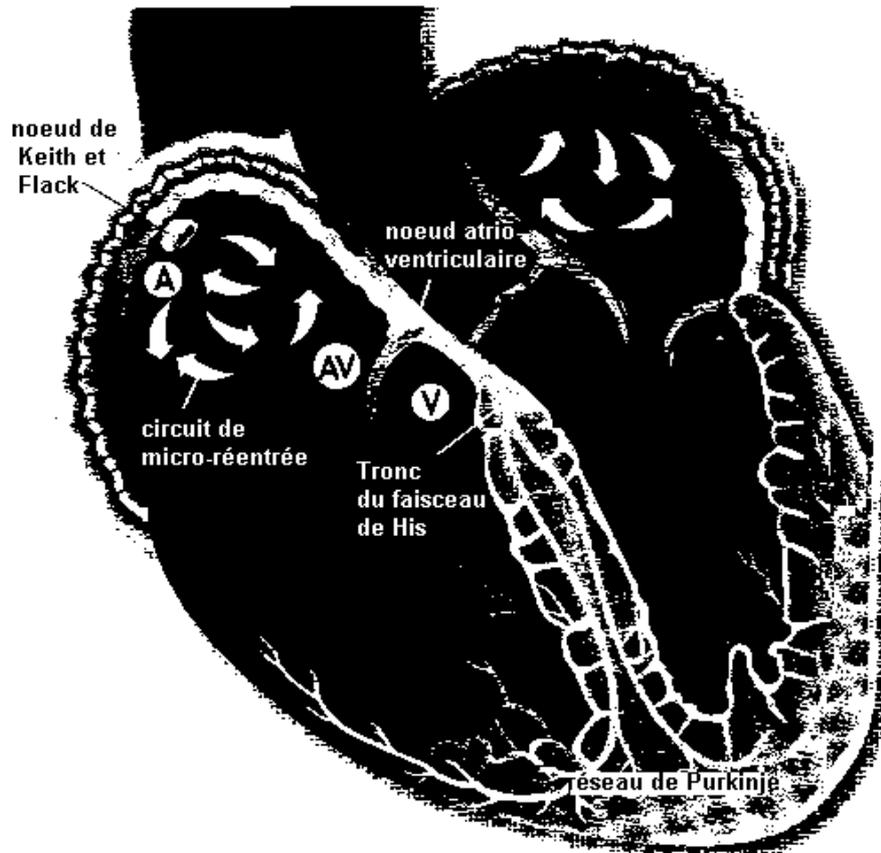


Figure 32 : Physiopathologie de la fibrillation auriculaire : une anarchie dans l'oreillette cardiaque humaine.

A : désynchronisation des myocytes atriaux et circuit de micro-réentrée ; AV : trouble conducteur intra-auriculaire au niveau du nœud atrio-ventriculaire ; V : irrégularité des influx électriques menant à une arythmie ventriculaire ; nœud de Keith et Flack : nœud sinusal.

Reproduit et modifié, d'après Bounhoure, 2000.

Récemment, il a été montré chez des patients atteints de fibrillations auriculaires chroniques, que les ARNm codant pour le récepteur 5-HT₄ et le canal calcique de type L étaient faiblement exprimés (Grammer et al., 2001). Or, l'application de sérotonine sur des lambeaux d'oreillette humaine induit des arythmies auriculaires. Ces effets sont abolis en présence d'antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT₄ (Kaumann & Sanders, 1994). Dans des conditions physiopathologiques, une stimulation intense des récepteurs 5-HT₄ pourrait en effet être associée à l'observation de fibrillations auriculaires. Ce serait le cas lors d'une circulation sanguine stagnante, de lésions auriculaires liées au vieillissement cellulaire et de l'altération de facteurs hémodynamiques. Ces phénomènes provoquent une agrégation plaquettaire qui induirait une libération excessive de 5-HT contenue dans les plaquettes et donc une activation importante des récepteurs sérotoninergiques (Kaumann, 1994). De plus, le récepteur est fonctionnel uniquement au niveau de l'oreillette. Il est également impliqué

dans la régulation du rythme cardiaque (Ouadid et al., 1991 ; Sanders & Kaumann, 1992) et module l'activité du courant $I_{Ca2+,L}$ (Ouadid et al., 1991 ; Blondel et al., 1997) et du courant pacemaker I_f (Pino et al., 1998 ; Workman et al., 1998). Ces données confortent l'idée d'une implication du récepteur 5-HT₄ dans les fibrillations auriculaires (Workman et al., 1998 ; Kaumann, 1994).

Chez des patients présentant des fibrillations auriculaires traités avec des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques (beta-bloqueurs), l'effet inotrope positif de la 5-HT est amplifié (Kaumann, 1991 ; Kaumann & Sanders, 1994 ; Sanders et al., 1995 ; Pau et al., 2003) et les arythmies auriculaires sont plus sévères.

Ces différentes observations suggèrent donc que le récepteur 5-HT₄ serait impliqué dans l'apparition et le développement de fibrillation auriculaire.

Des progrès ont été réalisés dans la prévention et le traitement des arythmies auriculaires. Cependant, certaines médications, telles que les traitements anti-arythmiques bloqueurs des canaux sodiques et potassiques, provoquent une augmentation de la mortalité des patients sujets à des fibrillations auriculaires (Flaker et al., 1992). Par conséquent de nouvelles approches thérapeutiques doivent être développées (Rosen, 1999). Le récepteur 5-HT₄ semble donc être une cible potentielle pour l'élaboration de nouvelles molécules pharmacologiques et thérapeutiques qui n'induirait pas d'effet pro-arythmique au niveau ventriculaire. Récemment, la société GlaxoSmithKline a développé et mis sur le marché un antagoniste spécifique du récepteur 5-HT₄, le piboserod (SB 204070) (Roden, 2003), dans le but de traiter les fibrillations auriculaires. Cet intérêt montre l'importance des recherches sur l'implication du récepteur 5-HT₄ cardiaque dans les fibrillations auriculaires.

De nombreux travaux sont en faveur d'une origine auto-immune pour certaines pathologies cardiaques de type arythmies. Une étude a été réalisée sur des biopsies atriales de patients atteints de fibrillations auriculaires paroxystiques. 30 % des cas ont une origine indéterminée (Frustaci et al., 1997). Cette analyse montre que de plus 66 % de ces patients présentent des cellules atriales nécrosées et une infiltration lymphocytaire (Frustaci et al., 1997). Par analogie avec les CMD, ces données sont corrélées à l'existence d'une myocardite virale primaire.

Sachant que le récepteur 5-HT₄ appartient à la superfamille des RCPG tels que les récepteurs β -adrénergiques et M2 muscariniques, il pourrait être la cible d'auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints de fibrillations auriculaires paroxystiques idiopathiques.

MATERIELS ET METHODES

A-Cultures cellulaires

La lignée de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) exprimant le récepteur h5-HT_{4(e)} de façon stable (Mialet et al., 2000b), a été fournie par l'équipe du Dr. R. Fischmeister (Châtenay-Malabry, France). Les cellules ont été cultivées à 37°C et 5% CO₂ dans du milieu Ham F12 (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 10 mM d'HEPES, 1mg/ml de néomycine, 2 mM de L-glutamine, 100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Afin de réaliser les différents tests de transduction, les cellules CHO ont été réparties dans des boîtes de culture de 24 puits, à raison de 1 x 10⁵ cellules par puits. Elles ont ensuite été cultivées pendant 24 heures en présence de 5% de SVF dialysé. Pour certaines expériences réalisées sur les cellules CHO clone 2, 2 µg/ml de PTX ont été ajoutés à la solution de culture.

La lignée de cellules COS-7 a été fournie par l'INRA de Nouzilly (Tours, France). Les cellules ont été cultivées à 37°C et 5% CO₂ dans du milieu DMEM (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine, 100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Afin d'être transfectées, les cellules ont été déposées dans des plaques de culture 6 puits, à raison de 4 x 10⁵ cellules par puits.

B-Transfection des cellules COS-7

Après 24 heures de culture, les cellules COS-7 ont été transfectées avec 2 µg de plasmides purifiés pCR/CMV contenant l'ADNc codant pour le récepteur h5-HT_{4(e)} humain cardiaque (Blondel et al. 1998b). Cette transfection a été réalisée par la méthode du DEAE-dextran en présence de 0,1 mM de phosphate de chloroquine et 10 % de Nu-sérum inactivé (Coger, France). Après 40 à 48 heures, les tests de stimulation et de liaison ont été réalisés.

C-Isolement de myocytes atriaux humains

En accord avec le comité d'éthique, les myocytes atriaux humains ont été isolés par des digestions enzymatiques à partir de biopsies d'auricule droit provenant de patients âgés de 28 à 85 ans. Ces personnes ont été opérées pour une insuffisance coronarienne ou un dysfonctionnement de la valve aortique. Nous avons exclu volontairement de notre étude les patients présentant des dysfonctionnements des valves mitrales, car dans cette pathologie, les myocytes atriaux sont directement altérés. La plupart des patients possèdent des traitements pharmacologiques comportant des bloqueurs des canaux calciques, des antagonistes des récepteurs β-adrénergiques, des diurétiques, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion, ou de

l'angiotensine. La procédure d'isolement cellulaire utilisée provient de Rücker-Martin et al., 1993. Les biopsies d'auricule sont coupées en fragments et déposées dans une solution de Krebs-Ringer composée de 135 mM NaCl, 4,75 mM KCl, 16 mM Na₂HPO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 134 mM Glucose, 10 mM Saccharose et 30 mM 2,3-butane-dione oxime, pH = 7,4. Les morceaux de tissus sont ensuite incubés pendant 30 min dans une solution de pré-digestion enzymatique composée de 10 ml de Krebs-Ringer sans 2,3-butane-dioneoxime, 5 mg/ml de sérum albumine bovine (BSA), 200 UI/ml de collagénase (type V ; Sigma) et 6 UI/ml de protéase (type XXIV ; Sigma). Puis, trois étapes successives de digestion enzymatique sont réalisées pendant 15 à 20 min chacune selon l'aspect de la dissociation cellulaire. Les cellules sont alors incubées en présence de 10 ml de solution Krebs-Ringer sans 2,3-butane-dione oxime supplémenté avec 5 mg/ml de BSA, 400 UI/ml de collagénase (type V ; Sigma) et 0,1 mg/ml d'inhibiteur de trypsine (type I-S, Sigma). Les cellules obtenues à partir de ces trois digestions sont filtrées (250 µm, Polylabo, France) et diluées dans une solution HEPES-BSA (130 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 5 mM Saccharose et 20 mg/ml BSA, pH = 7,4). Elles sont ensuite centrifugées à 1500 tours/min durant 1 min sans frein et le culot est repris dans une solution HEPES. Pour toutes les étapes de dissociation cellulaire, les solutions sont oxygénées avec 95% O₂ et 5% CO₂ sous agitation à 140 tours/min à 37°C.

D-Production et purification de l'anticorps anti-G21V

L'anticorps anti-G21V est un anticorps polyclonal antipeptidique de lapin dirigé contre la seconde boucle extracellulaire du récepteur 5-HT₄ humain. Le peptide reconnu est composé de 21 acides aminés dont la séquence est (**G-I-I-D-L-I-E-K-R-K-F-N-Q-N-S-N-S-T-Y-C-V**). Cet anticorps a été produit et purifié par le groupe du Dr. J. Hoebeke (Sallé et al., 2001 ; Bozon et al., 2002).

E-Activité de l'adénylate cyclase

Toutes les expériences réalisées sur les cellules COS-7, CHO et les myocytes atriaux humains ont été effectuées à 37°C en présence de 5% de CO₂.

1- Stimulation des cellules COS-7

Pour l'ensemble des expériences, les cellules COS-7 exprimant transitoirement le récepteur h5-HT_{4(e)} ont été préincubées pendant 15 min dans une solution A contenant du milieu DMEM, 5 mM de théophylline et 10 µM de pargyline. Puis, suivant les protocoles expérimentaux réalisés, diverses substances ont été ajoutées pendant 15 min supplémentaires.

Les essais ont donc été effectués avec soit des concentrations croissantes de 5-HT (10^{-10} à 10^{-5} M), soit 10 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps anti-G21V avec ou sans 5-HT (1 μM) ou 10 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps anti-G21V co-incubé avec le peptide G21V (67 nM) avec ou sans la 5-HT. Dans d'autres expériences, les cellules prétraitées ont été incubées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps anti-G21V pendant 15 min, puis stimulées avec 1 μM de 5-HT pendant 15 min supplémentaires. Les mêmes expériences ont été réalisées avec les cellules COS-7 transfectées avec le plasmide pCR/CMV dépourvu d'insert. Ces cellules n'expriment pas le récepteur 5-HT₄ et constituent les cellules « contrôles ».

2- Stimulation des cellules CHO clone 1 et 2

Pour l'ensemble des expériences, les cellules CHO exprimant le récepteur h5-HT_{4(c)} ont été préincubées pendant 15 min (Mialet et al., 2003) dans une solution B contenant du milieu Ham F12 et 1 μM d'antagoniste des récepteurs 5-HT_{1(b)}} endogènes, le GR127935. Pour certaines expériences avec le clone 2, 5 mM de théophylline et 10 μM de pargyline ont été ajoutées à cette solution. Après le prétraitement, les cellules ont été incubées avec différentes substances pour une durée supplémentaire de 15 min. Les stimulations ont été effectuées avec des concentrations croissantes de 5-HT (1×10^{-12} à $2,5 \times 10^{-3}$ M), 1 μM de ML10375 (agoniste inverse des récepteurs h5-HT_{4(c),(e)}}) en présence ou en absence de 5-HT (1 μM), 10 μM de forskoline, 10 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps anti-G21V ou 30 $\mu\text{g/ml}$ des fragments Fab de l'anticorps anti-G21V (Sallé et al., 2001). Les expériences contrôles ont été réalisées avec les cellules CHO exprimant le récepteur h5-HT_{4(e)}} préincubées et incubées avec la solution B pour une durée correspondant aux différentes expériences.

Dans d'autres tests, les cellules prétraitées ont été incubées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps anti-G21V pendant 20 min, puis stimulées avec 1 μM de 5-HT pendant 20 min supplémentaires, et *vice versa*. Les conditions « contrôles » correspondent aux cellules incubées avec soit du milieu de culture, soit 1 μM de 5-HT ou 10 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps anti-G21V pour une durée de 20 ou 40 min. Des contrôles supplémentaires ont été réalisés en répliquant ces expériences sur les cellules CHO non transfectées.

3- Stimulation des myocytes atriaux humains

Les expériences ont été réalisées avec 50 patients et 249 valeurs expérimentales ont été récoltées. 3×10^4 myocytes isolés ont été distribués dans des tubes à essai et préincubés pendant 15 min avec une solution C constituée d'une solution d'HEPES (130 mM NaCl,

4,8 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 5 mM Saccharose pH = 7,4) contenant 5 mM de théophylline et 10 µM de pargyline. Différentes substances ont été ensuite ajoutées pour 15 min supplémentaires : de la forskoline (10 µM); de l'isoprotérénol (20 nM, 100 nM et 1 µM), de la 5-HT (20 nM, 100 nM et 1 µM); du GR113808 (1 µM); du ML10375 (1 µM); de l'anticorps anti-G21V (10 µg/ml), des IgG purifiées contrôle de lapin (10 µg/ml), des fractions d'IgG des patients P6 et P8 et du mélange des témoins (dilution : 25).

Dans d'autres expériences, les cellules prétraitées ont été incubées pendant 15 min avec 1 µM de ML10375 plus 1 µM de 5-HT ; 1 µM de GR113808 plus 1 µM de 5-HT ; 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V plus 1 µM de 5-HT ; 10 µg/ml d'IgG purifiées contrôle de lapin plus 1 µM de 5-HT ; les IgG précipitées des témoins et des patients P6 et P8 (dilution : 25) plus 1 µM de 5-HT. Les expériences contrôle ont été réalisées en préincubant les cellules dans la solution C pendant 15 min suivie d'une incubation avec la solution d'HEPES pour des temps de 15 ou 30 min.

4 - Dosage de second messenger : l'AMPC

Lors des expériences réalisées sur les cellules COS-7 et CHO, les surnageants de culture contenant l'AMPC extracellulaire ont été conservés.

Pour les essais réalisés sur les myocytes atriaux humains, l'AMPC intracellulaire sera mesuré. Les cellules stimulées ont donc été centrifugées à 1500 tours/min pendant 1 min. Les culots ont été resuspendus et incubés pendant 30 min avec 100 µl d'acide perchlorique 1 N. Le pH a ensuite été neutralisé avec 100 µl de KOH 1 N. Après centrifugation, les surnageants contenant l'AMPC intracellulaire ont été conservés.

L'AMPC a été quantifié à l'aide d'un kit radioimmunologique (Beckmann Coulter, Marseille, France).

F-Liaison de radioligands et détermination de la constante de dissociation, K_d

La liaison spécifique des traceurs [³H]5-HT et [³H]GR113808 a été déterminée sur les cellules CHO et/ou les cellules COS-7 exprimant le récepteur h5-HT_{4(e)}. 1 x 10⁵ cellules CHO et 4 x 10⁵ cellules COS-7 ont été incubées pendant 90 min à 25°C avec 4 nM de [³H]5-HT (activité spécifique : 23.7 Ci/mmol) en présence ou en absence d'un excès de 30 µM de GR113808. De plus, 4 x 10⁵ cellules COS-7 ont été également incubées 30 min à 37°C avec 0,1 nM de [³H]GR113808 (activité spécifique : 83 Ci/mmol) en présence ou en absence d'un excès de 10 µM de ML10375. Les volumes réactionnels ont été de 0,1 ml pour les cellules CHO et 0,5 ml pour les cellules COS-7. La solution d'incubation était composée de tampon

phosphate salin PBS (8,1 mM Na₂ HPO₄, 1,9 mM NaH₂PO₄, 3,8 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂) supplémenté avec 0,05 % de BSA. Après incubation, les cellules ont été décollées des puits avec 1 N de NaOH et ont été placées 20 min dans 4 ml de scintillant Optiphase Hifase 2 (EG&G Wallac, France). La radioactivité a été mesurée grâce à un compteur bêta (LKB Wallac, Rack beta). Les cellules CHO et COS-7 non transfectées ont été utilisées comme cellules « contrôle ». Pour réaliser le test de Scatchard, les conditions d'incubation ont été identiques à celles réalisées pour l'étude de la liaison spécifique des traceurs. Toutefois, dix concentrations différentes de 0,1 à 6 nM de [³H]5-HT et huit concentrations de 0,01 à 2 nM de [³H]HGR113808 ont été utilisées.

G-Analyse de cytométrie en flux

Les cellules CHO ainsi que les cellules COS-7 transfectées ou non ont été décollées par grattage et concentrées par centrifugation à 1000 tours/min pendant 10 min à température ambiante. Les culots ont été resuspendus dans du tampon PBS. Les cellules ont ensuite été distribuées à une densité de 4 x 10⁵ cellules par tube.

Les cellules COS-7 ont été incubées pendant 30 min à 4°C avec 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V ou 10 µg/ml d'IgG purifiées de lapin.

Les cellules CHO ont été incubées pendant 60 min à 4 °C avec 100 µg/ml d'anticorps anti-G21V, 100 µg /ml d'IgG purifiées de lapin ou 1 µM de 5-HT. Dans d'autres expériences, les cellules ont été prétraitées pendant 30 min à 4°C avec 100 µg/ml d'anticorps anti-G21V et ont été incubées pendant 30 min supplémentaires avec 1 µM de 5-HT, et *vice versa*. Pour analyser les sérums de patients, les essais ont été réalisés sur les cellules CHO clone 1. Elles ont été incubées pendant 30 min à 4°C avec le mélange des 8 solutions d'IgG témoins (dilution : 5) ou avec chaque fraction d'IgG des patients (dilution : 5).

Après incubation, les cellules CHO et COS-7 ont été lavées deux fois avec du tampon PBS. 100 µl d'IgG anti-Fc de lapin conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (dilution : 160) ont été ajoutés pendant 30 min à 4°C pour les incubations impliquant l'anticorps anti-G21V. Pour les essais réalisés avec les fractions d'immunoglobulines de patients, 100 µl d'IgG anti-Fc humain conjuguées au FITC (dilution : 1000) ont été déposés. Après lavage, les cellules sont immédiatement analysées à l'aide d'un FACScan[®] utilisant le programme CellQuest (Becton Dickinson, SantaClara CA USA). Les contrôles sont représentés par la fixation des IgG purifiées de lapin pour l'anticorps anti-G21V et par des incubations réalisées en présence de tampon PBS pour les sérums de patients et de témoins.

H-Méthodes expérimentales électrophysiologiques réalisées sur des myocytes atriaux humains

Les expériences sont conduites à température ambiante (23-25°C) en utilisant la technique de Patch Clamp en configuration cellule entière, afin d'enregistrer le courant calcique de type L ($I_{Ca2+,L}$). Les cellules sont déposées dans des boîtes de pétri et perfusées à l'aide de solutions expérimentales diverses, en utilisant des capillaires fins d'un diamètre de 250 μ m placés devant la cellule «clampée». La solution extracellulaire contient 140 mM TEACl (chlorure de tétraéthylammonium), 2 mM $CaCl_2$, 6 mM CsCl, 1 mM $MgCl_2$, 11 mM glucose, 10 mM HEPES et est ajustée à pH 7,3 avec du TEAOH. Les solutions expérimentales perfusées pendant 1 à 2 min sur la cellule, sont composées de cette même solution dans laquelle ont été diluées différentes substances :

- 2 nM, 20 nM, 100 nM et 1 μ M de 5-HT puis 10 μ M de forskoline
- 2 nM, 20 nM, 100 nM et 1 μ M d'isoprotérénol puis 10 μ M de forskoline
- 20 nM de 5-HT plus 20 nM d'isoprotérénol; 100 nM de 5-HT plus 100 nM d'isoprotérénol; 1 μ M de 5-HT plus 1 μ M d'isoprotérénol
- 20 nM d'isoprotérénol plus 100 nM de 5-HT; 100 nM d'isoprotérénol plus 1 μ M de 5-HT
- 100 nM de 5-HT plus 100 nM d'isoprotérénol plus 10 μ M de forskoline; 1 μ M de 5-HT plus 1 μ M d'isoprotérénol plus 10 μ M de forskoline
- Fractions d'IgG précipitées des patients P6, P8 et du pool des témoins (dilution : 25)
- Fractions d'IgG des patients P6, P8 et du pool des témoins (dilution : 25) plus 1 μ M 5-HT
- Fractions d'IgG du patient P8 (dilution : 25) plus 1 μ M d'isoprotérénol ; fractions d'IgG de P8 plus 10 μ M de forskoline

Les électrodes (3-4 $M\Omega$) contiennent une solution interne composée de 100 mM CsCl, 40 mM TEACl, 2 mM ATP- $MgCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0,1 mM GTP, 10^{-6} mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA et est ajustée à pH 7,2 avec du CSOH. Les protocoles de voltage clamp et l'acquisition des données ont été réalisés en utilisant un amplificateur *Axon Instruments* 202 A (Axon Instruments, CA, USA) et le programme d'acquisition Acquis1 (Dipsi Industrie, Chatillon, France). Les données ont été filtrées à 1 ou 2 kHz et ont été enregistrées à 5 ou 10 kHz. Les études ont été réalisées sur n = 100 cellules et 35 patients. La capacitance cellulaire ($C = 102 \pm 6$ pF) ainsi que les résistances séries ($R = 4,6 \pm 0.2$ $M\Omega$) ont été compensées (80 %) avec l'amplificateur *Axon Instruments*. Le protocole de potentiel imposé a été maintenu à trois valeurs successives correspondant à - 80 mV, - 50 mV et 0 mV pendant 300 ms et a été appliqué toutes les 5 s afin d'enregistrer le courant calcique de type L. La valeur de l'amplitude du $I_{Ca2+,L}$ a été estimée comme étant la différence entre la valeur du

courant au pic mesuré pour un potentiel imposé de 0 mV et la valeur du courant mesuré après inactivation du courant correspondant à la fin du potentiel imposé à 0 mV.

I-Précipitation au sulfate d'ammonium des sérums de patients atteints de fibrillations auriculaires idiopathiques

En accord avec le comité d'éthique, nous avons collecté au sein du service de Cardiologie du CHU de Trousseau, des sérums de sujets normaux et de patients présentant des fibrillations auriculaires idiopathiques. Une précipitation des immunoglobulines de type G a été réalisée à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium à 33 %. Cette prépurification a été effectuée sur le mélange de 8 sérums témoins (nommé T), dont l'âge est situé entre 19 et 24 ans, et sur 10 sérums individuels de patients (nommé P1 à P10) présentant des fibrillations auriculaires, dont l'âge est situé entre 50 et 72 ans. L'étape de précipitation a été réalisée deux fois successivement sous agitation à 4 °C. Les tubes ont été centrifugés à 3000 tours/min à chaque étape pendant 20 min à 4°C. Les fractions d'IgG précipitées ont été ensuite dialysées une nuit dans du tampon PBS à 4°C sous agitation.

J-Test ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés contre le peptide G21V mimant la seconde boucle extracellulaire du récepteur 5-HT₄ humain cardiaque. 0,5 µg de peptide par puits dilué dans 0,1 M NaHCO₃ pH = 9,6 a été absorbé au fond d'une plaque 96 puits pendant 1 h à 37°C. Les puits ont été saturés avec une solution de PBS contenant 3% de lait écrémé pendant 2 h à 37°C. Après lavage, les fractions IgG des patients et des témoins ont été incubées pendant 1 h à 37°C (dilution : 5). La présence d'anticorps dirigés contre le peptide a été détectée grâce à l'ajout d'un second anticorps biotinylé dirigé contre les parties Fc des immunoglobulines G humaines (dilution : 1000) et du complexe streptavidine-péroxydase (dilution : 1000) (Sigma, France). Après 1 h d'incubation à 37°C et 3 lavages, 100 µl du substrat TMB (3,3',-5,5' Tétraméthylbenzidine; Pierce Interchim, France) a été additionné. La réaction enzymatique a été arrêtée avec 50 µl d'acide orthophosphorique (1 M). La densité optique (DO) de la réaction a été mesurée à la longueur d'onde 450 nm. Les expériences « contrôle » ont été réalisées en substituant les IgG précipitées par du PBS. Les résultats sont exprimés par le rapport S/N (signal / noise) qui correspond au rapport des DO des IgG précipitées de patients sur la DO moyenne du mélange des 8 solutions d'IgG témoins. La valeur de DO obtenue avec l'anticorps anti-G21V sert de contrôle positif.

K-Dot blot et Western blot

Pour la technique du Dot Blot, les myocytes atriaux humains ont été directement déposés sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C, à raison de 30 µg de protéines totales par puits. Pour la technique du Western blot, au préalable, les myocytes atriaux humains ont été réduits dans du tampon de Laemmli (2 % Sodium Dodécyl Sulfate et 12 % β-mercaptoéthanol) puis bouillis pendant 10 min. La préparation cellulaire a été ensuite déposée sur un gel polyacrylamide SDS-PAGE 10 %, à raison de 30 µg de protéines par puits. Enfin, les protéines séparées sont électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham Pharmacia Biotech Europe, France).

Pour les deux techniques, les membranes ont été saturées avec une solution de polyvinylalcool (5µg/ml) pendant 1 min. Puis, elles ont été incubées avec l'anticorps anti-G21V (10 µg/ml) ou les IgG purifiées contrôle de lapin pendant 1 h à 37°C. Elles ont été ensuite incubées avec des immunoglobulines anti-Fc de lapin conjuguées à la phosphatase alcaline (dilution : 1000) (Sigma, France) pendant 1 h à 37°C. La fixation de l'anticorps est révélée en utilisant le substrat BCIP/NBT (Sigma, France). La réaction enzymatique est arrêtée par immersion des nitrocelluloses dans de l'eau. Entre les deux étapes d'incubation des premier et second anticorps ainsi qu'avant la révélation, les membranes ont été lavées deux fois sous agitation pendant 30 min dans une solution de PBS contenant 8% de lait écrémé et 0,5% de Tween 20.

L-Matériels

Le peptide G21V, les fragments Fab de l'anticorps anti-G21V ont été aimablement donnés par le Dr J. Hoebeke, CNRS UPR 9021, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France. L'anticorps anti-G21V a ensuite été produit par la société Agro-Bio. Les lignées cellulaires CHO exprimant stablement le récepteur h5-HT_{4(e)} ainsi que les ligands GR127935 (N-[4 - methoxy - 3 - (4 - methyl -1-piperazinyl) phenyl]-2'- methyl - 4' - (5 - methyl - 1, 2, 4 - oxadiazol - 3yl)[1, 1 bibhenyl]- 4 - carboxamide) et ML10375 (2 -[*cis* - 3, 5-dimethylpiperidino] ethyl 4 - amino -5 chloro - 2 methoxybenzoate) ont été gracieusement donnés par le Dr R. Fischmeister, INSERM U-446, Laboratoire de Cardiologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France. Le FITC (fluorescein isothiocyanate), la forskoline (7beta-Acetoxy-1alpha,6beta,9alpha-trihydroxy-8,13-epoxy-labd-14-en-11-one) et la 5-HT (5-hydroxytryptamine) proviennent de Sigma, Saint Quentin Fallavier, France. Le GR113808 {[1-2-(methyl-sulfonylamino)ethyl]-4piperidinyl}methyl-1-methyl-1H-indole-3carboxylate} provient de TOCRIS Illkirch, France. Le traceur

[³H]GR113808 provient d'Amersham Pharmacia Biotech Europe, France et le traceur [³H]5-HT (5-hydroxytryptamine creatinine sulfate) provient de Perkin Elmer Life Sciences, Boston USA. Les autres composants ont été obtenus par Life Technologies.

M-Analyse statistique

Les valeurs des données extraites de l'étude sur les cellules CHO et COS-7 ainsi que sur les myocytes atriaux humains sont exprimées en moyenne \pm sem obtenues à partir de n expériences. Ces données ont été analysées grâce à un test de Student (t-test) pour les cellules CHO et un test anova pour l'étude sur les myocytes atriaux humains et les cellules COS-7. La valeur statistique est significative pour une probabilité $p < 0,05$ représentée par : * dans les figures.

Table des Figures et Tableaux - Résultats/Discussion

Figures

Figure 1 : Dose-réponse du récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7.....95

Figure 2 : Analyse par cytométrie de flux de la fixation de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7.....96

Figure 3 : Analyse de Scatchard de [³H]-GR113808 sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimés dans les cellules COS-7.....96

Figure 4 : Pharmacologie du récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7.....97

Figure 5 : Dose-réponse du récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1 et clone 2.....99

Figure 6 : Pharmacologie du récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1 et clone 2.....100

Figure 7 : Effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les clones 1 et 2.....101

Figure 8 : Analyse par cytométrie de flux de la fixation de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules clone 1.....102

Figure 9 : Analyse de Scatchard de [³H]-5-HT sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1 et COS-7104

Figure 10 : Analyse par cytométrie de flux de la fixation de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules clone 2.....107

Figure 11: Effets d'inhibiteurs de phosphodiesterases et de protéines G_i sur l'activité de l'anti- G21V109

Figure 12 : Effet fonctionnel de l'anticorps polyclonal anti-G21V sur la production d'AMPC dans les myocytes atriaux humains145

Figure 13 : Identification du récepteur 5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains réalisée en condition native (bot-Blot).....146

Figure 14 : Etude fonctionnelle des récepteurs 5-HT₄ et β-adrénergiques : mesure du taux d'AMPC.....147

Figure 15 : Etude fonctionnelle des récepteurs 5-HT₄ et β-adrénergiques : mesure du courant calcique.....149

Figure 16: Action fonctionnelle conjointe des récepteurs 5-HT₄ et β-adrénergiques : mesure du courant calcique151

Figure 17 : Caractéristiques pharmacologiques du récepteur h5-HT₄.....153
Figure 18 : Relation entre le traitement des patients avec des beta-bloqueurs et la réponse sérotoninergique des myocytes atriaux humains.....155
Figure 19 : Identification du récepteur 5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains réalisée en condition dénaturante (Western-Blot).....156
Figure 20 : Identification par cytométrie de flux de la fixation d'auto-anticorps sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1.....193
Figure 21 : Activité fonctionnelle des fractions IgG sur la production d'AMPc dans les myocytes atriaux humains.....194
Figure 22 : Effet fonctionnel des fractions d'IgG précipitées sur le courant calcique I_{Ca2+,L} induit par une stimulation sérotoninergique.....196
Figure 23 : Effet fonctionnel des fractions d'IgG précipitées du sérum de patient P8 sur le courant calcique suite à une stimulation β-adrénergique et à l'addition de forskoline.....197

Tableaux

Tableau I : Récapitulatif des productions d'AMPc par rapport au niveau basal en % en fonction de la dose d'anticorps anti-G21V et de 5-HT, d'isoprotérénol (Iso) ou de forskoline (Fk) appliquées sur les myocytes humains.....145
Tableau II : Récapitulatif des effets observés sur la production basale d'AMPc exprimés en % en fonction de la dose de 5-HT, d'isoprotérénol (Iso) ou de forskoline (Fk) appliquée sur les myocytes humains.....148
Tableau III : Récapitulatif des effets observés sur l'activité du courant I_{Ca2+, L} exprimés en % en fonction de la dose de 5-HT, d'isoprotérénol (Iso) ou de forskoline (Fk) appliquée sur les myocytes humains.....148
Tableau IV : Récapitulatif des effets des beta-bloqueurs sur la production d'AMPc et sur l'activité du courant I_{Ca2+, L} exprimés respectivement en % et en pA/pF après stimulation sérotoninergique sur les myocytes humains.....155
Tableau V : Test ELISA : Réactivité de la fraction d'IgG précipitées de patients atteints de fibrillations auriculaires paroxystiques idiopathiques face au peptide G21V mimant la seconde boucle extracellulaire du récepteur h5-HT₄192

OBJECTIFS

Le récepteur h5-HT₄ cardiaque pourrait être une nouvelle cible pour des auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints de fibrillations auriculaires idiopathiques.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier les effets fonctionnels de l'anticorps anti-peptidique anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT₄ recombinant et natif, ainsi que d'identifier la présence d'auto-anticorps dans le sérum de patients atteints de fibrillations auriculaires.

Le récepteur h5-HT_{4(e)} a été produit à l'aide de deux systèmes d'expression, les cellules COS-7 et les cellules CHO. L'anticorps anti-G21V agit comme un agoniste sur le récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7, alors qu'il n'induit soit aucun effet visible, soit des effets de type agoniste inverse sur le récepteur présent dans les cellules CHO. L'activité de l'anti-G21V semble dépendre de l'environnement cellulaire, membranaire et de la densité du récepteur à la surface des cellules. Ces travaux sont présentés dans la partie 1 de ce mémoire.

L'étude de l'activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V a été poursuivie sur les cellules natives, les myocytes atriaux humains. Suivant le paramètre analysé, taux d'AMPc intracellulaire ou amplitude du courant calcique I_{Ca2+,L} (Sallé et al., 2001), l'action de cette immunoglobuline diffère. Les résultats sont présentés dans la partie 2.

Enfin, l'implication potentielle du récepteur h5-HT₄ dans les fibrillations auriculaires nous a incités à identifier la présence d'auto-anticorps dirigés contre ce récepteur dans le sérum de patients présentant des troubles du rythme auriculaire et à d'étudier leur activité fonctionnelle. Ces données sont relatées dans la partie 3.

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 1 : Etude de l'activité fonctionnelle de l'anticorps anti-peptidique anti-G21V sur le récepteur 5-HT_{4(e)} humain cardiaque exprimé dans des systèmes d'expression

A-Présentation

Le récepteur 5-HT₄ est exprimé sous forme active uniquement au niveau de l'oreillette chez l'homme et le porc. Son absence chez les animaux de laboratoire (rat, souris, cobaye...) rend son étude complexe. Les prélèvements d'auricules utilisés proviennent de patients ayant des pathologies cardiaques, ainsi que des traitements. Ces tissus sont peu disponibles, et les cellules obtenues après digestion enzymatique sont fragiles et peu nombreuses. Afin de pallier à ces problèmes, nous avons choisi de produire le récepteur h5-HT₄ et plus particulièrement l'isoforme (e) à l'aide de systèmes cellulaires recombinants. Ces systèmes permettent une surexpression des protéines. Contrairement aux cellules natives, la quantité de protéines produite ne constitue plus un facteur limitant. D'autre part, les protéines recombinantes exprimées sont isolées de l'ensemble des protéines natives, ce qui permet d'analyser leur propre activité.

Nous avons donc choisi d'étudier l'activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans deux types cellulaires, les cellules COS-7 et les cellules CHO. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire par Sallé et al., 2001, ont montré que cet anticorps agissait comme un antagoniste sur le récepteur 5-HT₄ présent à la surface des myocytes atriaux humains. Il inhibait l'action de la sérotonine.

B - Effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7

Au cours de cette étude, nous avons analysé l'activité de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé transitoirement dans les cellules COS-7.

*Ces travaux ont fait l'objet d'une publication soumise et acceptée : Bozon V., Di Scala E., Eftekhari P., Hoebeke J., Lezoualc'h F., Fischmeister R. & Argibay J., "Agonist-like activity of antibodies directed against the second extracellular loop of the human cardiac serotonin 5-HT_{4(e)} receptor in transfected COS-7 cells" (2002), *Receptors and Channels*, 8 : 113-121. (annexe 1)*

1- Caractérisation et identification du récepteur 5-HT_{4(e)}

Les cellules COS-7 exprimant le récepteur h5-HT_{4(e)} présentent un niveau basal d'AMPC équivalent à celui des cellules non transfectées. Ces résultats indiquent que ces récepteurs n'ont pas d'activité constitutive en absence de ligand.

Le récepteur h5-HT_{4(e)} répond à des concentrations croissantes de 5-HT avec une valeur d'EC₅₀ apparente de 181 ± 7 nM et induit une synthèse d'AMPC maximale pour 1 μ M de 5-HT (figure 1).

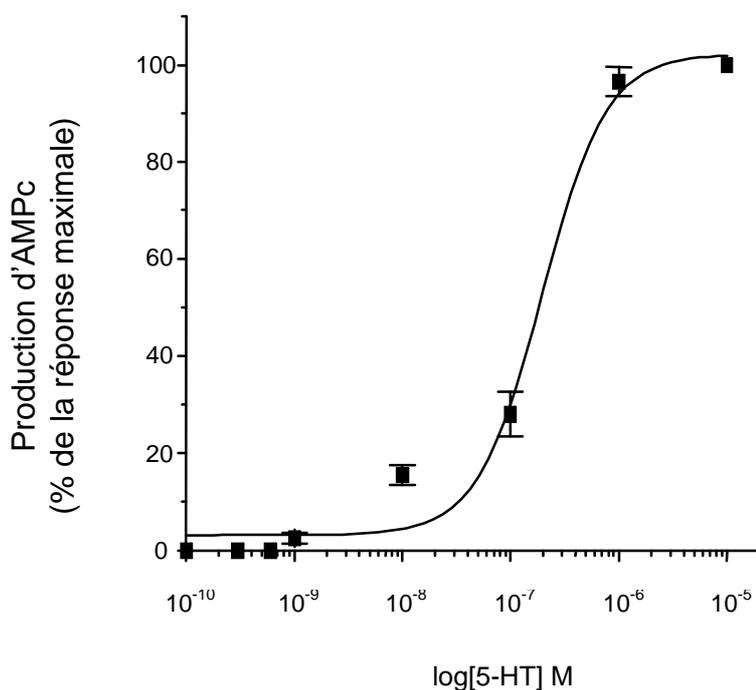


Figure 1 : Dose-réponse du récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7

Les résultats sont normalisés par rapport à la réponse maximale de la 5-HT. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm s.e.m. de 3 expériences indépendantes réalisées en double. La valeur de l'EC₅₀ est de : 181 ± 7 nM.

La figure 2 montre les résultats de cytométrie de flux avec l'anticorps anti-G21V sur les cellules exprimant le récepteur. L'intensité de fluorescence en présence de 10 μ g/ml d'anti-G21V (courbe vide) est supérieure à celle réalisée avec les IgG contrôles purifiées de lapin (courbe pleine). L'anticorps anti-G21V reconnaît donc spécifiquement le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé à la surface des cellules COS-7. Ces observations indiquent également que le récepteur recombinant a conservé ses propriétés antigéniques.

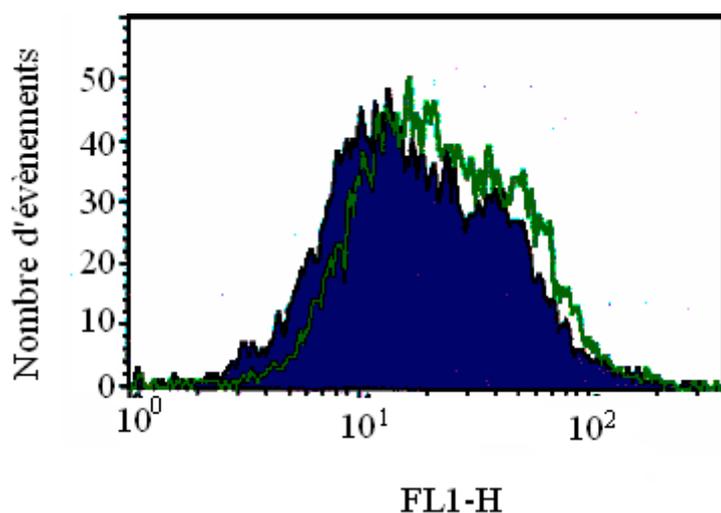


Figure 2 : Analyse par cytométrie de flux de la fixation de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimés dans les cellules COS-7

Le protocole expérimental suivi est : 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V (courbe vide) appliqué pendant 30 min comparé au contrôle (courbe pleine)

La quantité de récepteurs 5-HT_{4(e)} exprimés dans la membrane plasmique a été déterminée grâce à une analyse de Scatchard (figure 3). Il semble être présent à un taux élevé, Bmax = 375 ± 25 fmol de récepteurs par mg de protéines. De plus, ces récepteurs fixent la 5-HT avec une haute affinité, Kd = 0,28 ± 0,05 nM.

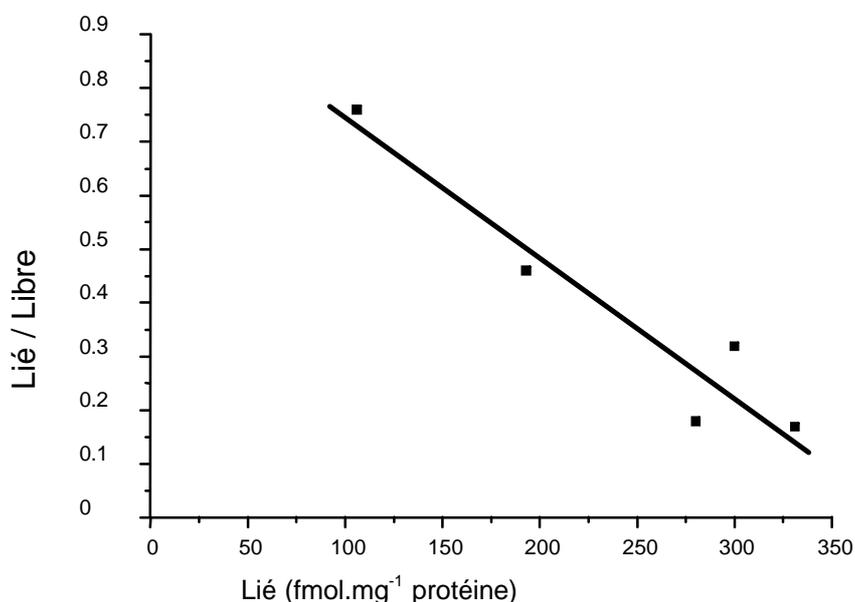


Figure 3 : Analyse de Scatchard de [³H] GR113808 sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7

Courbe représentative de la liaison de [³H]GR113808 à la surface des cellules COS-7.

Valeurs correspondant à la moyenne ± s.e.m. de mesures effectuées en double. Détermination de la constante de dissociation Kd et du nombre de sites de liaison Bmax.

Ces résultats montrent que le récepteur h5-HT_{4(e)} est exprimé abondamment à la surface des cellules COS-7 sous une forme active. Ce système d'expression constitue donc un bon modèle cellulaire pour étudier les effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)}.

2-Effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)}

La figure 4 montre que 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V induit une augmentation significative du taux d'AMPC produit (197 ± 35 %) par rapport au niveau basal dans les cellules exprimant le récepteur 5-HT_{4(e)}. Cette élévation est similaire à celle mesurée en présence de 1 µM de 5-HT (174 ± 34 %). Ces effets sont abolis par le peptide G21V (67 nM) (102 ± 3 %), ce qui traduit une action spécifique de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)}.

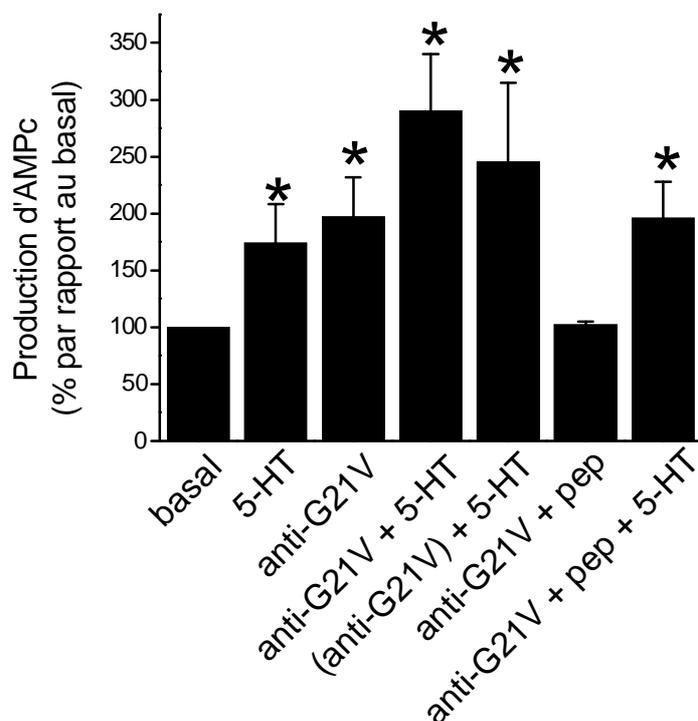


Figure 4 : Pharmacologie du récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7

Stimulation des cellules pendant 15 min, avec 1 µM 5-HT, 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V, 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V plus 67 nM de peptide G21V, 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V plus 1 µM de 5-HT ou 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V plus 67 nM de peptide G21V plus 1 µM 5-HT. Dans d'autres expériences, les cellules sont stimulées pendant 15 min avec 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V suivi d'une incubation supplémentaire de 15 min avec 1 µM 5-HT [(anti-G21V)+5-HT]. Les résultats sont normalisés par rapport au niveau basal (basal). Les valeurs représentent la moyenne ± s.e.m. de 3 expériences indépendantes réalisées en double. * : $p < 0,05$ en comparaison avec le basal.

Deux autres protocoles expérimentaux ont été suivis : soit l'anticorps anti-G21V (10 µg/ml) a été co-incubé avec la 5-HT (1 µM), soit les cellules ont été préincubées avec l'anticorps puis stimulées avec la sérotonine. Les résultats indiquent une augmentation similaire de la production d'AMPc intracellulaire lors de ces deux types de stimulation. Les valeurs mesurées sont respectivement $290 \pm 50 \%$ et $245 \pm 70 \%$. Ces augmentations sont statistiquement équivalentes à celle induite par la 5-HT seule ($174 \pm 34 \%$). En présence du peptide G21V, le taux d'AMPc ($196 \pm 32 \%$) est comparable à celui observé avec la 5-HT.

Ces résultats suggèrent que l'anticorps anti-G21V agit comme un agoniste sur le récepteur h5-HT_{4(e)}. De plus, l'absence d'effets additionnels des taux individuels d'AMPc produit par chaque substance (anticorps et 5-HT) indique que la capacité de couplage du récepteur avec les protéines G_s est déjà maximale avec une seule substance.

C - Effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO

Les études réalisées avec les cellules COS-7 ont permis de valider la faisabilité de notre projet. Les systèmes d'expression se sont avérés être de bons outils pour analyser les effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)}. Afin d'obtenir des résultats moins variables et plus reproductibles, nous avons choisi de poursuivre nos travaux sur une lignée cellulaire CHO exprimant de façon stable le récepteur 5-HT_{4(e)} (Mialet et al., 2000b). Deux clones ont été identifiés et utilisés au cours de cette étude : clones 1 et 2.

1 – Etude sur les cellules CHO clone 1

Cette analyse a été effectuée sur le récepteur h5-HT_{4(e)} produit dans les cellules CHO clone 1. La densité d'expression du récepteur est similaire à celle des cellules COS-7. Toutefois, l'environnement membranaire et cellulaire est différent.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis le 23/02/04 et accepté le 29/04/04 à Receptors and Channels : Di Scala E., Rose S., Hérault O., Argibay J., Cosnay P. & Bozon V., "Polyclonal antibody effects on the human cardiac 5-HT_{4(e)} receptors depend upon the expression system" (annexe 2)

a)-Caractérisation du récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé

Les cellules CHO clone 1 exprimant le récepteur h5-HT_{4(e)} ont un niveau basal d'AMPC 2,9 fois supérieur à celui des cellules CHO non transfectées. Ce résultat indique que le récepteur 5-HT_{4(e)} possède une activité constitutive en absence de ligand (Mialet et al., 2000b).

Le récepteur h5-HT_{4(e)} répond à des concentrations croissantes de 5-HT avec une valeur d'EC₅₀ de 13 ± 7 nM et induit une synthèse d'AMPC maximale pour 1 µM de 5-HT (figure 5). La valeur de l'EC₅₀ est inférieure à celle déterminée dans les cellules COS-7 (Bozon et al., 2002). Cette différence traduit une meilleure efficacité de couplage du récepteur h5-HT_{4(e)} avec les protéines Gs dans les cellules CHO par rapport aux cellules COS-7.

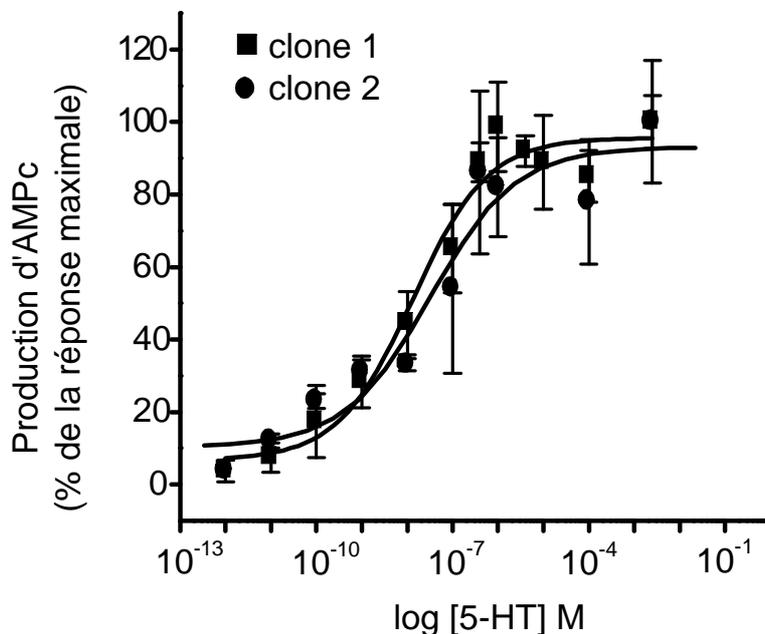


Figure 5 : Dose-réponse du récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1 et 2

Résultats normalisés par rapport à la réponse maximale de la 5-HT. Les valeurs correspondent à la moyenne ± s.e.m. de 5 expériences indépendantes réalisées en double. Les EC₅₀ sont : 13,4 nM (clone 1) et 32,2 nM (clone 2).

La figure 6 montre que le ML10375 (Blondel et al. 1998b) réduit la production basale d'AMPC. De plus, il inhibe l'action de la sérotonine. Cette substance est donc un agoniste inverse de l'isoforme (e) du récepteur 5-HT₄ exprimé dans les cellules CHO, comme précisé par Mialet et al., 2000b. Le niveau maximal d'AMPC produit est déterminé grâce à l'application de 10 µM de forskoline. Il correspond à une production de 1148 ± 290 % du niveau basal d'AMPC (figure 6).

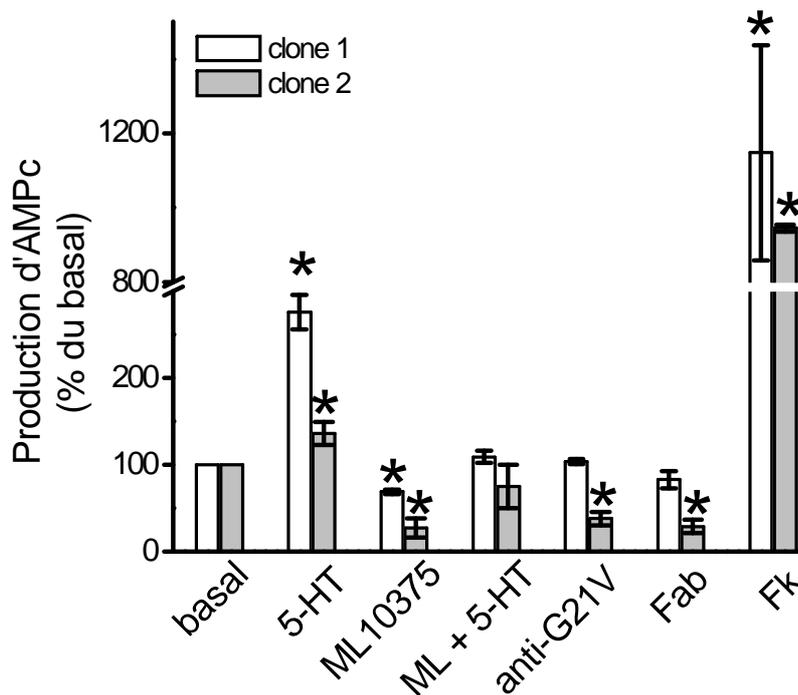


Figure 6 : Pharmacologie du récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clones 1, 2

Stimulation des cellules pendant 15 min avec 1 μ M 5-HT, 1 μ M ML10375, 10 μ M Fk, 1 μ M ML10375 plus 1 μ M 5-HT (ML+5-HT), 10 μ g/ml d'anticorps anti-G21V bivalent ou 30 μ g/ml d'anticorps anti-G21V monovalent (Fab). Les résultats sont normalisés par rapport au niveau basal. Les valeurs représentent la moyenne \pm s.e.m. de 5 expériences indépendantes réalisées en double. * : $p < 0,05$ en comparaison avec le basal.

L'ensemble de ces résultats indiquent que le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1 est correctement couplé à l'adénylate cyclase et a conservé ses caractéristiques pharmacologiques. Cette lignée cellulaire constitue également un bon modèle pour étudier les propriétés fonctionnelles des anticorps anti-récepteur 5-HT₄.

b)-Effets de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)}

Les figures 6 et 7 montrent que l'anticorps anti-G21V appliqué seul (10 μ g/ml) sur les cellules exprimant le récepteur 5HT_{4(e)} ne modifie pas le taux basal d'AMPc. Les valeurs obtenues sont 104 \pm 3 % (figure 6), 115 \pm 12,5% (figure 7Bb) et 116 \pm 3,7% (figure 7Aa) pour des applications respectives d'anticorps pendant 15, 20 et 40 min à la surface des cellules. Les données sont identiques à celles mesurées avec les cellules non transfectées.

La figure 7 montre les résultats obtenus en incubant les cellules pendant 20 min avec l'anticorps anti-G21V (10 μ g/ml), puis en ajoutant la 5-HT (1 μ M) pendant 20 min

supplémentaires (figure 7A). L'expérience inverse a également été effectuée (figure 7B). L'anticorps ne modifie pas la production d'AMPC induite par une stimulation sérotoninergique. De plus, les données sont similaires lorsque l'anti-G21V est appliqué avant (figure 7Ac, $440 \pm 41\%$ versus $428 \pm 67\%$ pour la 5-HT seule figure 7Ab) ou après la 5-HT (figure 7Bc, $544 \pm 43\%$ versus $548 \pm 96\%$ pour la 5-HT seule figure 7Ba).

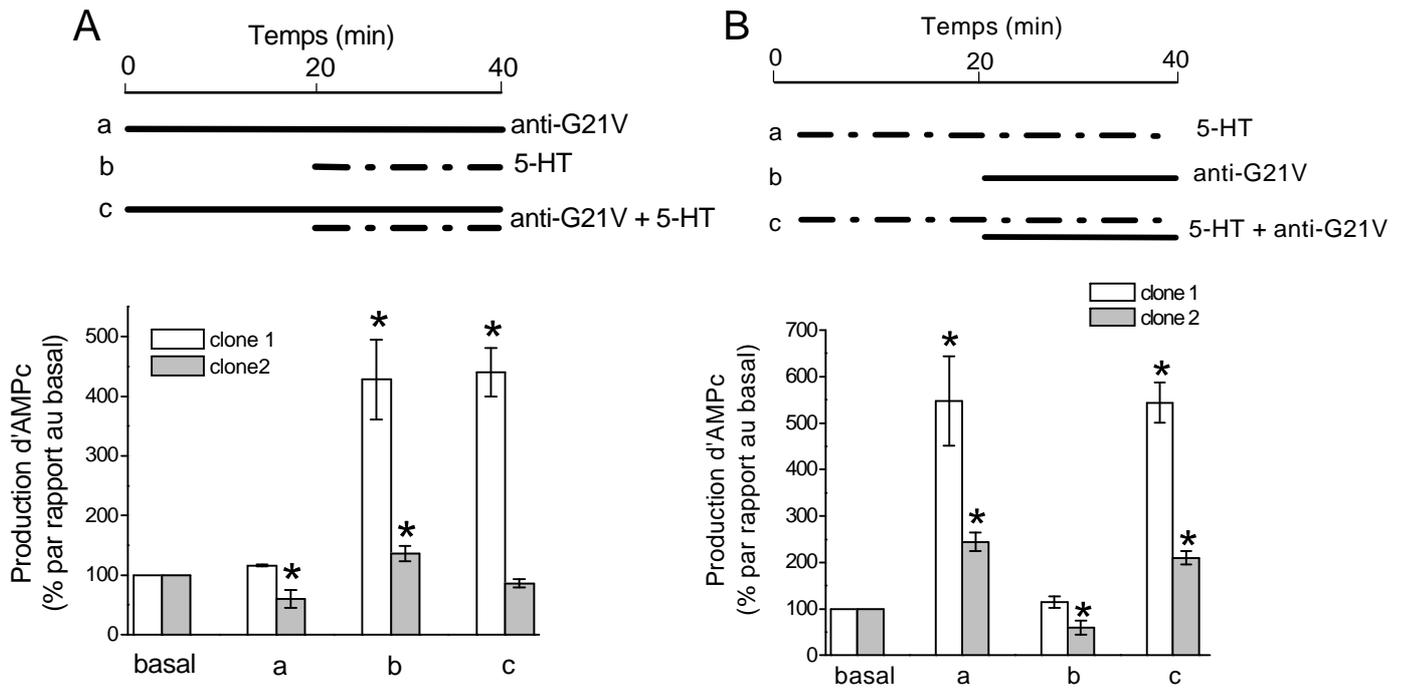


Figure 7 : Effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les clones 1 et 2

Deux protocoles expérimentaux utilisés : application de 10 µg/ml d'anti-G21V pendant 20 min suivie de l'addition de 1 µM de 5-HT pour 20 min supplémentaires (A) et vice versa (B). Résultats normalisés par rapport au niveau basal. Valeurs correspondant à la moyenne ± s.e.m. de 5 expériences indépendantes réalisées en double. * : p<0,05 en comparaison avec le basal.

L'absence de réactivité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} pourrait être due :

- 1) A une concentration d'anticorps utilisée insuffisante.

Nous avons donc incubé les cellules CHO avec 100 µg/ml d'anticorps au lieu de 10 µg/ml. Toutefois, aucune activité a pu être observée. Les taux d'AMPC mesurés étaient de $83 \pm 13\%$ avec l'anti-G21V seul, $384 \pm 40\%$ avec l'anticorps appliqué avant la 5-HT et $493 \pm 35\%$ avec l'anti-G21V suivi de la 5-HT (n = 3).

- 2) A un manque de fixation de l'anticorps sur le récepteur.

Nous avons donc analysé la liaison de l'anticorps par cytométrie de flux (figure 8). La moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence des cellules incubées avec l'anticorps anti-G21V (100 µg/ml) (figure 8Aa et 8Bb, moyenne = 18,6) est plus élevée que celle mesurée avec les IgG purifiées de lapin (figure 8A et 8B contrôle, moyenne = 6,3). Ce déplacement de fluorescence a également été retrouvé avec les cellules incubées en présence d'anticorps et de la 5-HT. En effet, les moyennes sont de 18,5 (figure 8Ac), et 17,3 (figure 8Bc) lorsque l'anticorps est appliqué respectivement avant et après la 5-HT. Les cellules non transfectées (non présentées) et transfectées incubées avec la 5-HT seule (figure 8Ab et 8Ba, moyenne = 4,8) ne montrent pas de déplacement de la fluorescence. Il est donc clair que l'anticorps anti-G21V reconnaît spécifiquement le récepteur recombinant en présence ou en absence de 5-HT. Ainsi, le défaut d'activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1 n'est pas dû à un manque de liaison de l'anticorps sur le récepteur.

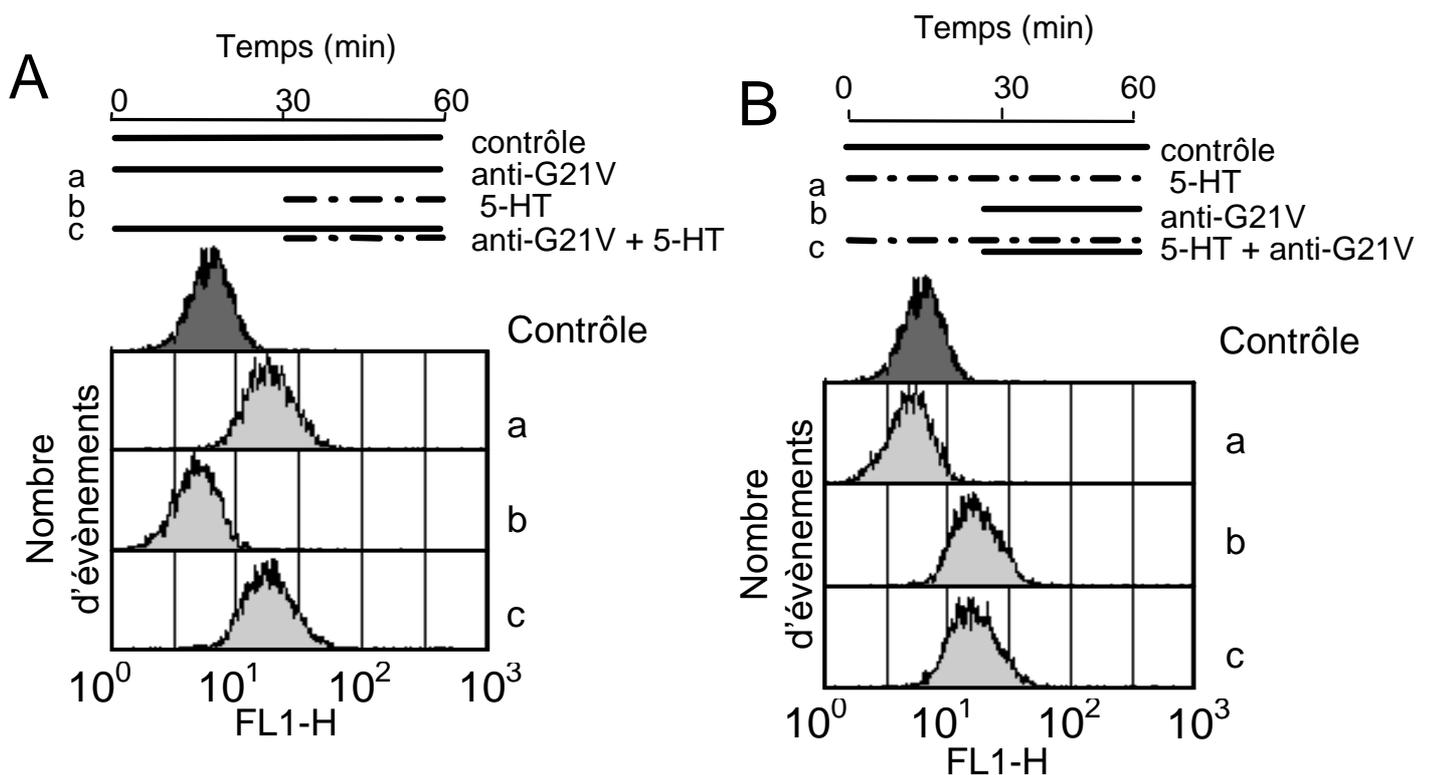


Figure 8 : Analyse par cytométrie de flux de la fixation de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules clone 1

Deux protocoles expérimentaux suivis : 100 µg/ml d'anticorps anti-G21V appliqués pendant 30 min suivie de l'ajout de 1 µM de 5-HT pour 30 min supplémentaires (A) et vice versa (B). Représentation de l'intensité de fluorescence suite à une analyse avec le programme CellQuest (Becton Dickinson). Expérience représentative.

Nous pouvons conclure que l'anticorps anti-G21V n'a pas d'effet fonctionnel visible sur le récepteur h5-HT_{4(e)} recombinant exprimé dans les cellules CHO clone 1, lorsqu'il est incubé seul ou en présence de 5-HT. Ces résultats sont surprenants sachant que les études réalisées au laboratoire sur les myocytes atriaux humains et les cellules COS-7 indiquaient une action de type antagoniste (Sallé et al., 2001) ou agoniste (Bozon et al., 2002) de l'anticorps sur le récepteur h5-HT₄ cardiaque.

c)-Les fractions agonistes des récepteurs h5-HT_{4(e)} diffèrent selon le système d'expression utilisé

Il est admis que les RCPG sont présents dans la membrane sous deux formes R et R* selon un état d'équilibre donné (Leff et al., 1995; Fong et al., 1996; Colquhoun, 1998). R représente la forme inactive du récepteur et constitue la plus grande proportion des récepteurs à l'état de repos. R* représente la forme active du récepteur et serait minoritaire à l'état basal. Un agoniste se lie avec une plus haute affinité sur les formes R* et déplace l'équilibre vers ces dernières.

Les divers comportements observés de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO et COS-7 pourraient être dus à des équilibres différents entre les formes R et R* dans ces deux types cellulaires. Afin de vérifier cette proposition, nous avons réalisé des tests de liaison avec les traceurs [³H]5-HT et [³H]GR113808 et calculé la valeur de la fraction agoniste correspondante.

L'analyse de scatchard réalisée avec le traceur [³H]5-HT sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO et COS-7 a permis d'identifier l'expression de sites de liaison à haute et basse affinité (figure 9). Les sites à haute affinité des cellules CHO présentent une constante de dissociation K_d de $0,31 \pm 0,03$ nM et sont exprimés à un taux de B_{max} = $86 \pm 3,7$ fmol /mg protéine (figure 9A). Pour les cellules COS-7, la constante K_d est de $0,35 \pm 0,17$ nM et le B_{max} est de 188 ± 44 fmol /mg protéine (figure 9B). Les sites de liaison à basse affinité présentent un K_d de $8,5 \pm 3,8$ nM et une valeur de B_{max} de 385 ± 21 fmol/mg protéine dans les cellules CHO (figure 9A) et un K_d de $6,6 \pm 3$ nM et un B_{max} de 1052 ± 434 fmol/mg protéine dans les cellules COS-7 (figure 9B). Ces sites de liaison à haute et basse affinité ont également été identifiés dans les cellules neuronales de rat (Adham et al., 1996) et les cellules HEK-293 exprimant transitoirement les récepteurs h5-HT_{4(a),(b)} (Pindon et al., 2002). Les cellules non transfectées ne présentent aucune liaison spécifique du traceur [³H] 5-HT.

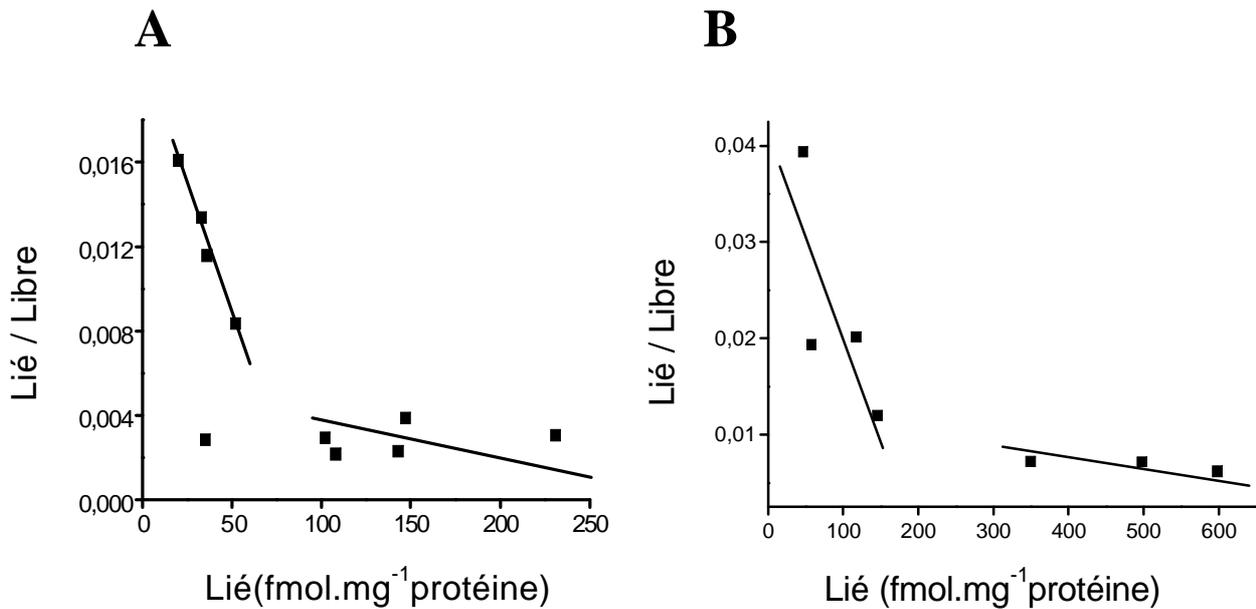


Figure 9 : Analyse de Scatchard de [³H]5-HT sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1 et COS-7

Courbe représentative de la liaison de [³H]5-HT à la surface des cellules CHO (A) et COS-7 (B). Valeurs correspondant à la moyenne \pm s.e.m. de mesures en double. Détermination des constantes de dissociation Kd et du nombre de sites de liaison Bmax

Les tests de liaison réalisés avec l'antagoniste [³H]GR113808 permettent de déterminer la quantité totale de récepteurs membranaires. R_{total} est constituée par la somme des formes de récepteurs R et R* (R_{total} = R+R*). Les valeurs de Bmax obtenues avec le [³H]GR113808 sont de 347 fmol/mg dans les cellules CHO (Mialet et al., 2000b) et de 375 fmol/mg dans les cellules COS-7 (Bozon et al., 2002). La fraction agoniste est déterminée par le rapport R*/R_{total} correspondant au Bmax des sites à haute affinité déterminé par la liaison de la [³H]5-HT divisé par le Bmax obtenu avec le [³H]GR113808 (Pindon et al., 2002). A partir de nos données, la fraction agoniste calculée est de 0,25 dans les cellules CHO et de 0,5 dans les cellules COS-7. La constante d'équilibre J définie par $J = [R] / [R^*]$, est dépendante de la proportion des formes R et R* membranaires. Elle peut être estimée par le rapport (R_{total} - R*) / R*. J correspond alors à la valeur du Bmax obtenue avec le [³H]GR113808 moins la valeur du Bmax obtenue pour les sites à haute affinité en présence de [³H]5-HT divisé par la valeur du Bmax obtenue pour les sites à haute affinité avec la [³H]5-HT. Dans notre étude, les constantes d'équilibre du récepteur h5-HT_{4(e)} sont alors évaluées à J = 3 et J = 1 pour les cellules CHO et COS-7 respectivement.

L'équilibre des formes R, R* des récepteurs h5-HT_{4(e)} présents dans la membrane semble donc être dépendant du type cellulaire étudié. L'environnement membranaire semblerait être un paramètre modulant l'activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)}.

2-Comparaison des effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans deux clones de cellules CHO : clones 1 et 2

Lors de cette étude, nous avons analysé l'activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur 5-HT_{4(e)} en fonction de la densité d'expression de ce dernier. L'environnement membranaire reste alors constant. Nous avons donc sélectionné un deuxième clone de cellules CHO (clone 2) exprimant le récepteur à un taux plus faible. Les résultats obtenus avec ce clone sont représentés sur les mêmes graphes que pour le clone 1.

a)-Caractérisation biochimique et immunochimique du récepteur h 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 2

Afin de déterminer la quantité de récepteurs h5-HT_{4(e)} exprimés sur le clone 2, une analyse de Scatchard a été réalisée avec le traceur [³H]5-HT dans les mêmes conditions que pour les cellules CHO clone 1 et les cellules COS-7. Toutefois, aucune mesure de liaison spécifique n'a pu être déterminée. Le nombre de récepteurs exprimés à la surface de ce clone est probablement inférieur au nombre seuil pouvant être détecté avec ce radioligand. Une autre étude de quantification est actuellement en cours avec l'antagoniste [³H]GR113808. Néanmoins, la comparaison des données obtenues avec la [³H]5-HT sur les deux clones permet de proposer que la quantité de récepteurs 5-HT_{4(e)} exprimés à surface des cellules CHO clone 2 est inférieure à celle du clone 1. Cette lignée constitue donc un support cellulaire adéquat pour évaluer l'activité de l'anticorps anti-G21V en fonction de la densité d'expression du récepteur h5-HT_{4(e)}.

Les cellules CHO clone 2 présentent un niveau basal d'AMPC 1,4 fois plus important que celui mesuré dans les cellules CHO non transfectées. Ce niveau est cependant plus faible que celui retrouvé dans les cellules CHO clone 1 (2,9 fois). Ces résultats indiquent que le récepteur exprimé dans le clone 2 possède également une activité constitutive en absence de ligand. Toutefois, elle est plus modérée que dans le clone 1. Cette diminution pourrait être en étroite corrélation avec le taux plus faible de récepteurs h5-HT_{4(e)} exprimés.

Résultats-Discussions

La caractérisation fonctionnelle du récepteur h5-HT_{4(e)} montre qu'il répond à des doses croissantes de 5-HT. La valeur de l'EC₅₀ est de $32,2 \pm 10$ nM (figure 5), valeur similaire à celle déterminée pour le clone 1 ($13,4 \pm 7$ nM; figure 5). La quantité maximale d'AMPC produite est de 18 ± 3 pmol/10⁵ cellules (*versus* $4 \pm 0,8$ pmol/10⁵ cellules pour le clone 1) et est induite avec une concentration de 1 μ M de 5-HT.

La pharmacologie du récepteur 5-HT_{4(e)} est représentée sur la figure 6. L'application de 1 μ M de 5-HT induit une augmentation significative du taux basal d'AMPC (136 ± 13 %). Toutefois, cette élévation est inférieure à celle observée avec le clone 1. La substance ML10375 (1 μ M) diminue le taux basal (28 ± 11 %) de façon plus importante dans le clone 2 que dans le clone 1. Cependant, cette substance inhibe l'action de la 5-HT de façon similaire dans les deux clones. Enfin, l'application de 10 μ M de forskoline induit une production d'AMPC équivalente dans les clones 1 et 2 avec une valeur de 945 ± 10 % pour le clone 2.

L'analyse immunochimique du récepteur h5-HT_{4(e)} a été effectuée par cytométrie de flux. L'anticorps anti-G21V reconnaît également spécifiquement le récepteur h5-HT_{4(e)} recombinant à la surface du clone 2 en présence et en absence de 5-HT (figure 10). En effet, l'intensité de fluorescence des cellules incubées avec l'anticorps anti-G21V (100 μ g/ml) (figure 10Aa et 10Bb, moyenne = 14) est plus élevée que celle mesurée en condition « contrôle », c'est à dire en présence d'IgG purifiées de lapin (figure 10A et 10B contrôle, moyenne = 10), et est comparable à celle observée en présence de 5-HT (figure 10Ac, moyenne = 14.4 ; figure 10Bc, moyenne = 14.5). Les cellules non transfectées (non présentées) et transfectées incubées avec la 5-HT seule (figure 10Ab et 10Ba, moyenne = 4.7) ne montrent pas de déplacement spécifique de la fluorescence. Notons que contrairement à l'étude sur le clone 1, la 5-HT seule n'a pas été incubée en présence d'IgG purifiées ce qui explique une plus faible intensité de fluorescence par rapport au contrôle. Cependant, l'expérience montre que la 5-HT n'induit pas une intensité de fluorescence non spécifique comme pour le clone 1.

Bien que les conditions expérimentales utilisées ne permettent pas une quantification des récepteurs, nous pouvons cependant remarquer que les valeurs des moyennes géométriques des intensités de fluorescence en présence d'anticorps sont moins élevées sur le clone 2 (figure 10) que sur le clone 1 (figure 8). Ces données suggèrent donc que le nombre de sites antigéniques reconnus par l'anti-G21V est plus petit sur le clone 2 que sur le clone 1. Ces résultats sont de nouveau en faveur d'un taux d'expression plus faible des récepteurs h5-HT_{4(e)} dans le clone 2.

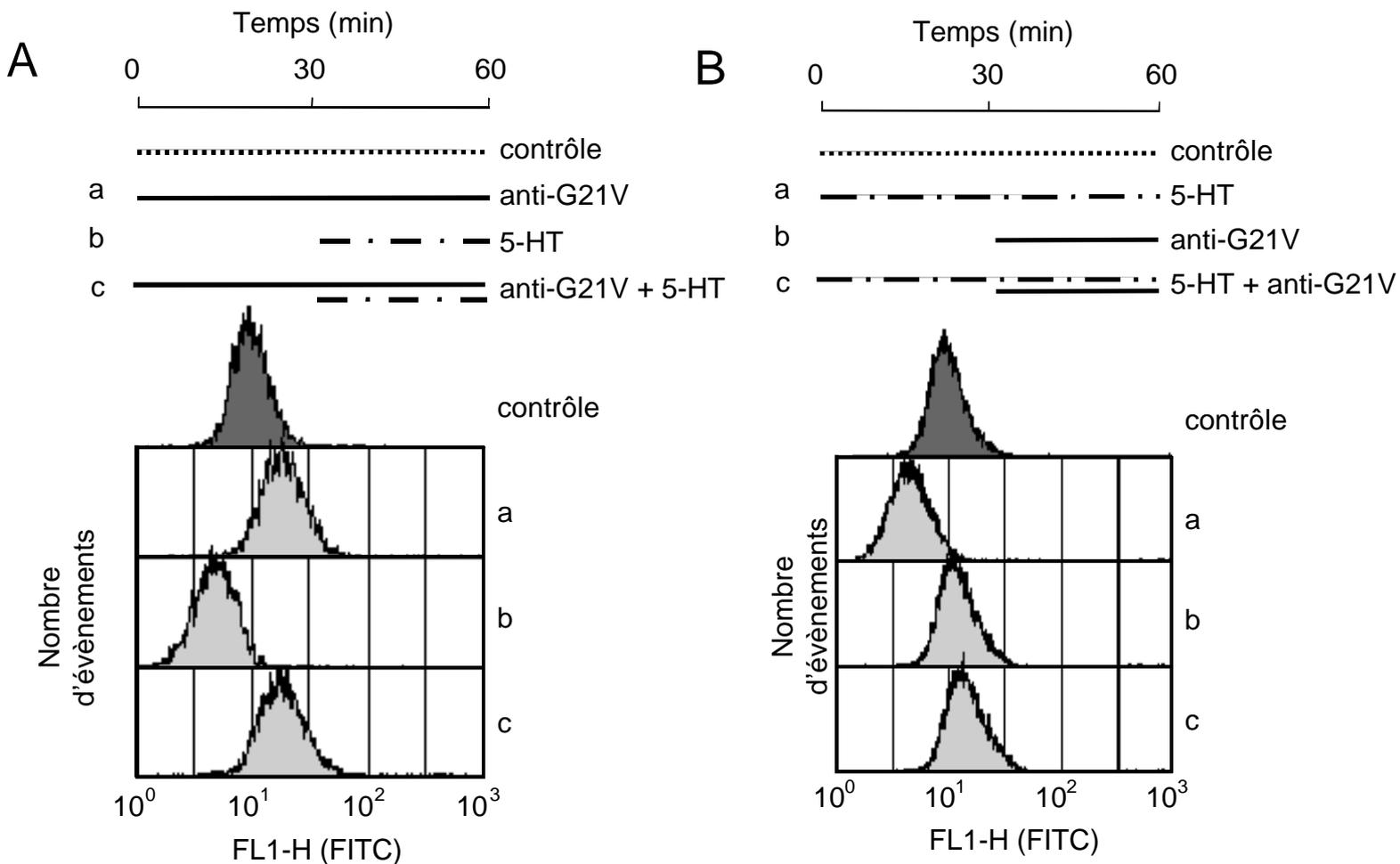


Figure 10 : Analyse par cytométrie de flux de la fixation de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules clone 2

Deux protocoles expérimentaux suivis : 100 µg/ml d'anticorps anti-G21V appliqués pendant 30 min suivie de l'ajout de 1 µM de 5-HT pour 30 min supplémentaires (A) et vice versa (B). Représentation de l'intensité de fluorescence suite à une analyse avec le programme CellQuest (Becton Dickinson). Expérience représentative.

L'ensemble des résultats obtenus avec les cellules CHO clones 1 et 2 indiquent que le récepteur h5-HT_{4(e)} :

- (1) active l'adénylate cyclase avec la même efficacité dans les deux clones.
- (2) a une activité constitutive dans les cellules non stimulées.
- (3) développe un profil pharmacologique (ML10375 et 5-HT) similaire sur les deux clones. Toutefois, les réponses ont des amplitudes différentes.
- (4) possède les mêmes propriétés antigéniques dans les clones 1 et 2.

En conclusion, le récepteur h5-HT_{4(e)} présente les mêmes propriétés fonctionnelles et immunologiques dans les deux clones CHO.

b)-Effet fonctionnel de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 2

L'application de 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V sur le clone 2 provoque une diminution significative du taux basal d'AMPc (figures 6 et 7), alors qu'aucune variation avait été observée sur le clone 1. Les valeurs mesurées sont ($38 \pm 8\%$, figures 6), ($62 \pm 8\%$, figure 7Bb) et ($40 \pm 15\%$, figure 7Aa) lorsque l'anticorps est appliqué respectivement pendant 15, 20 et 40 min à la surface des cellules. L'activité de type agoniste inverse de l'anticorps sur le récepteur est comparable à celle du ligand ML10375 (figure 6).

Dans la littérature, il est proposé que les effets des anticorps dirigés contre la seconde boucle extracellulaire des RCPG nécessitent l'oligomérisation des récepteurs. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les activités cellulaires obtenues avec l'anticorps anti-G21V bivalent et son fragment monovalent (Fab). Les fragments Fab diminuent la production basale d'AMPc ($29 \pm 8\%$), alors qu'ils étaient sans effet sur le clone 1 (figure 6). Les Fab ont donc une activité fonctionnelle similaire à celle observée avec l'anticorps bivalent anti-G21V sur les deux clones. Ces résultats indiquent que l'action de l'anticorps anti-G21V n'est pas dépendante de la dimérisation des récepteurs h5-HT_{4(e)}.

L'action de l'anticorps sur une stimulation sérotoninergique a également été étudiée. Les cellules CHO ont donc été incubées avec l'anticorps puis avec la 5-HT (figure 7A), et *vice versa* (figure 7B). Lorsque l'anticorps anti-G21V est ajouté avant la 5-HT, la production d'AMPc est significativement plus faible (figure 7Ac; $86 \pm 7\%$) que celle mesurée en présence de 5-HT seule (figure 7Ab; $136 \pm 13\%$). Les études inverses montrent que l'anticorps anti-G21V appliqué après la 5-HT ne change pas le niveau d'AMPc produit suite à la stimulation sérotoninergique (figure 7Bc, $210 \pm 16\%$, *versus* figure 7Bb; $244 \pm 22\%$). Le sens d'application de l'anticorps en présence de 5-HT intervient donc dans l'activité fonctionnelle de cet anticorps. Des résultats comparables ont été obtenus sur les myocytes atriaux humains (Sallé et al., 2001). En effet, l'anticorps inhibe le courant I_{Ca2+,L} uniquement après une seconde stimulation sérotoninergique.

Les résultats présentés au cours de ce travail tendent à proposer que les différentes activités induites par l'anticorps sur les cellules CHO seraient corrélées avec la densité des récepteurs exprimés. Ces variations ne peuvent cependant pas être expliquées par un changement d'équilibre membranaire des formes R et R*. En effet, Claeysen et al., 2000 a montré que cet équilibre était indépendant de la densité d'expression des récepteurs 5-HT₄ au sein d'un même système cellulaire. Afin d'identifier l'origine de l'effet agoniste inverse de

l'anticorps anti-G21V sur le clone 2, nous avons incubé les cellules CHO en présence d'inhibiteurs soit de phosphodiesterases (la théophylline), soit de la protéine G_i (la PTX) (figure 11).

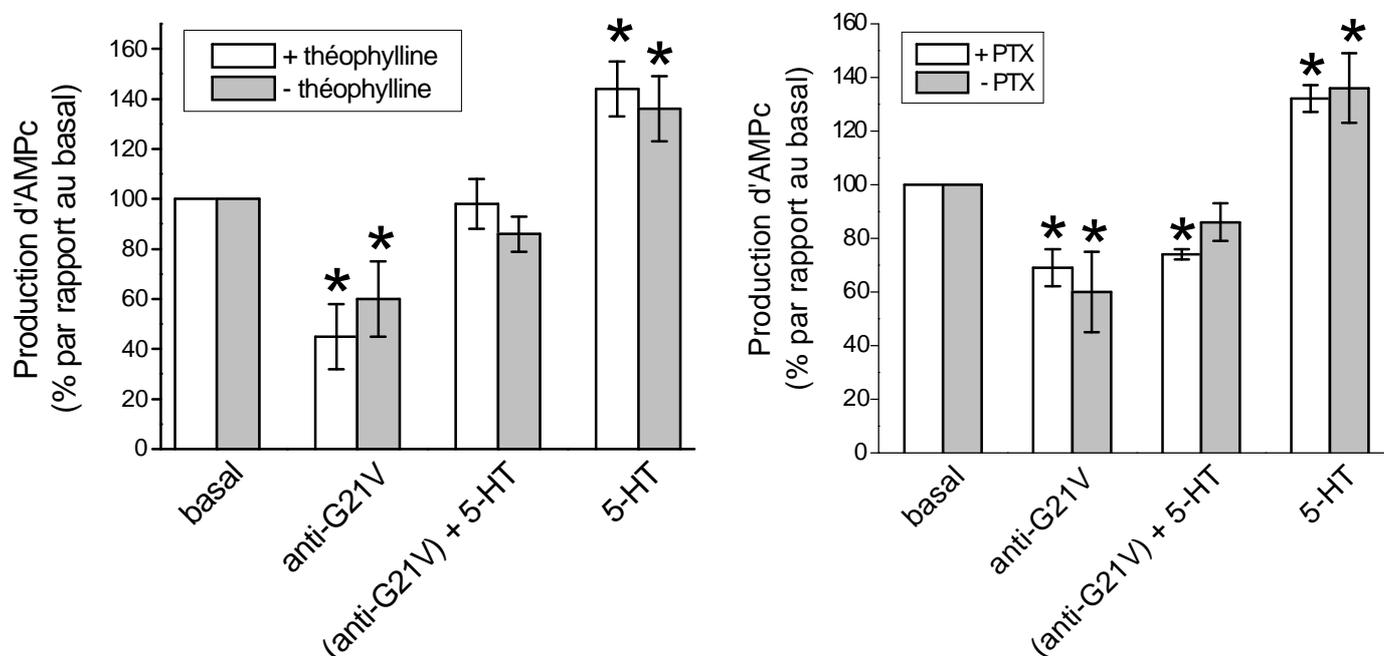


Figure 11 : Effets d'inhibiteurs de phosphodiesterases et de protéines G_i sur l'activité de l'anti-G21V

Application de l'anticorps anti-G21V sur les cellules CHO clone 2 pendant 20 min suivie de l'addition de 1 μ M de 5-HT pour 20 min supplémentaires. Expériences réalisées en présence et en absence de 5 mM d'inhibiteur de phosphodiesterases (théophylline) (A) ou de 2 μ g/ml d'inhibiteurs des protéines G_i (PTX) (B). Résultats normalisés par rapport au basal. Valeurs représentent la moyenne \pm s.e.m. de 3 expériences indépendantes réalisées en double. * : $p < 0,05$ en comparaison avec le basal.

En présence de théophylline (figure 11A), l'action de l'anti-G21V est comparable à celle observée en absence de cet inhibiteur. Les valeurs d'AMPC sont (55 ± 13 % , *versus* 38 ± 8 % sans inhibiteur, figure 6) avec 10 μ g/ml d'anti-G21V et (98 ± 10 % , *versus* 86 ± 7 % , figure 7Ac) avec l'anticorps puis la 5-HT. L'activité de type agoniste inverse de l'anticorps n'est donc pas liée à l'activation des phosphodiesterases. D'autres expériences ont été réalisées en incubant les cellules CHO clone 2 en présence de 2 μ g/ml de PTX pendant 24 heures. De nouveau, les valeurs expérimentales sont identiques en présence et en absence de PTX. Les taux d'AMPC sont (31 ± 7 % , *versus* 38 ± 8 % sans inhibiteur, figure 6) avec l'anticorps seul et (74 ± 2 % , *versus* 86 ± 7 %) avec l'anti-G21V plus la 5-HT. Ces résultats indiquent que la diminution d'AMPC induite par l'anticorps n'est pas provoquée par l'activation d'une protéine

Gi. De plus, il semble exister une activité constitutive de la protéine Gi au sein des cellules CHO. En effet, le niveau basal d'AMPc est environ 4 fois plus important en présence de PTX qu'en absence : 18 ± 5 pmol/ 10^5 cellules d'AMPc mesurés avec les cellules traitées à la PTX contre $4 \pm 0,8$ pmol/ 10^5 avec les cellules non traitées.

D-Conclusions et perspectives

L'étude réalisée sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé par voie recombinante montre pour la première fois, que l'activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V sur ce récepteur est fonction :

- (1) du système d'expression utilisé et de l'environnement membranaire
- (2) de la densité d'expression des récepteurs

La proportion des formes R et R* des RCPG dans la membrane est régie par la constante d'équilibre allostérique J. Cette constante dépend de plusieurs facteurs tels que l'isoforme du récepteur exprimé et la nature du tissu (Pindon et al., 2002). L'expression du récepteur h5-HT_{4(e)} dans les cellules COS-7 et CHO a permis de proposer que cette constante dépendait également de l'environnement membranaire. En effet, la valeur J mesurée est différente entre les deux types cellulaires. L'équilibre basal R/R* est donc spécifique du système d'expression utilisé. De plus, Claeyssen et al, 2000 a montré que la valeur de cette constante était indépendante de la densité d'expression des récepteurs alors que le couplage des récepteurs aux protéines impliquées dans la transduction (protéine G, adénylate cyclase) est quant à lui lié à la densité des récepteurs (Claeyssen et al., 1997).

Nous avons pu observer que l'anticorps anti-G21V seul induisait soit un effet de type agoniste sur l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)} (cellules COS-7 ; Bozon et al, 2002), soit aucun effet (clone 1) ou un effet de type agoniste inverse (clone 2). L'action de type agoniste inverse reflèterait donc une augmentation de la concentration des formes R du récepteur 5-HT_{4(e)}. La valeur du rapport [R]/[R*] en présence de l'anticorps devrait alors augmenter. A l'inverse, l'effet agoniste observé sur les cellules COS-7 semblerait indiquer une augmentation de la concentration des formes R* et donc une diminution de la constante J. Lorsque l'anticorps ne modifie pas l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)}, le ratio [R]/[R*] devrait être inchangé par rapport à l'état basal.

Au cours de ce travail, nous avons également montré que le taux d'expression du récepteur h5-HT_{4(e)} était un facteur modulateur de l'activité de l'anticorps anti-G21V (clones

1 et 2). Comment pouvons nous expliquer l'influence de ce paramètre sur l'action d'un anticorps ? Plusieurs hypothèses peuvent être proposées:

1) La première serait qu'à faible densité d'expression du récepteur 5-HT_{4(e)} (clone 2), l'anticorps pourrait déclencher une cascade de transduction différente de celle induite par la 5-HT et provoquer ainsi la synthèse d'un autre second messenger, tel que le GMPC. Ce dernier pourrait diminuer la quantité d'AMPC intracellulaire en activant les PDE. Cependant, cette hypothèse est à écarter. En effet, les expériences réalisées sur le clone 2 en présence de théophylline montrent que l'anticorps a le même effet sur le récepteur h5-HT_{4(e)} en présence et en absence d'inhibiteurs des PDE. Ces données suggèrent que l'activité inhibitrice de l'anti-G21V n'est pas corrélée à un processus de régulation de la concentration intracellulaire d'AMPC.

2) La seconde hypothèse est qu'à faible densité d'expression, la fixation de l'anticorps pourrait favoriser le couplage du récepteur avec une protéine de type G_i. Cette hypothèse est également à réfuter. En effet, les résultats obtenus avec l'inhibiteur PTX sur le clone 2 indiquent que l'activité fonctionnelle de l'anticorps ne fait pas intervenir de protéine G_i.

3) Enfin la dernière hypothèse, la plus probable, porterait sur l'efficacité de couplage du récepteur 5-HT_{4(e)} avec la protéine G_s. La liaison de l'anticorps anti-G21V diminuerait ce paramètre plus particulièrement lors de l'expression du récepteur 5-HT_{4(e)} à des taux faibles. L'activité de type « agoniste inverse » induite par l'anticorps anti-G21V sur le clone 2 suggère un déplacement de l'équilibre des récepteurs membranaires vers les formes R. De plus, l'inhibition de l'activité agoniste de la 5-HT par cet anticorps traduit une diminution de la quantité de récepteurs h5-HT_{4(e)} couplés aux protéines G (formes R*). Ces deux observations permettent de penser que la fixation de l'anticorps diminue les interactions entre le récepteur et le système de transduction cellulaire. Dans des conditions de surexpression du récepteur h5-HT_{4(e)} comme observé avec le clone 1, ces phénomènes seraient peu visibles. En effet, les protéines membranaires sont très proches les unes des autres et ont une mobilité réduite dans la bicouche lipidique. Cet encombrement protéique rendrait alors inefficace et invisible les modifications de l'équilibre basal des formes R /R* induites par l'anticorps. Les réponses observées avec le clone 1 correspondent effectivement à une absence fonctionnelle de l'anticorps. Alors que les données observées avec le clone 2 sont en faveur d'une diminution de l'efficacité de couplage en présence de l'anticorps.

Sur les cellules CHO clone 2, l'anticorps anti-G21V est incapable d'inhiber la réponse sérotoninergique lorsqu'il est appliqué après la 5-HT. Ce phénomène a également été retrouvé par Sallé et al., 2001 en mesurant le courant calcique I_{Ca2+,L}. Les auteurs proposaient que

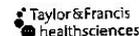
l'anticorps ne pouvait plus se fixer sur le récepteur après la liaison de la sérotonine dans sa poche hydrophobe transmembranaire. L'épitope reconnu semblait avoir disparu suite à la fixation de la 5-HT. D'après nos études de cytométrie en flux, l'anticorps se fixe de la même façon, lorsqu'il est incubé seul, avant ou après la sérotonine sur les cellules CHO clone 2. L'incapacité à inhiber l'action de la 5-HT ne serait donc pas due à la disparition des épitopes reconnus par l'anticorps. Elle serait plutôt liée à des modifications de conformation du récepteur induites par la fixation de la 5-HT. Ces changements n'empêcheraient pas la liaison de l'anticorps sur le récepteur, mais inhiberaient la transmission des signaux intracellulaires liées à la fixation de l'anti-G21V.

Dans la littérature, l'anticorps RaH26Q dirigés contre la seconde boucle extracellulaire du récepteur β_2 -adrénergique favoriserait la formation de récepteurs dimériques capables de transmettre le signal à l'intérieur des cellules (Mijares et al., 2000). Les effets fonctionnels de cet anticorps sont abolis lorsqu'il est sous forme monocaténaire (Mijares et al., 2000). Les résultats que nous avons obtenu avec les anticorps anti-récepteur h5-HT₄ mono et bicaténaires sont différents de ceux présentés avec le récepteur β_2 -adrénergique. Nos observations suggèrent que l'anticorps anti-G21V n'induirait pas la dimérisation des récepteurs h5-HT_{4(e)} exprimés dans les deux clones de cellules CHO.

Il serait intéressant de poursuivre notre étude à l'aide d'un autre système d'expression reconstituant le plus précisément possible le contexte cellulaire et membranaire des cardiomyocytes atriaux humains. Les cellules HEK 293 d'origine humaine pourraient peut être constituer un bon candidat. De plus, nous pourrions affiner la corrélation entre l'effet fonctionnel induit par l'anticorps et la densité des récepteurs. Pour cela, l'isoforme (e) du récepteur pourrait être exprimée de façon transitoire dans les cellules COS-7 à des taux variables. Par la suite, ces travaux devraient être étendus à l'ensemble des isoformes (a, b et c) du récepteur 5-HT₄ retrouvées au niveau des cellules cardiaques atriales humaines.

Annexe 1 :

Receptors and Channels, 8:113–121, 2002
 Copyright © 2002 Taylor & Francis
 1060-6823/02 \$12.00 + .00
 DOI: 10.1080/10606820290005047



Agonist-Like Activity of Antibodies Directed Against the Second Extracellular Loop of the Human Cardiac Serotonin 5-HT_{4(e)} Receptor in Transfected COS-7 Cells

V. Bozon and E. Di Scala

CNRS-UMR 6542, Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Faculté des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France

P. Eftekhari

Forenap Therapeutic Discovery, Institut de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Srasbourg, France

J. Hoebeker

CNRS UPR 9021, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg Cedex, France

F. Lezoualc'h and R. Fischmeister

INSERM U-446, Laboratoire de Cardiologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry Cedex, France

J. Argibay

CNRS-UMR 6542, Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Faculté des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France

We have previously reported that antipeptide antibodies directed against the second extracellular loop of the cardiac h5-HT₄ receptor could block the activation of the L-type Ca channel in human atrial cardiomyocytes. In this paper we investigate the immunological and physiological activity of these antibodies, in a cell system expressing a larger amount of receptors than the atrial cells. The recombinant receptor was expressed at the surface of COS-7 cells under an active form (serotonin, EC₅₀ = 1.81 × 10⁻⁷ M), at a high level (375 ± 25 fmol receptor/mg total protein) and was able to bind a specific ligand (GR113808) with a high affinity (K_d = 0.28 ± 0.05 nM). In this system, the same anti-peptide antibodies used for the cardiac cells induced an "agonist-like" effect on the recombinant h5-HT₄ receptor. These results are in line with those shown for others G-protein coupled receptors, as adrenoreceptors.

In addition, this work showed that the effect of the antibodies is not only dependent on the epitopic region recognised but also on the molecular density and/or the cellular environment of the target receptors. Finally, our results support the hypothesis that the h5-HT₄ receptor could be a new target for autoantibodies in patients with atrial arrhythmia.

Keywords Agonist-Like, Anti-Peptide Antibody, Atrial Fibrillation, cAMP, COS-7 Cells, 5-HT₄ Receptor

Serotonin (5-HT) exerts positive inotropic and chronotropic effects on human myocardium via the stimulation of a newly described human cardiac receptor, the 5-HT₄ receptor subtype (Bockaert et al. 1992; Jahnel et al. 1992; Kaumann 1991; Kaumann et al. 1991; Ouadid et al. 1992; Sanders et al. 1992). With respect to the heart, this receptor has been found to be functional in only two species, the human and the pig (Jahnel et al. 1992; Laer et al. 1998; Ouadid et al. 1995; Schoemaker et al. 1993), and is expressed in atrial tissues exclusively (Kaumann 1991; Sanders et al. 1992). Moreover, four 5-HT₄ receptor isoforms, named 5-HT_{4(a)}, 5-HT_{4(b)}, 5-HT_{4(c)}, and 5-HT_{4(e)}, have been identified in the human atria (Bach et al. 2001; Blondel et al. 1998; Mialet et al. 2000a).

Received; accepted.

We warmly acknowledge the skilful technical assistance of M. Pingaud. This research was supported in part by Fondation pour la Recherche Médicale and le Conseil Régional de la Région Centre (France).

Address correspondence to V. Bozon, CNRS-UMR 6542, Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Faculté des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France. E-mail: bozon@univ-tours.fr

Arrhythmic contractions have been observed in human atrial tissue fragments following 5-HT incubation. The effects were abolished in the presence of specific 5-HT₄ receptor antagonists (Kaumann and Sanders 1994). These results suggest that the 5-HT₄ receptor could be implicated in the development of atrial arrhythmia and probably in that of atrial fibrillations (Grammer et al. 2001).

On the other hand, several clinical studies have shown that 60% of patients with atrial arrhythmia have an atrial myocarditis associated with lymphocyte infiltration, suggesting the presence of an immunological reaction induced by cell injury (Frustaci et al. 1997). Immunological analysis of serum from patients with atrial arrhythmia has indicated the presence of autoantibodies directed against the second extracellular loop of G protein-coupled receptors (β 1-, β 2-adrenergic and M2 muscarinic receptors) (Hoebeke, 1995). IgG purified from serum from these patients have agonist-like effects on these receptors, and the effects are suppressed in the presence of β -adrenergic or muscarinic receptor antagonists (Fu et al. 1994; Magnusson et al. 1994; Wallukat et al. 1995). Altogether, these results indicate that an autoimmune process could be at the origin of some cardiac arrhythmia.

The human cardiac 5-HT₄ receptor (h5-HT₄) belongs to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCR) as β -adrenergic and muscarinic receptors (Bach et al. 2001; Blondel et al. 1997). The structure of the h5-HT₄ receptor thus consists of 3 domains: 1) *the transmembrane domain*, which is composed of seven putative transmembrane helices, and binds the ligand with a high affinity (Dzimiri et al. 1999); 2) *the cytoplasmic domain*, which is constituted of 3 intracellular loops and a C-terminal tail. These cytoplasmic regions allow the coupling of the receptor to G proteins (Bockaert et al. 1998), and 3) *the*

extracellular domain, which is composed of a N-terminal tail and 3 extracellular loops, which are potential autoantibody targets. Cardiac h5-HT₄ receptors could be then a new potential autoantibody target in patients with atrial arrhythmia.

In view of the limited amount of receptors in the human atrial cells, we decided therefore to transiently express one of the cardiac h5-HT₄ receptor isoforms, the h5-HT_{4(e)} receptor in COS-7 cells, to determine the functionality of this receptor in signal transduction and to study the immunological and biochemical properties of the anti-receptor antibodies on the expressed receptor.

RESULTS

Binding Characteristics of the Recombinant h5-HT_{4(e)} Receptor

The expression of the h5-HT_{4(e)} receptor was monitored by [³H]GR113808 binding on the surface of transiently transfected COS-7 cells at 48 h post-transfection. The level of expression was dependent on the amount of transfected DNA and reached a maximum with 2 μ g of plasmid DNA (data not shown). Control cells did not show any significant specific 5-HT₄ receptor binding site.

To determine the binding affinity of the h5-HT_{4(e)} receptor, cells expressing this receptor were incubated with increasing concentrations of [³H]GR113808 in the presence of an excess of unlabeled ML10375 (Figure 1A). The saturation analysis reveals the expression of single saturable sites of high affinity for this h5-HT₄ receptor isoform expressed at the surface of transfected COS-7 cells. Non-specific binding linearly increased with increasing ligand concentration. Scatchard analysis of the results

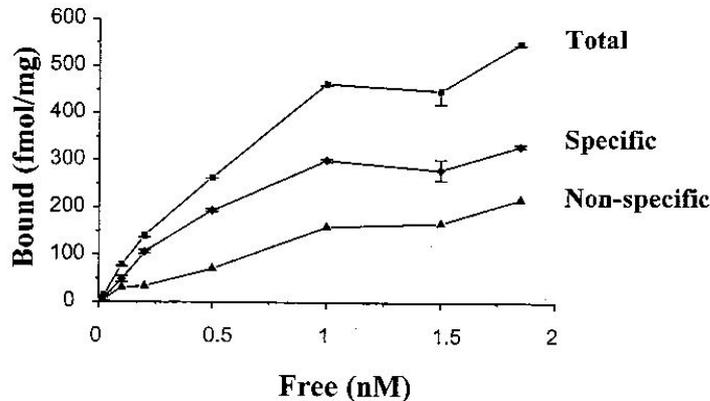


FIG. 1A. Activation of adenylyl cyclase with 5-HT on transfected cells. (A) The cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor, and the mock-transfected cells were preincubated for 15 min at 37°C with phosphodiesterase inhibitors, and were stimulated with increasing concentrations of 5-HT for another 15 min at 37°C. The value of cAMP obtained in mock-transfected cells was subtracted from that obtained in cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor. Each point represents a normalized means value \pm s.e.m of duplicate measurements of three experiments. The EC50 value corresponds to the concentration of 5-HT giving 50% of the maximum cAMP production. (B) The cells expressing h5-HT_{4(e)} receptor and the mock-transfected cells were stimulated with 1 μ M of 5-HT and the culture media were assayed for cAMP at different times. The values are the mean \pm s.e.m of duplicate measurements of three experiments and were plotted as the difference between the values obtained with cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor and mock-transfected cells.

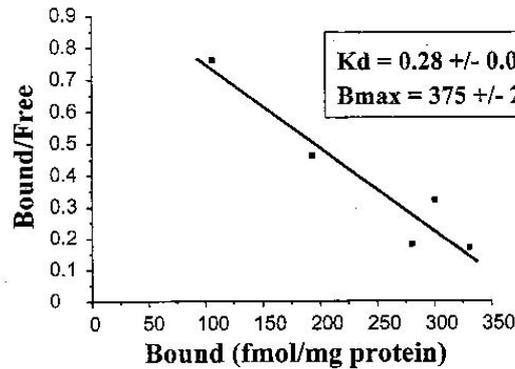


FIG. 1B. Ligand binding and Scatchard analysis on COS-7 cells expressing the 5-HT_{4(e)} receptor. The cells expressing h5-HT_{4(e)} receptor were incubated with increasing concentrations of [³H]GR113808 ranging from 0.01 to 2 nM in the presence or absence of an excess of unlabeled 5-HT₄ receptor antagonist, ML10375 (10 μM), 48 h after transfection. The saturation binding isotherms (A) and corresponding Scatchard plots (B) were derived from the means ± s.e.m. of triplicate determinations of a single illustrative experiment.

(Figure 1B) shows a K_d value of 0.28 ± 0.05 nM for the recombinant h5-HT_{4(e)} receptor. The h5-HT_{4(e)} receptor concentration was 3 × 10⁵ receptors per cell, which is equivalent to 375 ± 25 fmol of receptor per mg of total protein.

Activation of Adenylyl Cyclase by the h5-HT_{4(e)} Receptor

Functional coupling of the recombinant h5-HT_{4(e)} receptor isoform to adenylyl cyclase was investigated by measuring cAMP production in response to various experimental condi-

tions. The dose responsiveness to 5-HT and the time course of the enzyme activity were followed. As shown in Figure 2A, the h5-HT_{4(e)} receptor responded to increasing concentrations of 5-HT and induced cAMP synthesis with an apparent EC₅₀ value of 1.81 × 10⁻⁷ M and a maximum cAMP production for 1 μM of 5-HT. On the other hand, mock-transfected cells did not respond to 5-HT.

The time-course of cAMP synthesis was monitored in cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor in the presence of 1 μM

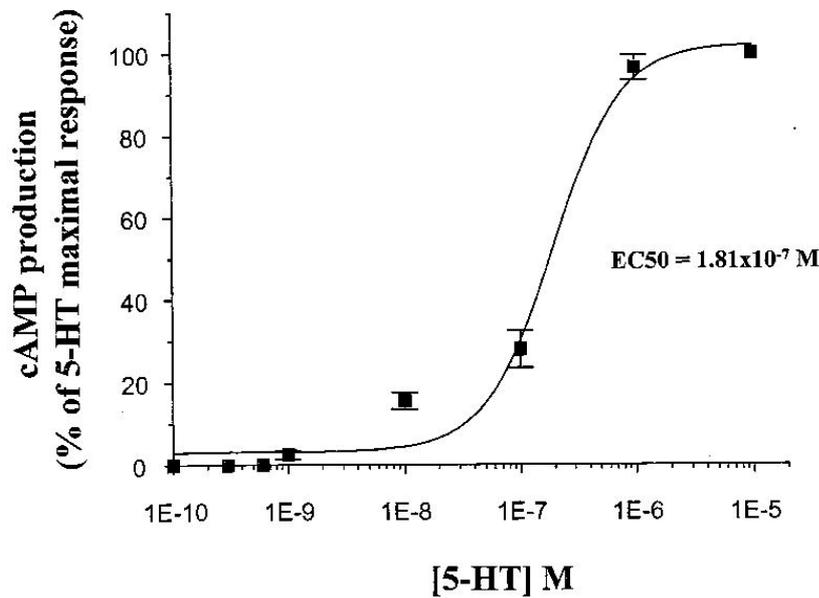


FIG. 2A.

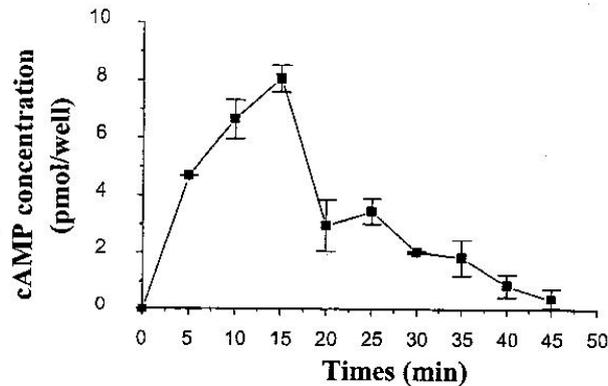


FIG. 2B. Effect of anti-G21V antibodies on cAMP production. The plated cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor were preincubated for 15 min at 37°C. The incubation was continued for another 15 min at 4°C by introducing into the culture medium different drugs as : 1) 1 μM 5-HT (5-HT); 2) 10 μg/ml anti-G21V antibody (anti-G21V); 3) 10 μg/ml anti-G21V antibody plus 1 μM 5-HT (anti-G21V + 5-HT); 4) 10 μg/ml anti-G21V antibody plus 67 nM peptide (anti-G21V + pep); 5) complex anti-G21V antibody/peptide plus 1 μM 5-HT (anti-G21V + pep + 5-HT). In other experiments, cells were preincubated with 10 μg/ml anti-G21V antibody for 15 min at 37°C and were subsequently incubated with 1 μM 5-HT for another 15 min at 37°C ((anti-G21V) + 5-HT). Culture media were collected and assayed for cAMP production. The values are the mean ± s.e.m of duplicate determinations in three separate experiments. Comparison between two groups was performed by using analysis of variance, ANOVA. Statistical significance was accepted at P < 0.05. * significant difference versus untransfected cells or control mock-transfected cells; † significant difference versus anti-G21V antibody.

5-HT. Activation of the 5-HT_{4(e)} receptor increased the intracellular cAMP level and induced a maximum production about 8 pmol/well (Figure 2B). The activity declined after 15 min of stimulation, suggesting a progressive desensitization of the h5-HT_{4(e)} receptor upon prolonged exposure to 5-HT stimulation.

Recognition of the h5-HT_{4(e)} Receptor by the Anti-G21V Antibody

Membrane h5-HT_{4(e)} receptor expression was analyzed by flow cytometry and immunochemical assays on transfected COS-7 cells. Affinity-purified anti-peptide anti-G21V antibodies were used for immunostaining these cells. As shown in Figure 3, the mean fluorescence intensity of cells stained with anti-G21V antibodies (white) was higher than that of cells stained with preimmune serum (black). Mock-transfected cells yielded no significant specific immunofluorescence staining (not shown). Comparable results were observed with the Spot method (Figure 4). A colour was developed only on spots where transfected cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor were applied (A1 and A3 wells). Indeed, spots containing mock-transfected cells remained colourless (B1, B2 and B3 wells). The FACS scan analysis and the immunochemical assays show the detection of a specific immunorecognition at the surface of transfected COS-7 cells expressing a high amount of active h5-HT_{4(e)} receptor. The polyclonal anti-G21V antibodies recognized specifically the recombinant receptor under native conditions.

Effects of the Polyclonal Anti-G21V Antibody on h5-HT_{4(e)} Receptor Activity

To test the effects of the polyclonal antibody anti-G21V on the h5-HT_{4(e)} receptor activity, transfected COS-7 cell express-

ing this receptor were incubated with the antibody in the absence or in the presence of 1 μM 5-HT, and the cAMP induction was assayed for each experimental condition. Basal cAMP values were not significantly different in mock-transfected cells and cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor, indicating that this h5-HT_{4(e)} receptor isoform had no intrinsic activity in transfected COS-7 cells in the absence of agonist (Figure 5).

Anti-G21V antibody prepared against the second extracellular loop of the cardiac h5-HT₄ receptor induced an agonist-like effect on the receptor. The increasing of cAMP level observed in presence of anti-G21V antibody alone is comparable to that obtained with the application of 1 μM 5-HT. Indeed, basal cAMP level of transfected cells incubated with 5-HT or anti-G21V antibody was increased significantly by 74 ± 34% and 97 ± 35% respectively (Figure 5). On the other hand, control cells did not respond to the antibody.

The co-incubation of h5-HT_{4(e)} receptor with 10 μg/ml of anti-G21V antibody plus 1 μM of 5-HT, induced an increase over the basal cAMP level (190 ± 50%) (Figure 5). However, cAMP production was not significantly different from the cAMP amount observed during the application of 5-HT or anti-G21V antibody separately at the surface of cells expressing the receptor. Similar results were observed when the transfected cells were preincubated with 10 μg/ml of antibody, and followed by stimulation with 1 μM of 5-HT (Figure 5).

To verify antibody specificity, anti-G21V antibody was preincubated with its cognate peptide antigen (G21V) and used for cAMP induction. The level of cAMP produced was similar to the basal cAMP quantity measured in control cells, indicating the involvement of the anti-G21V antibody combining site towards the exoloop 2 of the h5-HT₄ receptor (Figure 5).

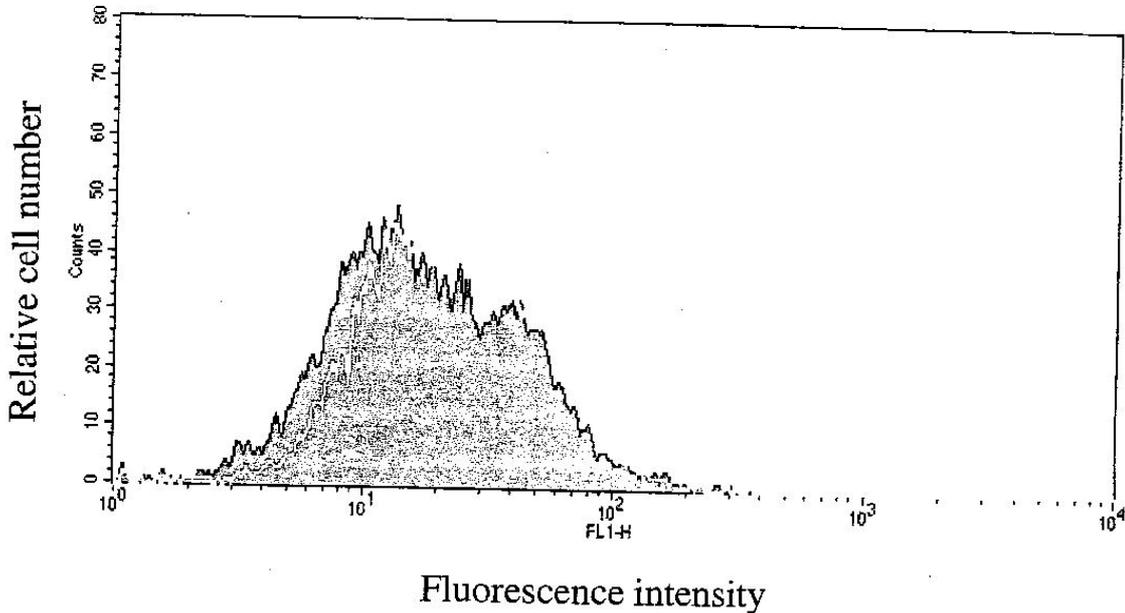


FIG. 3. FACS scan analysis of the COS-7 cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor. Transiently transfected COS-7 cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor were incubated in PBS containing either the polyclonal anti-peptidic anti-G21V antibody (1.2 nM) (white) or rabbit preimmune control serum (1.2 nM) (black). After washing, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1/160, was added to the cells. After incubation and washing, the cells were fixed with 1% PAF, and analysed on a FACS scan using the LYSIS program (Becton Dickinson).

Furthermore, the amount of cAMP increased again significantly in the presence of 1 μM 5-HT which was added to the complex anti-G21V antibody/peptide. The cAMP production reached the value of 96 ± 32% which is comparable to that measured during the stimulation of transfected cells with 1 μM of 5-HT

alone, confirming that the peptide was devoid of blocking activity.

DISCUSSION

We have previously shown that antibodies directed against the second extracellular loop of the 5-HT₄ receptor could block the activation of L-type Ca channels in human atrial cardiomyocytes (Sallé et al. 2001). To investigate the immunological and physiological activities of these antibodies, we needed a cell expressing a larger amount of 5-HT₄ receptors than the atrial cells where the expression is extremely low (4 fmol/mg protein) (Kaumann et al. 1996). We therefore decided to transfect COS-7 cells with cDNA encoding the cardiac h5-HT_{4(e)} receptor isoform (Claeysen et al. 1999; Mialet et al. 2000a).

The h5-HT_{4(e)} receptor was expressed at the surface of COS-7 cells under an active form and at a high level. The amount of expression was 375 ± 25 fmol/mg protein, which is about 100 to 750 times of that found in natural cardiac tissues as in right atria of piglet (Kaumann et al. 1995) and human (Kaumann et al. 1996) respectively. The recombinant receptor was able to bind the specific 5-HT₄ antagonist GR113808 (Grossman et al. 1993; Kaumann 1993) with high affinity. The K_d value obtained was 0.28 ± 0.05 nM in agreement with those reported in human atria (Kaumann et al. 1991; Kaumann 1993) and in COS-7 cells transfected with the human 5-HT₄ isoforms (Blondelet et al. 1997;

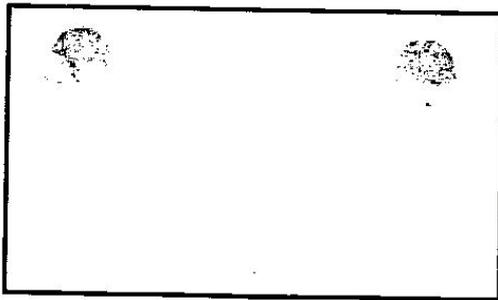


FIG. 4. Immunostaining of cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor by anti-G21V antibody. The cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor and mock-transfected cells (control cells) were blotted onto nitrocellulose membranes, 48 h after transfection. A sample of 2 × 10⁵ cells was applied to each well of the blot apparatus and was processed with specific polyclonal antibody anti-G21V. The transfected cells were applied to wells A1 and A3, and mock-transfected cells to wells B1, B2 and B3.

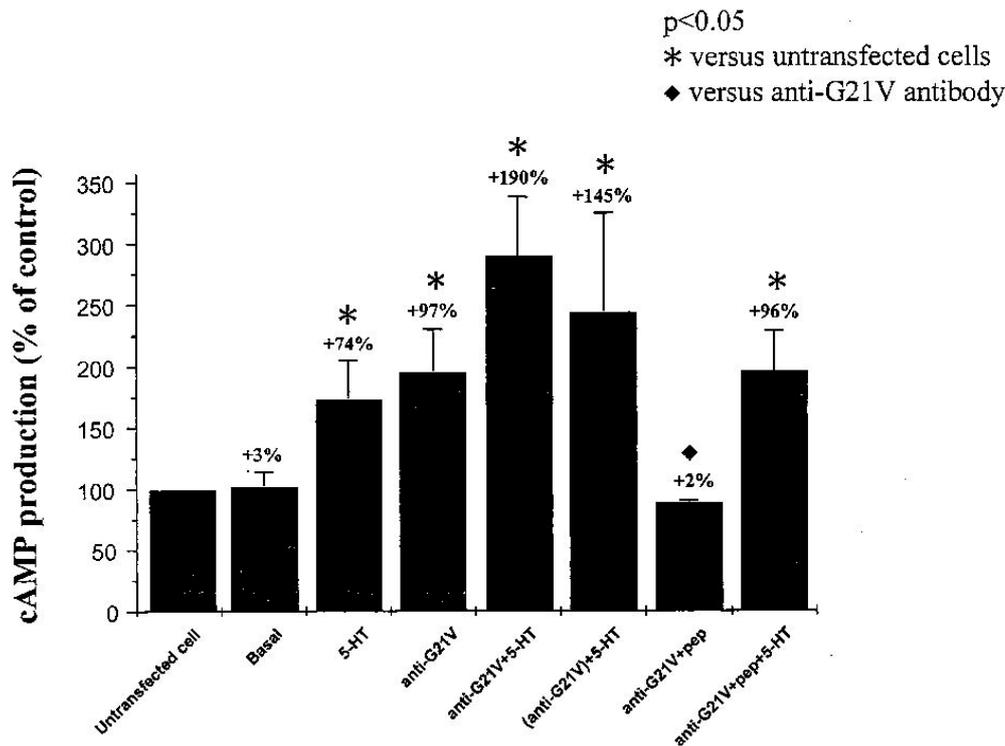


FIG. 5.

Van den Wyngaert et al. 1997; Blondel et al. 1998). These results confirm that COS-7 cells constitute a very efficient expression system to produce high amounts of the h5-HT_{4(e)} receptor isoform. The functional activity of the expressed receptor was assessed by the activation of adenylyl cyclase, as reflected in the extracellular cAMP content in the supernatants of treated cells. In COS-7 cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor, a slightly higher EC₅₀ value in induction of cAMP with 5-HT was obtained compared to other expression cell systems (Mialet et al. 2000a). The phenomenon of EC₅₀ variability is known to be dependent on the cellular environment (Mialet et al. 2000a). The cellular environment may also affect the constitutive activity of the receptor. Indeed, basal cAMP levels in COS-7 cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor were similar to mock-transfected cells, indicating the absence of constitutive activity of the receptor. However, stable expression of the h5-HT_{4(e)} receptor in a different cell line (CHO) leads to a constitutive activity (Mialet et al. 2000a) although the total amount of receptors is identical (347 vs. 375 fmol of receptor per mg of total protein in CHO and COS-7 cells, respectively). Altogether, these results indicate that coupling of the receptor to adenylyl cyclase via Gs proteins may be somewhat less efficient in COS-7 cells than in other cell types. However, expression of a functional receptor in relative

high amounts made the COS-7 transfected cells a good cellular system to study the immunological and functional properties of the anti-receptor antibodies.

Both the Spot assay and the FACS results confirmed that the anti-G21V peptide antibodies recognised the native conformation of the 5-HT_{4(e)} receptor isoform. The blocking activity of these antibodies on the human atrial receptor could thus be ascribed to recognition of an epitope existing on the native receptor. Paradoxically, the same antibodies induced an agonist-like effect on recombinant h5-HT_{4(e)} receptor expressed in COS-7 cells. Indeed, the blocking of activation of human atrial L-type Ca channels suggest that the antibodies inhibit the transduction pathway induced by 5-HT in these cells, while in the transfected COS-7 cells they activate the transduction pathway as reflected by cAMP accumulation. The latter property is however more in line with the involvement of the second extracellular loop as antigenic target for autoantibodies and antibodies, stimulating seven transmembrane-domain receptors and eliciting agonist-like responses as has been already demonstrated for many GPCR receptors such as β -adrenergic receptors (Fu et al. 1993; Lebesgue et al. 1998; Limas et al. 1989; Magnusson et al. 1990; Mijares et al. 1996a, 1996b, 2000; Wallukat et al. 1987), alpha-adrenergic receptors (Fu et al. 1994), angiotensin

receptors (Fu et al. 1998), bradykinin receptors (Abd Alla et al. 1996) and M2-muscarinic receptors (Elies et al. 1998; Fu et al. 1994; Nascimento et al. 2001).

The different behaviour of the recombinant h5-HT_{4(e)} receptor and the natural receptors towards the anti-G21V antibody could be due to various factors: 1) *the higher density of the receptors in COS-7 cells*. The packing of the receptors, the G-proteins and the effectors in the membrane could induce modifications in their functionality (Kenakin 1996). More and more evidence suggest that receptor activation is correlated with a dimerisation or an oligomerisation process which is of course regulated by the law of mass action. In human atrial cells, with extremely low amounts of expressed receptor, the equilibrium must be shifted towards the monomer conformation. In this case the anti-G21V antibody could not stabilise existing dimers, which is one of the activation mechanisms proposed for anti-GPCR antibodies (Mijares et al. 1996a). The higher density of receptors in COS-7 cells increases the probability of the existence of dimers and, consequently, the activation by dimer stabilisation; 2) *the cellular environment* is different in COS-7 cells and cardiomyocytes. As discussed above, the cellular environment may alter the functional properties of the h5-HT₄ receptor (Mialet et al. 2000a). In the rodent heart, the 5-HT₄ receptors are not coupled to the transduction pathway although the receptor is expressed (Ouaïd et al. 1992). Therefore, one can speculate that the functional activity of the receptor is of a different nature in human atrial and COS-7 cells; 3) *the length of C-terminal tail*. The h5-HT_{4(e)} receptor transfected in COS-7 cells is a C-terminal splice variant of the h5-HT₄ receptor (Claeysen et al. 1999; Mialet et al. 2000a). The opposite effects observed between transfected cells and human atrial cells could therefore be due to the different length of the cytoplasmic domain. This domain has been related to the coupling of the receptor with the G-protein. Since several splice variants of the 5-HT₄ receptor are expressed in human atrial cells, it could be that the anti-receptor antibodies exert their blocking effect on a different isoform than the (e) variant, provided that the corresponding protein is also expressed. 4) *A partial agonist effect of the antibody*. The antibody could also induce a partial agonist-like effect on the h5-HT₄ receptor. In low expression system (as atrial cells), the increase of cAMP production following the application of the antibody would not be sufficient to be measured. This could be interpreted as an antagonist-like effect of the antibody on cardiac cells. Whereas with a high expression system (as COS-7 cells), the level of cAMP will be increased enough to observe a difference with the cAMP basal amount.

The cAMP production observed during co- and pre-incubation experiments with saturating concentration of 5-HT and anti-G21V antibody was not significantly different from the cAMP amount observed during the application of 5-HT or anti-G21V antibody separately at the surface of cells expressing the 5-HT_{4(e)} receptor. These results indicate that the application of either 5-HT or antibody alone in saturating concentration induced a maximal cAMP production. The absence of cAMP

level increase upon the addition of the second molecule (antibody or 5-HT) suggested that the added ligand did not induce the recruitment and/or the activation of new G-proteins. The maximal coupling between the receptors and the G-proteins is obtained in presence of only one ligand in saturating conditions. Although the 5-HT and the antibody did not bind on the same region of the 5-HT₄ receptor, their effects are not additive.

In conclusion, our study has allowed to show that the second extracellular loop of the h5-HT_{4(e)} receptor was specifically recognized by antibodies inducing a functional activity. As specified in the literature, the second extracellular loop of GPCR receptors (such as β -adrenergic receptors) is one of the main targets of autoantibodies in several cardiovascular diseases (Hoebke 1995). In addition, this work showed that the effect of the antibodies is not only dependent on the epitopic region recognised but also on the molecular density and/or the cellular environment of the target receptors. Caution should thus be taken to infer from *in vitro* effects of anti-receptor autoantibodies and the *in vivo* pathophysiological consequences, which will be influenced by the cells or the organs expressing the target receptors. In the case of the 5-HT₄ receptor, which was shown to be a target of autoantibodies in mothers at risk to give birth to children with neonatal lupus (Eftekhari et al. 2000), the atrio-ventricular block observed in those children could be the consequence of blocking the receptor in fetal hearts or of a stimulating activity leading to dysfunction of the fetal heart. Finally, our results support the initially proposed hypothesis that the 5-HT₄ receptor could be a new target for autoantibodies in patients with atrial arrhythmia.

MATERIALS AND METHODS

cDNA Construction

The cDNA encoding the h5-HT_{4(e)} receptor was subcloned at the XbaI and HindIII cloning sites of the eucaryotic expression vector pCR/CMV as previously described (Mialet et al. 2000b).

Cell Culture and DNA Transfection

COS-7 cells were grown in 25-cm² flasks in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, France) supplemented with 2 mM glutamine, antibiotics (penicillin 100 IU/ml and streptomycin 0.1 mg/ml), and 10% foetal calf serum (Invitrogen, France) at 37°C in a humidified 5% CO₂ containing atmosphere. One day before transfection, COS-7 cells were seeded at a density of 4×10^5 cells per well in 6 well plates. Cells were transfected with 2 μ g of purified plasmid encoding the h5-HT_{4(e)} receptor by the DEAE-Dextran method in the presence of 0.1 mM chloroquine phosphate in DMEM with 10% heat-inactivated Nu-Serum (Coger, France). Radioligand binding assays, measurement of cAMP formation and immunological identification were done on COS-7 cells 48 h after

transfection. Cells transfected with the h5-HT_{4(e)} cDNA construct were compared with control mock-transfected cells.

Radioligand Binding and K_d Determination

Determination of [³H]GR113808 specific binding on transfected COS-7 cell were performed 48 h after transfection. After aspiration of the culture medium and washing, 4 × 10⁵ cells were incubated for 30 min at 37°C, with 0.1 nM of [³H]GR113808 {[1-[2-(methyl-sulfonylamino)ethyl]-4-piperidinyl]methyl-1-methyl-1H-indole-3-carboxylate} (specific activity 83 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech Europe, France) as tracer per well, alone or with an excess of unlabelled ML10375 (10 μM) [2-(*cis*-3,5-dimethylpiperidino)ethyl-4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoate] in a volume of 0.5 ml of PBS buffer (8.1 mM Na₂HPO₄, 1.9 mM NaH₂PO₄, 3.8 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂), with 0.05 % bovine serum albumin. The cells were collected with 1 M NaOH and placed overnight in 4 ml of Optiphase Hisafe 2 scintillation cocktail (EG&G Wallac, France). Radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (LKB Wallac, Rack beta). COS-7 cells transfected with the crude pCR/CMV plasmid were used as control. For the Scatchard analysis, incubation conditions were identical to that for ligand binding, except that eight different concentrations of [³H]GR113808, ranging from 0.01 to 2 nM, were used.

Adenylyl Cyclase Activity in Transfected COS-7 Cells

For measurement of cAMP formation, transiently transfected COS-7 cells were preincubated 48 h after transfection in the solution A consisting of Dulbecco's Modified Eagle's medium, 5 mM theophylline and 10 μM pargyline for 15 min at 37°C in 5% CO₂. In some experiments, 1 μM of 5-HT was added in the culture medium and incubated for up to 45 min at 37°C in 5% CO₂. In other experiments, increasing concentrations of 5-HT were introduced in the culture supernatants for 15 min at 37°C in 5% CO₂. Control mock-transfected cells and untransfected cells were also stimulated with 5-HT. cAMP levels were determined in the culture medium using a specific radioimmunoassay kit (Beckmann Coulter, France).

To study the effects of the anti-G21V antibody on the h5-HT₄ receptor activity, transfected cells were preincubated with the solution A as described above and were incubated with the anti-peptide antibody for additional 15 min at 37°C in 5% CO₂. Further experiments were performed incubating cells with either 10 μg/ml of anti-G21V antibodies in presence of 1 μM 5-HT, either 10 μg/ml anti-G21V antibody plus 1 μM 5-HT and 67 nM G21V peptide or 10 μg/ml anti-G21V antibody plus 67 nM G21V peptide. Addition of the peptide was used to block recognition of the receptor by the antibodies. In other experiments, cells were pretreated with the solution A containing 10 μg/ml anti-G21V antibody for 15 min at 37°C in 5% CO₂, and were subsequently incubated for another 15 min at 37°C in 5% CO₂ with 1 μM 5-HT. Control cells were stimulated as COS-7 cells expressing h5-HT_{4(e)} receptor.

Peptide Synthesis

Peptide G21V (G-I-I-D-L-I-E-K-R-K-F-N-Q-N-S-N-S-T-Y-C-V) corresponds to the second extracellular loop (residues 215-235) of the h5-HT₄ receptor. The peptide was synthesized in an automated peptide synthesizer using Fmoc technique. The homogeneity of the peptide was assessed by analytical HPLC and peptide identity checked by mass spectrometry.

Immunization and Antibody Purification

Two male New Zealand rabbits were immunized with peptide G21V (250 μg mixed with 3 mg methylated bovine serum albumin, Calbiochem-Novabiochem Corporation, CA). The first injections were given subcutaneously in complete Freund's adjuvant (v/v) and three booster injections at three week intervals were given in incomplete Freund's adjuvant. Serum was collected before immunization and one week after the last booster injection. The rabbit serum IgG was precipitated at 40% (NH₄)₂SO₄ saturation and re-dissolved in PBS buffer (pH = 7.4) at the starting volume.

The G21V peptide was coupled to activated EAH-Sepharose or to Thiol-Sepharose (Pharmacia Diagnostics AB, Sweden) according to standard procedures. Immunoglobulin G fractions were diluted 10 times with PBS buffer and centrifuged at 200 g for 15 min. They were then passed through the column at a flow of 6 ml/h for 3 h at 4°C. Finally the bound antibodies were eluted with 0.2 M glycine pH = 2.8 (3 ml), neutralized with 1 M Tris pH = 8 and immediately dialyzed against PBS buffer (6 l) overnight at 4°C. Purified IgG were stored at -20°C until use. Antibody concentration was determined by absorbance at 280 nm using an extinction coefficient of 1.4 for a solution of 1 mg/ml. Moreover, the immunochemical characterization of the affinity-purified anti-G21V antibodies was realized by an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) as described previously (Sallé et al. 2001).

Immunofluorescent Analysis

Transfected COS-7 cells expressing the h5-HT_{4(e)} receptor were collected by scraping and centrifuged at 2000 rpm for 10 min at room temperature. The pellet containing the cells was resuspended in PBS buffer. COS-7 cells were then seeded at a density of 4 × 10⁵ cells per well in microtiter plates (Nunc, Denmark). The 96 well plate was centrifuged at 2000 rpm for 10 min to replace the culture supernatant by 100 μl of PBS buffer containing 0.2 μg/ml of purified anti-G21V polyclonal antibody. After 30 min of incubation at 4°C without agitation, cells were washed twice with 100 μl of PBS by centrifugation at 2000 rpm for 10 min and 100 μl of a 1/160 dilution of affinity-purified goat anti-rabbit IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma, France) was added for 30 min at 4°C. The cells were washed three times with 100 μl of PBS buffer, fixed with 1% of paraformaldehyde and analyzed on a FACScan using the LYSIS program (Becton Dickinson). Control experiments were done on transfected cells using equivalent amounts of preimmune rabbit serum and on mock-transfected cells.

Spot Method

2×10^5 transfected cells were absorbed onto Hybond-C extra nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech Europe, France). The membranes were saturated in a 5% of low-fat milk solution in PBS for 2 h at 37°C. Next, they were sequentially incubated with the polyclonal anti-G21V antibody (10 µg/ml) for 1 h at 37°C, and goat anti-rabbit immunoglobulin conjugated to alkaline phosphatase (1/1000 dilution) (Sigma, France) for 1 h at 37°C. After washing, the colour was developed using BCIP/NBT substrate system (Sigma, France) and stopped by water. Control experiments were done on mock-transfected cells.

REFERENCES

- Abd Alla, S., Quitterer, U., Grigoriev, S., Maidhof, A., Haasemann, M., Jamagin, K., and Müller Esterl, W. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:13061–13067.
- Bach, T., Syversveen, T., Kvingedal, A. M., Krobert, K. A., Brattelid, T., Kaumann, A. J., and Levy, F. O. 2001. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 363:146–160.
- Blondel, O., Vandecasteele, G., Gastineau, M., Leclerc, S., Dahmoune, Y., Langlois, M., and Fischmeister, R. 1997. *Fehs. Lett.* 412:465–474.
- Blondel, O., Gastineau, M., Dahmoune, Y., Langlois, M., and Fischmeister, R. 1998a. *J. Neurochem.* 70:2252–2261.
- Blondel, O., Gastineau, M., Langlois, M., and Fischmeister, R. 1998b. *Br. J. Pharmacol.* 124:595–597.
- Bockaert, J., Fozard, J. R., Dumuis, A., and Clarke, D. E. 1992. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:141–145.
- Bockaert, J., and Pin, J. P. 1998. *CR Acad. Sci. III* 321:529–551.
- Claeyens, S., Sebben, M., Becamel, C., Bockaert, J., and Dumuis, A. 1999. *Mol. Pharmacol.* 55:910–920.
- Dzimir, N. 1999. *Pharmacol. Rev.* 51:465–501.
- Eftekhari, P., Sallé, L., Lezoualc'h, F., Mialet, J., Gastineau, M., Briand, J. P., Isenberg, D. A., Fournié, G., Argibay, J., Fischmeister, R., Muller, S., and Hoebeke, J. 2000. *Eur. J. Immunol.* 30:2782–2790.
- Elies, R., Fu, L. X., Eftekhari, P., Wallukat, G., Schulze, W., Granier, C., Hjalmarson, A., and Hoebeke, J. 1998. *Eur. J. Biochem.* 251:659–666.
- Frustaci, A., Chimentì, C., Bellocchi, F., Morganie, E., Russo, M. A., and Maseri, A. 1997. *Circulation* 96:1180–1184.
- Fu, L. X., Magnusson, Y., Bergh, C. H., Liljeqvist, J. A., Waagstein, F., Hjalmarson, A., and Hoebeke, J. 1993. *J. Clin. Invest.* 91:1964–1968.
- Fu, L. X., Wallukat, G., Hjalmarson, A., and Hoebeke, J. 1994. *Clin. Exp. Immunol.* 97:146–151.
- Fu, M. L., Gerd, W., Ake, H., and Hoebeke, J. 1994. *Receptors Channels* 2:121–130.
- Fu, M. L., Schulze, W., Wallukat, G., Elies, R., Eftekhari, P., Hjalmarson, A., and Hoebeke, J. 1998. *Receptors and Channels* 6:99–111.
- Grammer, J. B., Zeng, X., Bosch, R. F., and Kühlkamp, V. 2001. *Basic. Res. Cardiol.* 96:82–90.
- Grossman, C. J., Kilpatrick, G. J., and Bunce, K. T. 1993. *Br. J. Pharmacol.* 109:618–624.
- Hoebeke, J. 1995. *M&S* 11:1661–1667.
- Jahnel, U., Rupp, J., Ertl, R., and Nawrath, H. 1992. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 346:482–485.
- Kaumann, A. J. 1991. *J. Neural. Transm.* 34:195–201.
- Kaumann, A. J. 1993. *Br. J. Pharmacol.* 110:1172–1174.
- Kaumann, A. J. 1994. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:451–455.
- Kaumann, A. J., Sanders, L., Brown, A. M., Murray, K. J., and Brown, M. J. 1991. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 344:150–157.
- Kaumann, A. J., and Sanders, L. 1994. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 349:331–337.
- Kaumann, A. J., Lynham, J. A., and Brown, A. M. 1995. *Br. J. Pharmacol.* 115:933–936.
- Kaumann, A. J., Lynham, J. A., and Brown, A. M. 1996. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 353:592–595.
- Kenakin, T. 1996. *Pharmacol. Rev.* 48:413–463.
- Laer, S., Remmers, F., Scholz, H., Stein, B., Müller, F. U., and Neumann, J. 1998. *Br. J. Pharmacol.* 123:1182–1188.
- Lebesgue, D., Wallukat, G., Mijares, A., Granier, C., Argibay, J., and Hoebeke, J. 1998. *Eur. J. Pharmacol.* 348:123–133.
- Limas, C. J., Goldenberg, I. F., and Limas, C. 1989. *Cir. Res.* 64:97–103.
- Magnusson, Y., Marullo, S., Hoyer, S., Waagstein, F., Andersson, B., Vahlne, A., Guillet, J. G., Strosberg, A. D., Hjalmarson, A., and Hoebeke, J. 1990. *J. Clin. Invest.* 86:1658–1663.
- Magnusson, Y., Wallukat, G., Waagstein, F., Hjalmarson, A., and Hoebeke, J. 1994. *Circulation* 89:2760–2767.
- Mialet, J., Berque-Bestel, I., Eftekhari, P., Gastineau, M., Giner, M., Dahmoune, Y., Donzeau Gouge, P., Hoebeke, J., Langlois, M., Sicsic, S., Fischmeister, R., and Lezoualc'h, F. 2000a. *Br. J. Pharmacol.* 129:771–781.
- Mialet, J., Berque Bestel, I. P., Sicsic, S., Langlois, M., Fischmeister, R., and Lezoualc'h, F. 2000b. *Br. J. Pharmacol.* 131:827–835.
- Mijares, A., Lebesgue, D., Argibay, J., and Hoebeke, J. 1996a. *Fehs. Lett.* 399:188–191.
- Mijares, A., Verdout, L., Peineau, N., Vray, B., Hoebeke, J., and Argibay, J. 1996b. *Mol. Cell Biochem.* 163–164:107–112.
- Mijares, A., Lebesgue, D., Wallukat, G., and Hoebeke, J. 2000. *Mol. Pharmacol.* 58:373–379.
- Nascimento, J. H., Sallé, L., Hoebeke, J., Argibay, J., and Peineau, N. 2001. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281:C1251–1258.
- Ouadid, H., Seguin, J., Dumuis, A., Boackert, J., and Nargeot, J. 1992. *Mol. Pharmacol.* 41:346–351.
- Ouadid, H., Albat, B., and Nargeot, J. 1995. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25:282–291.
- Sallé, L., Eftekhari, P., Aupari, M., Cosnay, P., Hoebeke, J., and Argibay, J. 2001. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33:405–417.
- Sanders, L., and Kaumann, A. J. 1992. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 345:382–386.
- Schoemaker, R. G., Du, X. Y., Bax, W. A., Bos, E., and Saxena, P. R. 1993. *Eur. J. Pharmacol.* 230:103–105.
- Van den Wyngaert, I., Gommeren, W., Verhasselt, P., Jurzak, M., Leysen, J., Luyten, W., and Bender, E. 1997. *J. Neurochem.* 69:1810–1819.
- Wallukat, G., and Wollenberger, A. 1987. *Biomed. Biochim. Acta.* 46:S634–639.
- Wallukat, G., Kayser, A., and Wollenberger, A. 1995. *Eur. Heart J.* 16:85–88.

Annexe 2 : sous presse dans Receptors and Channels

Polyclonal antibody effects on the human cardiac 5-HT_{4(e)} receptors depend
upon the expression system

Emmanuella Di Scala¹, Stéphanie Rose¹, Olivier Héroult², Jorge Argibay¹, Pierre Cosnay¹ and
Véronique Bozon*

1 - UMR CNRS 6542, Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Faculté des
Sciences et Techniques, Université de Tours, France.

2 - INSERM ESPRI / UPRES-EA3249, Laboratoire d'Hématopoïèse, Service d'Hématologie,
Faculté de Médecine, Hôpital Bretonneau, CHRU, Tours, France

Running head : Antibody effects on human 5-HT_{4(e)} receptors

Author for correspondence (*): **Véronique Bozon**, UMR CNRS 6542, Physiologie des
Cellules Cardiaques et Vasculaires, Faculté des Sciences et Techniques, 37200 Tours, France.

Telephone : (33) 2 47 36 70 12. Fax : (33) 2 47 36 71 12.

e-mail : bozon@univ-tours.fr and veronique.bozon@univ-tours.fr

ABSTRACT

The initial objective of this work was to examine the effects of an antibody (anti-G21V) directed against the second extracellular loop of human heart 5-HT₄ receptors expressed in CHO cells. The antibody anti-G21V had no effect upon either basal cAMP or 5-HT evoked increases in cAMP in CHO cells whereas it had shown an *agonist-like* effect in COS-7 cells. Analysis of agonist fractions of h5-HT_{4(e)} receptors in CHO and COS-7 cells revealed that equilibrium constant could underlie the different responses of the receptor towards the anti-G21V antibody. Therefore, different expression systems could give rise to functional differences in 5-HT₄ receptor behaviour.

Keywords : agonist, antagonist, antibody, G-protein-coupled receptors, 5-HT₄ receptor, serotonin

INTRODUCTION

The effects of serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT) involves specific membrane receptors which belong to the seven transmembrane-spanning G-protein-coupled receptor family (GPCR) (Bockaert 1998). To date, 15 5-HT receptor subtypes have been described and grouped in four classes: 5-HT_{1/5}, 5-HT₂, 5-HT₃ and 5-HT_{4/6/7} (Saxena and Villalon. 1990). In the heart 5-HT₄ receptors are found in the atria where they are positively coupled to adenylate cyclase via G_S proteins (Kaumann et al. 1990, Ouadid et al. 1992, Sanders and Kaumann. 1992, Jahnel et al. 1992), activate cAMP-dependent protein kinase (PKA) and phosphorylate key proteins involved in cardiac excitation-contraction coupling.

Autoimmune antibodies directed against the second extracellular loop of β -adrenergic and M2 muscarinic receptors have diverse effects upon GPCR receptors in the heart (Borda et al. 1984, Fu et al. 1994, Goin et al. 1994, Mijares et al. 1996, Lebesgue et al. 1998, Michikado et al. 2001). An antibody (anti-G21V) directed against the second extracellular loop of the human cardiac 5-HT₄ receptor induced *agonist-like* effects on h5-HT_{4(e)} receptors when they were expressed in COS-7 cells (Bozon et al. 2002). We were then surprised to find that the same antibody (anti-G21V) show no effect upon the same h5-HT_{4(e)} receptor when this was expressed in CHO cells.

Our results indicate that the different behaviour of the recombinant h5-HT_{4(e)} receptor towards the anti-G21V antibody could be due to the cellular environment which was different in CHO and COS-7 cells. GPCR receptors exist in the membrane in equilibrium between two forms, R and R*, where R and R* are the inactive and the active forms of the receptor respectively. Our study indicates the possibility of variation in the agonist fractions (R, R*) of h5-HT₄ receptors expressed in different recombinant systems. This equilibrium could be a factor participating to the various h5-HT₄ receptor responses.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterisation of recombinant human 5-HT_{4(e)} receptor expressed in CHO cells

CHO cells which stably expressed the h5-HT_{4(e)} receptor showed basal cAMP levels under control conditions in the absence of an agonist that were 2.9 fold of those measured in untransfected CHO cells (not shown). This indicates that the receptors have a constitutive activity in the absence of any 5-HT₄ ligand (Mialet et al. 2000).

The h5-HT_{4(e)} receptor responded to increasing concentrations of 5-HT and induced cAMP synthesis with an apparent EC₅₀ value of 13 ± 7 nM (n = 4) and a maximum of cAMP production for 1 μ M of 5-HT (fig. 1A). The EC₅₀ value is similar to that recorded in other expression systems (Mialet et al. 2000, Bozon et al. 2002). Figure 1B (n = 5) shows that the h5-HT_{4(c),(e)} inverse agonist ML10375 (Blondel et al. 1998, Mialet et al. 2000) reduced basal and 5-HT evoked cAMP. Neither 5-HT or ML10375 had any effect upon cAMP in untransfected CHO cells. Maximal cAMP levels in CHO cells were determined with 10 μ M forskolin which increased cAMP by 1148 ± 290 % (fig. 1B).

These results show that the h5-HT_{4(e)} receptor expressed in this CHO cell line is effectively coupled to the adenylate cyclase. CHO cells are a good cellular system to study the properties of anti-receptor antibodies.

Effects of polyclonal anti-G21V antibodies on h5-HT_{4(e)} receptor activity expressed in CHO cells

Figure 1B shows that the anti-G21V antibody (104 ± 3 %) had no significant effect upon cAMP production in CHO cells which expressed the 5HT_{4(e)} receptor. The anti-G21V antibody was tested at 10 μ g/ml, which are more than saturating concentrations (Sallé et al. 2001). Untransfected CHO cells also showed no reaction to these antibodies.

Figure 2 shows that anti-G21V antibody had no effect upon cAMP production evoked by 5HT. Two experimental protocols were used : either cells were stimulated first with anti-G21V antibody and subsequently with 5-HT (Fig. 2A) or *vice versa* (Fig. 2B). Anti-G21V antibody alone had no significant effect upon the basal level of cAMP when it was applied for either 20 min ($115 \pm 12.5\%$, Fig. 2Bb) or 40 min ($116 \pm 3.7\%$, Fig. 2Aa). More no effect upon the increase in cAMP evoked by 5-HT when the antibody was applied before the agonist (Fig. 2Ac, $440 \pm 41\%$ *versus* $428 \pm 67\%$ for 5-HT alone Fig. 2Ab) or when the antibody was applied in the continuous presence of the agonist (Fig. 2Bc, $544 \pm 43\%$ *versus* $548 \pm 96\%$ for 5-HT alone Fig. 2Ba). We conclude that the anti-G21V antibody had no functional effect alone or in presence of 5-HT upon h5-HT_{4(e)} receptors expressed in CHO cells. This is a surprising result given that antibodies raised against the second extracellular loop of a number of cardiac muscle GPCRs have been shown to have direct effects either as agonists (Lebesgue et al. 1998, Mijares et al. 2000, Bozon et al. 2002) or antagonists (Sallé et al. 2001). In particular, the anti-G21V antibody has been shown to functionally antagonise the 5-HT₄ receptor in human atrial myocytes in presence of 5-HT (Sallé et al. 2001). We have tested the anti-G21V antibody at 100 µg/ml in the different conditions, no difference was found (anti-G21V alone : $83 \pm 13 \%$; anti-G21V before 5-HT : $384 \pm 40 \%$ and anti-G21V after 5-HT : $493 \pm 35 \%$ with n = 3).

In this study, the absence of any visible functional reaction between the anti-G21V antibody and the 5-HT₄ receptor found in Figures 1 and 2 could suggest that the antibody had not bound to the receptor. We therefore assayed CHO cells by flow cytometry. Figure 3 shows that the fluorescence intensity of CHO cells incubated with a suprasaturating concentration of anti-G21V antibodies (Fig. 3Aa and 3Bb) was higher than that of cells incubated with purified IgG (Fig. 3, Acontrol and Bcontrol). Similar results were observed in cells incubated with anti-G21V then 5-HT (Fig. 3Ac), and in cells incubated in 5-HT then

anti-G21V (Fig. 3Bc). Transfected cells incubated in 5-HT alone (Fig. 3Ab and 3Ba) yielded no significant specific immunofluorescence staining. It is clear that the polyclonal anti-G21V antibody specifically recognized the recombinant receptor and this in the presence or in the absence of 5-HT. More, the serotonin did not modify the binding of the anti-G21V antibody on the h5-HT_{4(e)} receptor. Therefore, the absence of a functional effect of the anti-G21V antibody on the h5-HT_{4(e)} receptor expressed in CHO cells was not due to the lack of specific binding of the antibodies.

Fractions of high affinity h5-HT_{4(e)} receptors differ in CHO and COS-7 expression systems

It is generally thought that G protein associated membrane receptors exist in the membrane in equilibrium between two forms, R and R* (Leff 1995, Fong 1996, Colquhoun 1998). R represents the inactive form of the receptor and this is usually considered to represent the largest fraction of the receptors in the membrane of a resting cell. R* represents the active form of the receptor which would be a minority in a resting cell. Agonists bind with great affinity to R* and they shift the equilibrium towards this form. Inverse agonists (Graeme and Richard. 1997, Daeffler and Landry. 2000) have a strong affinity for R and they shift the equilibrium towards this form of the receptor. An antagonist binds with the same affinity to the two forms R* and R. The ratio between R and R* forms of a GPCR is determined by the allosteric equilibrium constant J, which is defined as: $J = [R]/[R^*]$.

Scatchard analysis of [³H]5-HT binding in CHO (Fig. 4A) and COS-7 cells (Fig. 4B) identified high and low affinity binding sites. High affinity binding represented a Kd of 0.31 ± 0.03 nM and Bmax of 86 ± 3.7 fmol /mg protein in CHO cells (n = 3) and a Kd of 0.35 ± 0.17 nM and Bmax of 188 ± 44 fmol /mg protein in COS-7 cells (n = 3). The second

binding component had a lower apparent affinity with a Kd of 8.5 ± 3.8 nM and Bmax of 385 ± 21 fmol/mg protein in CHO and a Kd of 6.6 ± 3 nM and Bmax of 1052 ± 434 fmol/mg protein in COS-7 cells. High and low affinity 5-HT binding sites have also been identified in rat brain cells expressing the native 5-HT₄ receptor (Adham et al. 1996) and in HEK-293 cells transiently expressing the h5-HT_{4(a),(b)} receptors (Pindon et al. 2002).

The amount of antagonist [³H]GR113808 binding should represent R_{total} (R+R*). The Bmax for [³H]GR113808 was 347 fmol/mg in CHO cells (Mialet et al. 2000) and 375 fmol/mg in COS-7 cells (Bozon et al. 2002). The agonist fraction (Pindon et al. 2002) is determined by the fraction R*/R_{total} corresponding to the Bmax of high affinity [³H]5-HT divided by the Bmax of [³H]GR113808. The equilibrium constant J can be estimated by (R_{total} - R*)/R* corresponding to the Bmax of [³H]GR113808 minus the Bmax of high affinity [³H]5-HT divided by the Bmax of high affinity [³H]5-HT. From our data the agonist fraction is therefore 0.25 in CHO cells and 0.5 in COS-7 cells with an equilibrium constant of J = 3 and J = 1 respectively.

It is therefore clear that the R, R* equilibrium constant for the h5-HT₄ receptor depends on the expression system and not only upon the receptor isoform (Pindon et al. 2002). It may also depend on the type of tissue and/or the membrane environment (Claesen et al. 2000). This study also shows that the effects of the anti-G21V antibody directed against the second extracellular loop of a h5-HT₄ receptor (*agonist* (Bozon et al. 2002), *or* no effect (this study)) could be dependent on the equilibrium constant J.

MATERIELS AND METHODS

Cell culture

The chinese hamster ovary (CHO) cell line which stably expressed h5-HT_{4(e)} receptors (Mialet et al. 2000) was the gift of Dr. R. Fischmeister (Châtenay-Malabry, France). CHO cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in Ham F12 medium (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES, 1mg/ml neomycin, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin. For transduction assays the cells were harvested and seeded into 24-well plates with 1 x 10⁵ cells per well. Cells were then maintained for 24 hours in medium with or without the addition of FCS : this had no effect upon on the results.

Adenylate cyclase activity

CHO cells which expressed h5-HT_{4(e)} receptors were preincubated for 15 min in solution A which consisted of Ham F12 medium and 1 µM GR127935 the antagonist of endogenous 5-HT_{1(b)} receptors (Mialet et al. 2000). All experiments were conducted at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. 5-HT, the inverse agonist ML10375 (Mialet et al. 2000), the polyclonal anti-G21V antibody and the adenylate cyclase activator forskolin were added to the culture medium as required. Control experiments involved either, CHO cells which expressed the h5-HT_{4(e)} receptor preincubated in solution A and then incubated in culture medium alone for the duration of the respective experiment, or, replicating experiments upon untransfected CHO cells. cAMP accumulation in the culture supernatant was measured with a radioimmunoassay kit (Beckmann Coulter, Marseille, France)

Radiolabelled-ligand binding and Kd determination

The specific binding of [³H]5-HT to either CHO cells which stably expressed h5-HT_{4(e)} receptors or COS-7 cells which transiently expressed h5-HT_{4(e)} receptors (Bozon et al. 2002) was determined. After aspiration of the culture medium and washing, cells were incubated for 90 min at 25°C with 4 nM [³H]5-HT (specific activity 23.7 Ci/mmol) per well, either alone or with an excess of unlabelled GR113808 (30 µM) in 0.1 ml PBS buffer (8.1 mM Na₂HPO₄, 1.9 mM NaH₂PO₄, 3.8 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂) with 0.05% bovine serum albumin. The cells were collected with 1 N NaOH and placed for 20 min in 4 ml Optiphase Hifase 2 scintillation cocktail (EG&G Wallac, France). Radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (LKB Wallac, Rack beta). Untransfected CHO and COS-7 cells were used as control. For Scatchard analysis, incubation conditions were identical to those for ligand binding, except that 10 concentrations of [³H]5-HT ranging from 0.1 to 6 nM were used.

Flow cytometric analysis

CHO cells were collected by scraping and pelleted by centrifugation at 1000 rpm for 10 min at room temperature. 4 x 10⁵ cells were incubated with 100 µg/ml anti-G21V antibody or 1 µM 5-HT for 30 or 60 min at 4°C without agitation. In some experiments, cells were pretreated with 100 µg/ml anti-G21V antibody for 30 min at 4°C and were subsequently incubated for another 30 min at 4°C with 1 µM 5-HT and *vice versa*. Cells were then washed in PBS and incubated in 1 ml of a 1/160 dilution of affinity-purified goat anti-rabbit IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) for 30 min at 4°C. The cells were washed twice with PBS, and immediately analyzed on a FACScan[®] flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson, Santa Clara CA USA). The membrane expression of h5-HT_{4(e)}

receptor was analysed in FL1(H) on the gate of live cells. Control experiments were done with 100 µg/ml of rabbit purified IgG (control).

Materials

Peptide G21V, purified anti-G21V polyclonal antibodies and Fab fragments of anti-G21V antibodies were gracefully given by Dr J. Hoebeke, CNRS UPR 9021, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France. The CHO cell line stably expressing the h5-HT_{4(e)} receptor and the ligands GR127935 (N-[4-methoxy-3-(4-methyl-1-piperazinyl)phenyl]-2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)[1,1-biphenyl]-4-carboxamide) and ML10375 (2-[*cis*-3,5-dimethylpiperidino]ethyl 4-amino-5chloro-2methoxybenzoate) were nicely supplied by Dr R. Fischmeister, INSERM U-446, Laboratoire de Cardiologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France. FITC (fluorescein isothiocyanate), Forskolin (7beta-Acetoxy-1alpha,6beta,9alpha-trihydroxy-8,13-epoxy-labd-14-en-11-one) and 5-HT (5-hydroxytryptamine) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). GR113808 {[1-2-(methyl-sulfonylamino)ethyl]-4 piperidinyl]methyl-1-methyl-1H-indole-3 carboxylate} was from TOCRIS (Illkirch, France). [³H]5-HT (5-hydroxytryptamine creatinine sulfate) was purchased from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA). Other compounds were of reagent grade obtained from either Sigma or Life Technologies.

Statistical analysis

Data values are expressed as mean ± s. e. m. of results obtained from n experiments. Data were analysed with Student's t-test. Statistical significance was set at p < 0.05 (* in figures indicates p<0.05 compared with basal values).

REFERENCES

Adham, N., Gerald, C., Schechter, L., Vaysse, P., Weinshank, R., and Branchek, T. 1996. *Eur. J. Pharmacol.* 304 : 231-235.

Blondel, O., Gastineau, M., Langlois, M., and Fischmeister, R. 1998. *Br. J. Pharmacol.* 124 : 1-3.

Bockaert, J., and Pin, J. P. 1998. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 321 : 529-551.

Borda, E., Pascual, J., Cossio, P., De la Vega, M., Arana, R., and Sterin-Borda, L. 1984. *Clin. Exp. Immunol.* 57 : 679-86.

Bozon, V., Di Scala, E., Eftekhari, P., Hoebeke, J., Lezoualc'h, F., Fischmeister, R., and Argibay, J. 2002. *Receptors and channels.* 8 : 113-121.

Clayesen, S., Sebben, M., Becamel C., Eglen, R. M., Clark, R. D., Bockaert, J., and Dumuis, A. 2000. *Mol. Pharmacol.* 58 : 136-144.

Colquhoun, D. 1998. *Br. J. Pharmacol.* 125 : 923-947.

Daeffler, L., and Landry, Y. 2000. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 14 : 3-87.

Fong, T-M. 1996. *Cell. Signal.* 8 : 217-224.

Fu, M. L., Herlitz, H., Wallukat, G., Hilme, E., Hedner, T., Hoebeke, J., and Hjalmarson, A. 1994. *Lancet*. 344 : 1660-1663.

Goin, J. C., Borda, E., Leiros, C. P., Storino, R., and Sterin-Borda, L. 1994. *Auton. Nerv. Syst.* 47 : 45-52.

Graeme, M., and Richard, A.B. 1997. *Trend. Pharmacol. Sci.* 18 : 468-474.

Jahnel, U., Rupp, J., Ertl, R., and Nawrath, H. 1992. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 346 : 482-485.

Kaumann, A. J., Sanders, L., Brown, A. M., Murray, K. J., and Brown, M. J. 1990. *Br. J. Pharmacol.* 100 : 879-885.

Lebesgue, D., Wallukat, G., Mijares, A., Granier, C., Argibay, J., and Hoebeke, J. 1998. *Eur. J. Pharmacol.* 348 : 123-133.

Leff, P. 1995. *Trends. Pharmacol. Sci.* 16 : 89-97.

Mialet, J., Berque-Bestel, I., Eftekhari, P., Gastineau, M., Giner, M., Dahmoune, Y., Donzeau-Gouge, P., Hoebeke, J., Langlois, M., Siscic, S., Fischmeister, R., and Lezoualc'h, F. 2000. *J. Pharmacol.* 129 : 771-781.

Michikado, I., Tsutomu, Y., Akiyasu, B., Toshihisa, A., Mitamura, H., and Satoshi, O. 2001. *J. Am. Coll. Cardiol.* 37 : 418-424.

Mijares, A., Lebesgue, D., Argibay, J., and Hoebeke, J. 1996. *FEBS Lett.* 399 : 188-191.

Mijares, A., Lebesgue, D., Wallukat, G., Hoebeke, J. 2000. *Mol. Pharmacol.* 58 : 373-379.

Ouadid, H., Seguin, J., Dumuis, A., Bockaert, J., and Nargeot, J. 1992. *Mol. Pharmacol.* 41 : 346-351.

Pindon, A., Van Hecke, G., Van Gompel, P., Lesage, A. S., Leysen, J. E., Jurzak, M. 2002. *Mol. Pharmacol.* 61: 85-96.

Sallé, L., Eftekhari, P., Aupart, M., Cosnay, P., Hoebeke, J., and Argibay, J. 2001. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33 : 405-417.

Sanders, L., and Kaumann, A. J., 1992. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 345 : 382-386.

Saxena, P. R., Villalon, C. M. 1990. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15: s17-s34.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Functional behaviour of 5-HT_{4(e)} receptors in CHO cells.

A) Dose-response relation of cAMP production by 5-HT. Data is normalised to the maximal response (18.4 ± 3.2 pmol cAMP/well). The symbols and bars represent the mean \pm s.e.m. of data obtained in duplicate measurements in 5 different experiments. The line represents fitting of the data with a sigmoid equation with an EC₅₀ value of 13.4 ± 7 nM.

B) The effects of forskolin (Fk), an agonist (5-HT), an antagonist (ML10375) and the anti-G21V antibody. The amount of cAMP produced by each ligand is expressed relative that recorded in their absence (basal). Cells were stimulated for 15 min with either 10 μ M forskolin, 1 μ M 5-HT, 1 μ M ML10375, 1 μ M ML10375 with 1 μ M 5-HT (ML+5-HT), 10 μ g/ml anti-G21V antibody. Columns and bars represent mean \pm s.e.m. values of data obtained from duplicate determinations of cAMP in 5 different experiments. * : $p < 0.05$ compared with basal.

Figure 2 : The effects of anti-G21V antibody upon cAMP production evoked by 1 μ M 5-HT in CHO cells expressing the 5-HT_{4(e)} receptor. Basal cAMP production is expressed relative to that recorded in the absence of either 5-HT or anti-G21V antibody. Schematic representations of the experimental protocols are indicated inset above each graph. Control protocols (a and b) consisted of applying either anti-G21V antibody or 5-HT to CHO cells for 20 (b) or 40 (a) min. Experimental protocols are represented in c. A) Anti-G21V antibody was applied to CHO cells for 20 min prior to the addition of 5-HT for a further 20 min. B) 5-HT was applied to CHO cells for 20 min prior to the addition of anti-G21V antibody for a further 20 min. The columns and bars represent the mean \pm s.e.m. values of duplicate measurements in 5 different experiments. * $p < 0.05$ compared with basal.

Figure 3 : Analysis of specific binding of anti-G21V antibody to h5-HT_{4(e)} receptors by flow cytometry. Fluorescence intensity obtained in CHO cells incubated with anti-G21V antibody (Aa and Bb) is compared with that recorded in control experimental conditions (Control), and in the presence of either 5-HT alone (Ab and Ba), anti-G21V antibody then 5-HT (Ac) or 5-HT then anti-G21V antibody (Bc). Data are representative of 4 separate experiments.

Figure 4 : Scatchard analysis of [³H]5-HT binding. Ligand binding was performed on CHO (A) and COS-7 (B) cells expressing h5-HT_{4(e)} receptor. The Scatchard plots were derived from the mean of duplicate measurements of a single representative experiment. The line represents the fitting of the data to a linear regression equation. High affinity binding represented a K_d of 0.31 ± 0.03 nM and 0.35 ± 0.17 nM in CHO and COS-7 cells respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

We warmly acknowledge the skilful technical assistance of D. Gennetay and M. Pingaud. We also thank Dr I. Findlay for helpful comments on the text. This research was supported in part by Fondation pour la Recherche Médicale, la Fondation de France, le Conseil Général et Régional de la Région Centre (France) E. Di Scala is a scholar of Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Figure 1

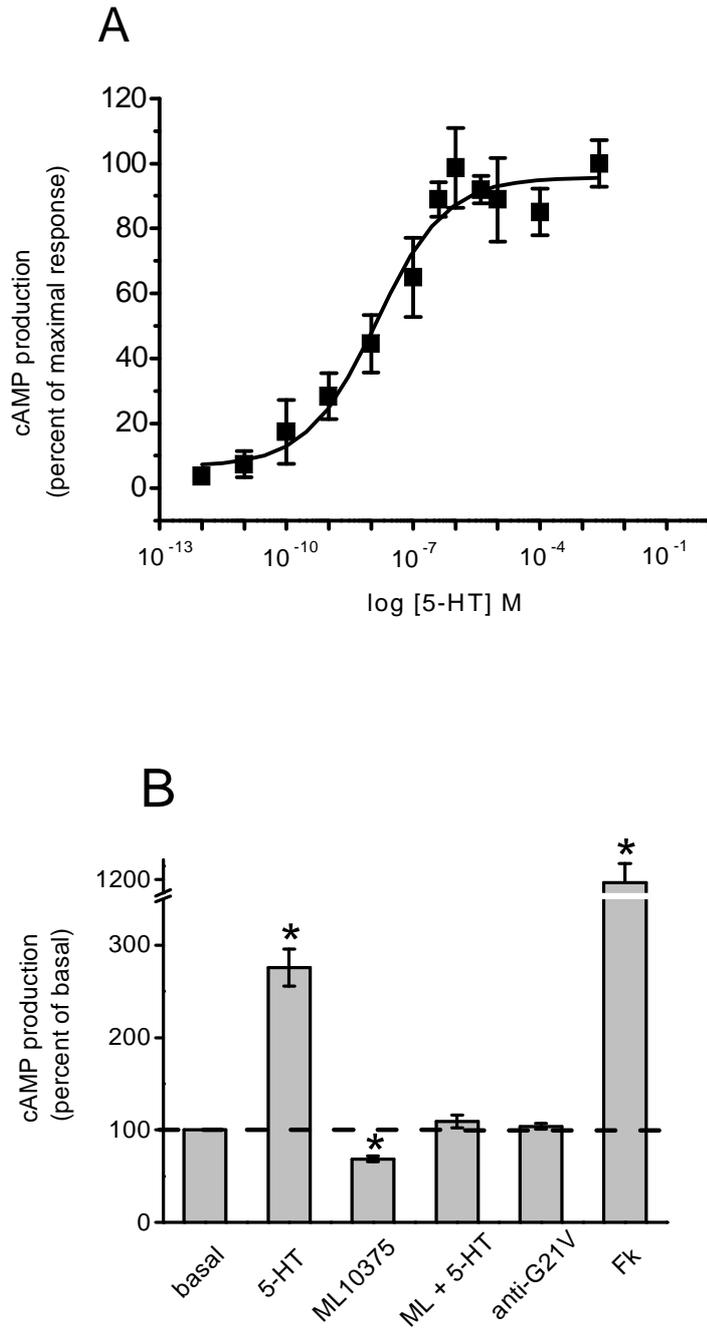


Figure 2

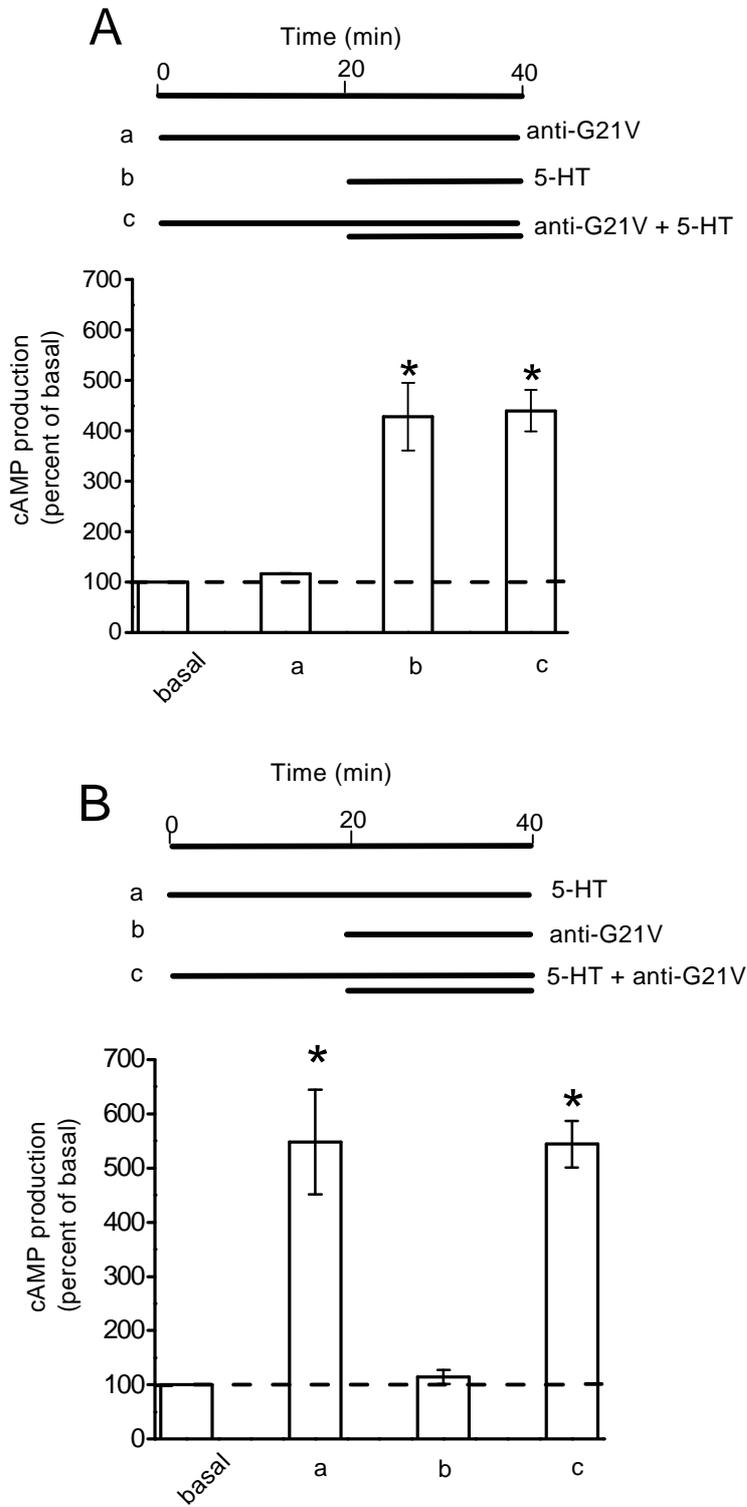


Figure 3

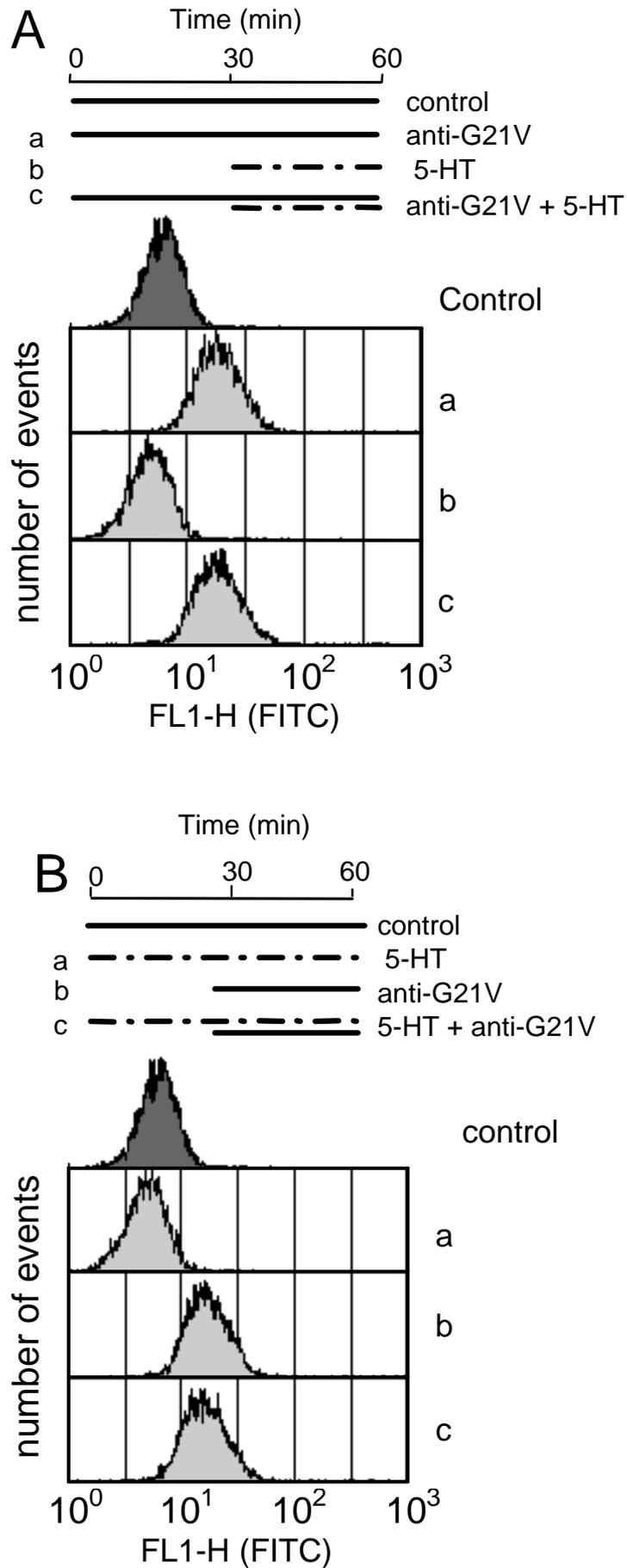
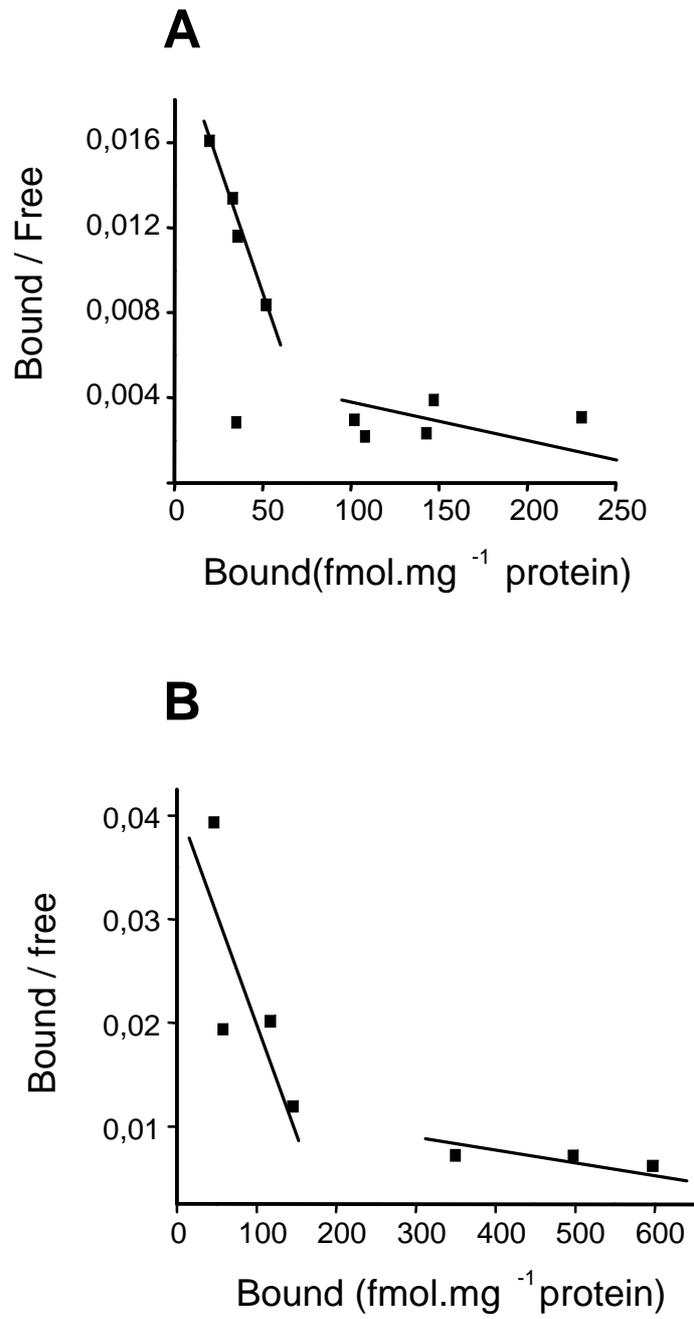


Figure 4



Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle, pharmacologique et immunologique du récepteur h5-HT₄ dans des myocytes atriaux humains

A-Présentation

Les expériences réalisées avec l'anticorps anti-G21V et le récepteur h5-HT_{4(e)} recombinant présentées dans la partie 1 ont été réitérées sur les cellules cardiaques natives. Des travaux antérieurs effectués au laboratoire ont permis de proposer que l'anticorps anti-G21V induisait un effet de type antagoniste ou agoniste inverse sur l'activité du récepteur 5-HT₄ cardiaque (Sallé et al., 2001). Ne possédant pas d'outils pharmacologiques capables de faire la distinction entre ces effets, les auteurs n'ont pas pu préciser plus leurs observations. Depuis, la substance ML10375, agoniste inverse des récepteurs 5-HT_{4(c),(e)} a été développée. Nous avons donc choisi de poursuivre l'étude des effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur 5-HT₄ cardiaque exprimé à la surface des myocytes atriaux humains. Deux paramètres ont été analysés en parallèle : le taux d'AMPc intracellulaire et l'intensité du courant calcique I_{Ca2+, L}.

B-Activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V dirigé contre le récepteur 5-HT₄. Mesure du taux d'AMPc intracellulaire

La figure 12 montre les effets de l'anticorps anti-G21V appliqué seul ou en présence de différentes substances tels que la 5-HT, l'isoprotérénol et la forskoline, sur l'activité du récepteur 5-HT₄.

L'application de 10 µg/ml d'anticorps seul n'induit pas de changement significatif du taux basal d'AMPc (112 ± 13 %). Cette réponse est identique à celle obtenue avec les IgG purifiées « contrôle » (figure 12).

Dans les expériences suivantes, l'anticorps anti-G21V a été incubé pendant 15 min à la surface des cellules atriales, puis 1 µM de 5-HT, d'isoprotérénol ou 10 µM de forskoline (figure 12) ont été ajoutés pendant 15 min supplémentaires. Les niveaux d'AMPc détectés ont été reportés dans le tableau I.

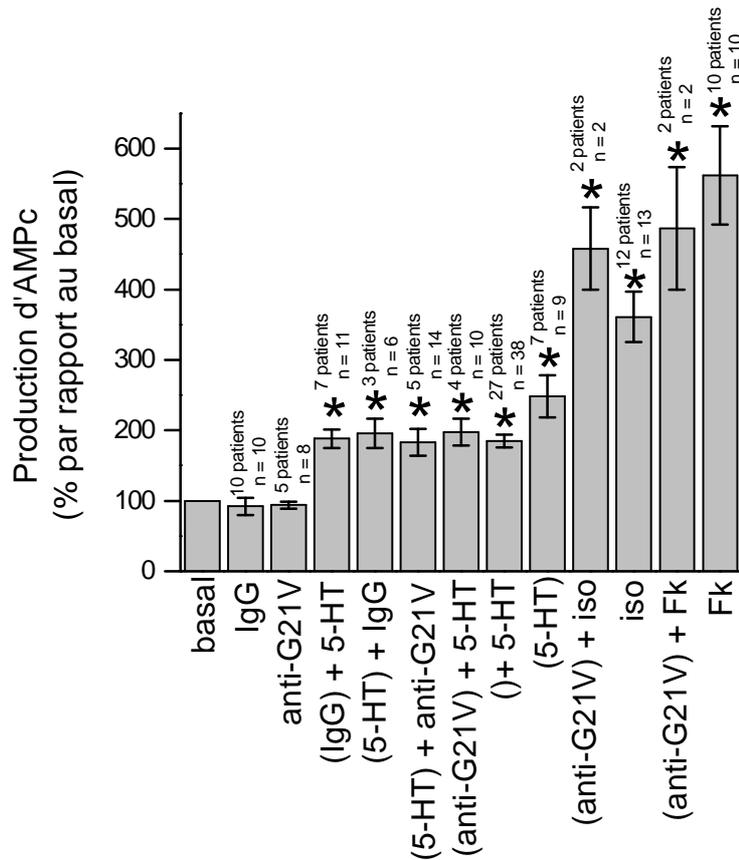


Figure 12 : Effet fonctionnel de l'anticorps polyclonal anti-G21V sur la production d'AMPc dans les myocytes atriaux humains

Incubation des cellules pendant 15 min avec 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V [anti-G21V] ou d'IgG purifiées contrôle [IgG]. Dans d'autres expériences, application sur les cellules pendant 15 min de l'anti-G21V ou des IgG contrôle (10 µg/ml) plus 1 µM 5-HT [(anti-G21V) + 5-HT ; (IgG) + 5-HT] et *vice versa* [(5-HT) + anti-G21V ; (5-HT) + IgG], ou d'isoprotérénol [(anti-G21V + Iso)]. Le point contrôle positif est constitué par l'incubation de l'anti-G21V suivie de la forskoline [(anti-G21V) + Fk]. Trois autres points ont été réalisés : 5-HT appliquée pendant 15min [(5-HT) + anti-G21V] et 30 min [(5-HT) + anti-G21V] ; isoprotérénol et forskoline pendant 15 min [Iso] et [Fk]. Résultats normalisés par rapport au niveau basal. Valeurs correspondent à la moyenne ± s.e.m. d'expériences indépendantes. * : p<0,05 en comparaison avec le basal.

Expérience	1	2	3	4	5	6	7	8
Ligands	(antiG21V) + 5-HT	(5-HT)	(5-HT) + antiG21V	(5-HT)	(antiG21V) + Iso	Iso	(antiG21V) + Fk	Fk
Taux d'AMPc (%)	183± 19	185± 9	198± 19	248± 30	458± 58	361± 63	487± 87	562± 70

Tableau I : Récapitulatif des productions d'AMPc par rapport au niveau basal en % en fonction de la dose d'anticorps anti-G21V et de 5-HT, d'isoprotérénol (Iso) ou de forskoline (Fk) appliquées sur les myocytes humains. 2, 4, 6 et 8 sont des contrôles respectifs des expériences 1, 3, 5 et 7.

Les résultats indiquent que l'anti-G21V ajouté avant (1) ou après (3) la 5-HT, n'inhibe pas l'action de ce ligand (2 et 4). De plus, les réponses liées à une stimulation β -adrénergique (6) ou à une activation de l'adénylate cyclase (8) ne sont pas modifiées par cet anticorps (5 et 7). L'anticorps anti-récepteur 5-HT₄ n'interagit donc pas avec ces protéines de manière non spécifique.

Quelque soit les conditions expérimentales réalisées, l'anticorps anti-G21V ne modifie pas le taux d'AMPc intracellulaire produit dans les myocytes atriaux humains. Ces observations sont contradictoires avec les effets présentés sur le courant calcique de type L (Sallé et al., 2001). Cette absence d'activité n'est pas liée à un manque de fixation de l'anticorps sur le récepteur 5-HT₄. En effet, ce récepteur a été reconnu spécifiquement par cette immunoglobuline en dot Blot dans des conditions natives (figure 13).

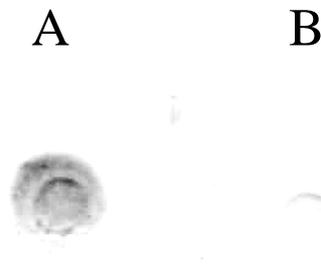


Figure 13 : Identification du récepteur 5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains réalisée en condition native (dot-Blot)

Membrane de nitrocellulose incubée avec 10 μ g/ml d'anticorps anti-G21V (A) et d'IgG contrôle (B)

Cette absence de réponse ne provient pas non plus de la technique de mesure utilisée. En effet, nous avons montré grâce à un antagoniste spécifique du récepteur 5-HT₄, le ML10375, qu'une diminution du taux d'AMPc produit suite à une stimulation sérotoninergique était détectable. Nous avons vérifié parallèlement que l'activation d'une protéine G_i était également quantifiable. Les cellules atriales incubées avec 10 μ M de carbachol (antagoniste des récepteurs muscariniques) en présence de 5-HT (1 μ M) présentaient un taux d'AMPc de 94 ± 15 % (n = 3) par rapport à 185 ± 9 % avec la 5-HT seule.

L'anticorps anti-G21V semblerait donc induire des effets fonctionnels différents suivant les paramètres mesurés. En effet, si nous nous intéressons à une réponse cellulaire globale de la cellule tel que le taux d'AMPc intracellulaire, aucun changement ne sera détectable en présence de l'anticorps. Si nous mesurons par contre l'activité d'un effecteur comme le canal calcique de type L, l'amplitude du courant développé sera diminuée par l'anti-G21V.

C-Etude fonctionnelle du récepteur 5-HT₄

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis le 20/05/04 à *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* : Di Scala E., Findlay I., Rose S., Aupart M., Argibay J., Cosnay P. & Bozon V. " High efficiency activation of L-type Ca²⁺ current by 5-HT in human atrial myocytes " (annexe 3).

Afin de caractériser le récepteur h5-HT₄ cardiaque, les cellules atriales ont été incubées en présence de différentes substances pharmacologiques, la 5-HT, l'isoprotérénol et la forskoline.

1-Mesure du taux d'AMPC intracellulaire

La figure 14 indique que les doses de 5-HT utilisées, exceptée celle à 20 nM, induisent une augmentation du taux basal d'AMPC. Nous pouvons remarquer que cette production de second messager est similaire pour les doses de 5-HT 100 nM et 1 µM. Ces variations sont cependant toujours inférieures à celle induite avec la forskoline (10 µM). Les valeurs expérimentales sont récapitulées dans le Tableau II.

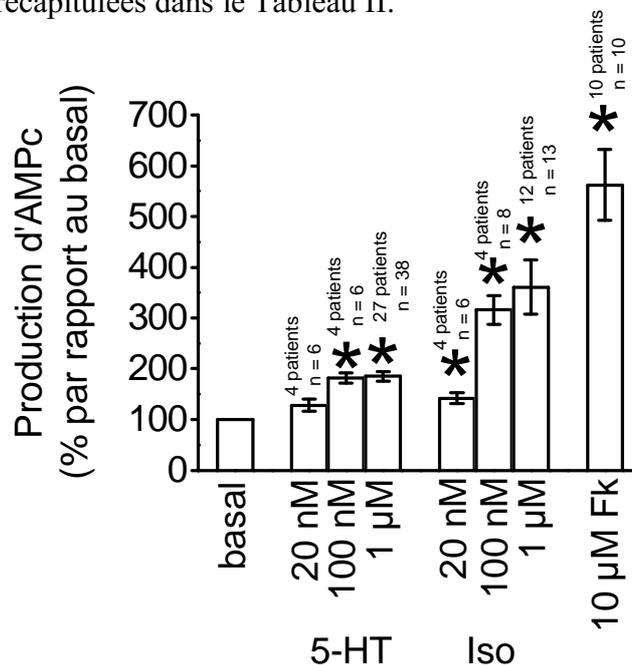


Figure 14 : Etude fonctionnelle des récepteurs 5-HT₄ et β-adrénergiques : mesure du taux d'AMPC

Les cellules sont incubées (15 min) avec 20 nM, 100 nM et 1µM de 5-HT ou d'isoprotérénol (Iso) ou encore avec 10 µM de forskoline (Fk). Résultats normalisés par rapport au niveau basal. La moyenne ± s.e.m. des valeurs correspond à des expériences indépendantes. * : p<0,05 en comparaison au niveau basal.

Ligand	Dose	Taux d'AMPc (%)	Effets observés
5-HT	20 nM	128 ± 12	Taux basal
	100 nM	182 ± 10	[AMPc] ↑↑
	1 µM	185 ± 9	[AMPc] ↑↑
Iso	20 nM	142 ± 11	[AMPc] ↑
	100 nM	316 ± 28	[AMPc] ↑↑
	1 µM	361 ± 63	[AMPc] ↑↑
Fk	10 µM	562 ± 70	[AMPc] ↑↑↑

Tableau II : Récapitulatif des effets observés sur la production basale d'AMPc (en %) en fonction de la dose de 5-HT, d'isoprotérénol (Iso) ou de forskoline (Fk) appliquée sur les myocytes humains.

2-Mesure du courant calcique $I_{Ca^{2+},L}$

Les figures 15A et 15C montrent l'amplitude du courant calcique $I_{Ca^{2+},L}$ en présence d'une stimulation sérotoninergique. Seule la dose de 5-HT 1 µM induit une augmentation de l'amplitude du courant calcique. De plus, ce courant atteint une intensité maximale identique à celle obtenue en présence de forskoline (10 µM). Les valeurs expérimentales sont présentées dans le Tableau III.

Ligand	Dose	Amplitude d'$I_{Ca^{2+},L}$ (%)	Effets observés
5-HT	20 nM	110 ± 10	courant basal
	100 nM	139 ± 30	courant basal
	1 µM	164 ± 12	courant↑
Iso	20 nM	67 ± 14	Taux basal
	100 nM	183 ± 4	courant↑
	1 µM	196 ± 13	courant↑
Fk	10 µM	170 ± 15	courant↑

Tableau III : Récapitulatif des effets observés sur l'activité du courant $I_{Ca^{2+},L}$ exprimés en % en fonction de la dose de 5-HT, d'isoprotérénol (Iso) ou de forskoline (Fk) appliquée sur les myocytes humains.

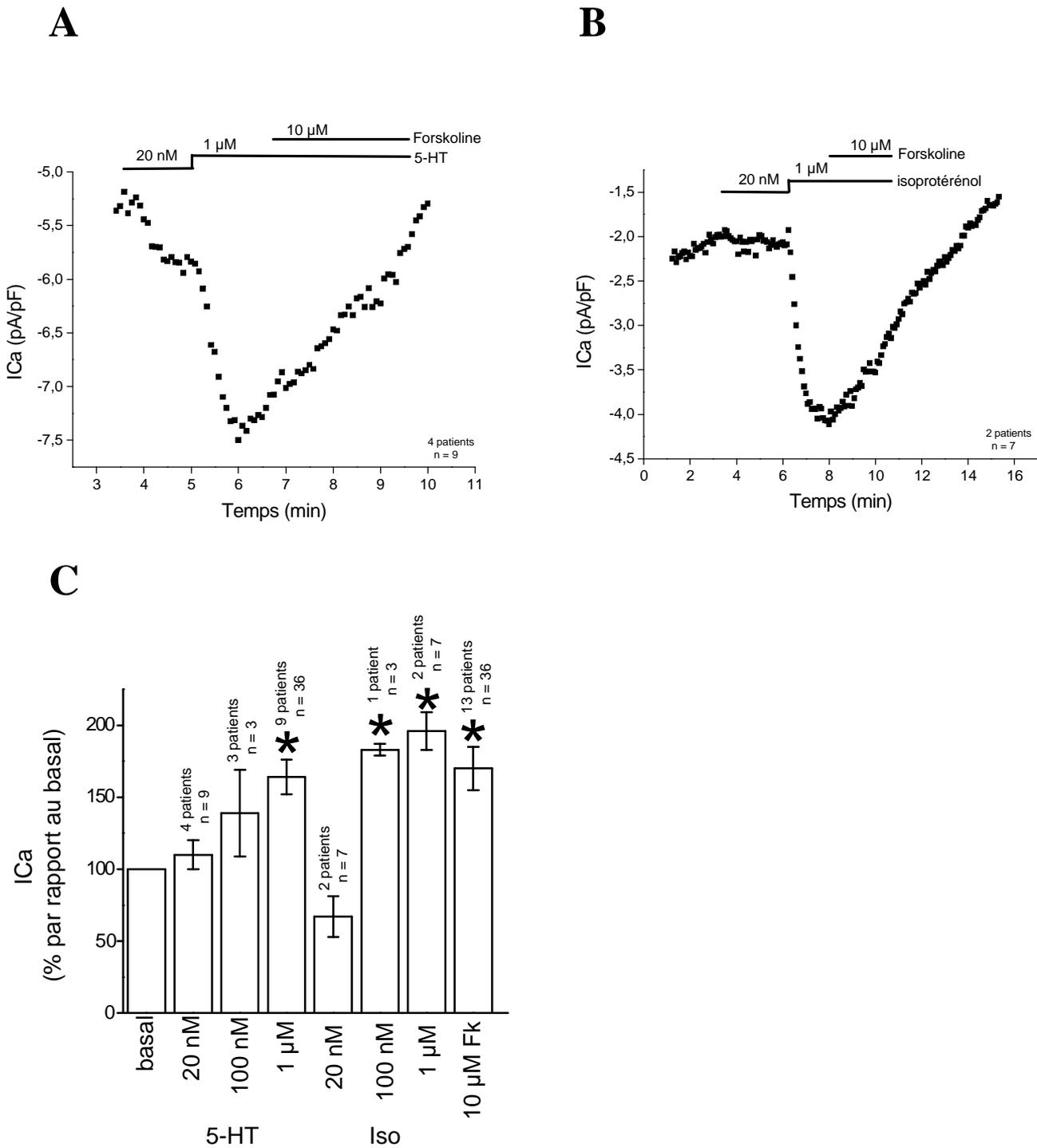


Figure 15 : Etude fonctionnelle des récepteurs 5-HT₄ et β -adrénergiques : mesure du courant calcique

Les valeurs d'amplitude du courant $I_{Ca^{2+}, L}$ mesurée en présence de 20 nM, 100 nM et 1 μ M de 5-HT ou d'isoprotérénol suivie de l'addition de 10 μ M forskoline sont présentées sur l'histogramme C. Les tracés A et B sont des courbes représentatives du protocole expérimental réalisé en présence de 5-HT (A) ou d'isoprotérénol (B). Résultats normalisés par rapport au niveau basal. La moyenne \pm s.e.m. des valeurs correspond à des expériences indépendantes. * : $p < 0,05$ en comparaison au niveau basal.

Pour la dose de 5-HT 100 nM, une grande variabilité des résultats a été observée. Cependant, les données laissent penser qu'avec un plus grand nombre d'essais, la dose de 5-HT 100 nM pourrait également induire une augmentation maximale de l'amplitude du courant calcique de façon similaire aux incubations réalisées avec 1 μ M de 5-HT et 10 μ M de forskoline.

L'activité du récepteur h5-HT₄ au niveau des cellules atriales semble donc dépendre du paramètre mesuré. Ces différences pourraient correspondre soit à des caractéristiques fonctionnelles spécifiques du récepteur h5-HT₄, soit à des propriétés générales des récepteurs RCPG cardiaques.

D-Comparaison des propriétés fonctionnelles des récepteurs cardiaques 5-HT₄ et β -adrénergiques

Pour pouvoir mieux comprendre les différences observées entre les réponses globales (AMPc intracellulaire) et les réponses locales (courant $I_{Ca^{2+}, L}$) de la cellule, nous avons étudié l'activité fonctionnelle des récepteurs β -adrénergiques cardiaques en suivant les mêmes protocoles expérimentaux que pour le récepteur h5-HT₄.

1-Mesure du taux d'AMPc intracellulaire

La figure 14 montre l'évolution du niveau d'AMPc intracellulaire en présence de différentes concentrations d'isoprotérénol. Toutes les doses testées induisent une augmentation du taux basal d'AMPc. Ces variations de second messenger sont semblables pour les doses 100 nM et 1 μ M d'isoprotérénol. De plus, elles sont toujours inférieures à celle induite par la forskoline (10 μ M), comme observé avec le récepteur h5-HT₄. Les valeurs expérimentales sont récapitulées dans le Tableau II.

2-Mesure du courant calcique $I_{Ca^{2+}, L}$

Les effets de l'isoprotérénol sur l'amplitude du courant calcique sont présentés sur les figures 15B et 15C et les données numériques sont indiquées dans le Tableau III. Comme pour les applications de 5-HT, les doses d'isoprotérénol 100 nM et 1 μ M augmentent de façon maximale l'intensité du courant calcique. De plus, ces réponses sont similaires à celles obtenues en présence de forskoline (10 μ M).

Cette étude montre que pour les mêmes doses de ligand, les cellules atriales humaines produisent un taux d'AMPc intracellulaire plus faible avec une stimulation sérotoninergique

qu'avec une stimulation β -adrénergique. Cependant, ces récepteurs ont une action similaire sur le courant calcique $I_{Ca^{2+}, L}$. Une activité maximale du canal est observée avec les concentrations 100 nM et 1 μ M de chaque ligand, ainsi qu'avec 10 μ M de forskoline.

E- Action conjointe des récepteurs cardiaques sur l'activité du courant $I_{Ca^{2+}, L}$

La figure 16 présente l'action simultanée de différentes concentrations de 5-HT et d'isoprotérénol sur l'amplitude du courant calcique $I_{Ca^{2+}, L}$. Ces substances sont ajoutées graduellement à la surface des cellules atriales.

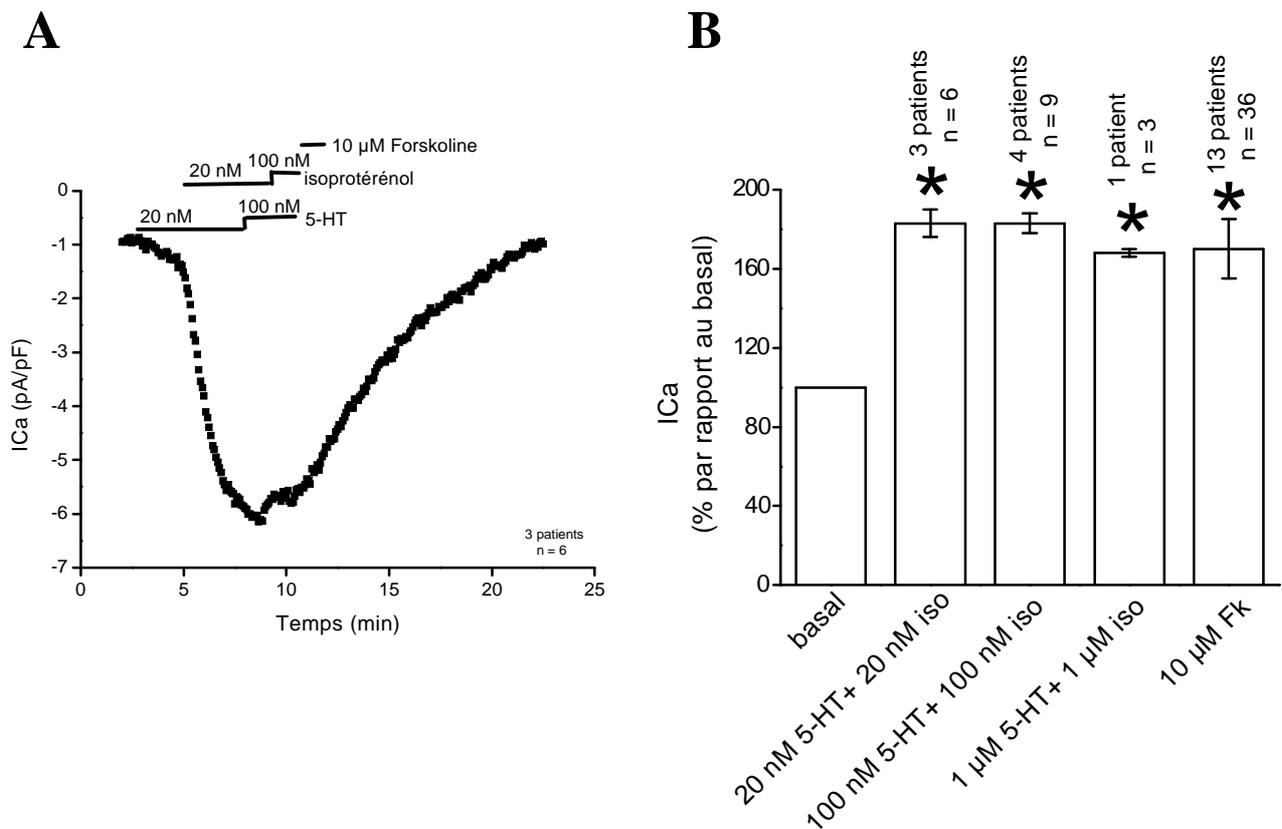


Figure 16 : Action fonctionnelle conjointe des récepteurs 5-HT₄ et β -adrénergiques : mesure du courant calcique

Les valeurs d'amplitude du courant $I_{Ca^{2+}, L}$ mesurée en présence de 20 nM, 100 nM et 1 μ M de 5-HT suivie de l'addition des mêmes concentrations d'isoprotérénol, puis de 10 μ M forskoline sont présentées sur l'historgramme B. Le tracé en A est une courbe représentative du protocole expérimental réalisé en présence de 5-HT et d'isoprotérénol. Résultats normalisés par rapport au niveau basal. La moyenne \pm s.e.m. des valeurs correspond à des expériences indépendantes. * : p < 0,05 en comparaison au niveau basal.

L'incubation avec 20 nM de 5-HT plus 20 nM d'isoprotérénol induit une augmentation maximale du courant calcique (figure 16B). Ce résultat est extrêmement surprenant car à cette dose, la 5-HT et l'isoprotérénol seuls sont incapables d'activer le canal à un tel niveau (figure 15C). Les réponses induites par chaque ligand sont amplifiées lorsque ces substances sont incubées ensemble. L'effet cumulatif observé provoque systématiquement une augmentation maximale de l'intensité du courant. Nous ne visualisons pas d'élévation progressive.

Les expériences réalisées avec 100 nM 5-HT plus 100 nM Iso et 1 μ M de 5-HT plus 1 μ M d'Iso, nous ont permis de vérifier que les effets induits par une stimulation β -adrénergique maximale ne s'additionnaient pas à ceux obtenus avec une stimulation sérotoninergique également maximale (figure 16). Les systèmes de transduction des signaux via les récepteurs et les adénylates cyclases semblent être saturés.

En conclusion, les résultats obtenus dans les chapitres C, D et E montrent que les récepteurs h5-HT₄ et β -adrénergiques cardiaques ne présentent pas le même comportement. La production d'AMPc est plus faible avec une stimulation sérotoninergique par rapport à une stimulation β -adrénergique. Cette observation est corrélée avec une expression plus faible du récepteur h5-HT₄ à la surface des cellules atriales. Cependant, ces deux récepteurs agissent de façon similaire sur l'amplitude du courant $I_{Ca^{2+},L}$. Ces données suggèrent donc une action ciblée du récepteur h5-HT₄ sur le canal calcique de type L. De plus, les voies sérotoninergiques et β -adrénergiques semblent interagir entre elles et semblent moduler conjointement l'activité du courant $I_{Ca^{2+},L}$.

F-Caractérisation pharmacologique

Les figures 17A et 17B montrent les réponses cellulaires des myocytes atriaux suite à l'application de différentes substances : la 5-HT, le ML10375 et le GR113808 à une concentration de 1 μ M.

1-Mesure du taux d'AMPc intracellulaire

Le ML10375 peut bloquer totalement ou partiellement l'action agoniste de la 5-HT (figure 17A). En effet, suivant le moment d'application de cette substance sur le récepteur 5-HT₄, le taux d'AMPc intracellulaire mesuré varie suivant des proportions différentes. L'application du ML10375 avant la 5-HT provoque une inhibition totale de la réponse sérotoninergique ($93 \pm 6\%$ versus $185 \pm 9\%$ avec la 5-HT seule). Alors que dans les

conditions inverses, l'application de ML10375 inhibe partiellement l'action de la 5-HT ($138 \pm 13 \%$ versus $185 \pm 9 \%$).

Le GR113808 appliqué avant ou après la 5-HT diminue significativement la production d'AMPC induite par une stimulation sérotoninergique. Les valeurs mesurées sont respectivement ($65 \pm 6 \%$) et ($95 \pm 19 \%$).

2-Mesure du courant calcique $I_{Ca^{2+},L}$

La figure 17B montre l'effet du ML10375 sur l'amplitude du courant $I_{Ca^{2+},L}$ en présence ou en absence de 5-HT (1 μ M) et de forskoline (10 μ M).

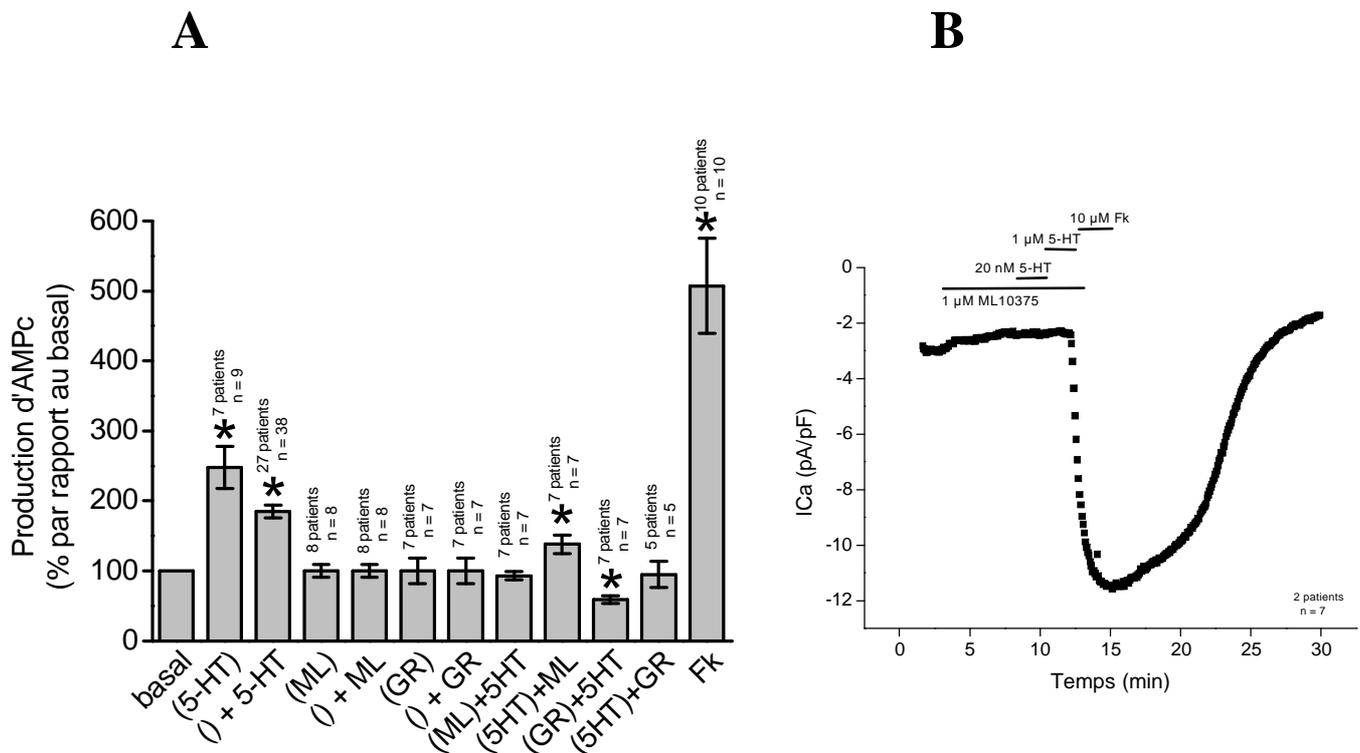


Figure 17 : Caractéristiques pharmacologiques du récepteur h5-HT₄

A. Mesure du taux d'AMPC intracellulaire

Les cellules sont incubées avec 1 μ M de deux substances spécifiques du récepteur 5-HT₄, le ML10375 et le GR 113808 (15 min) plus 1 μ M de 5-HT (15 min) et *vice versa*. Les contrôles respectifs sont établis avec chaque ligand appliqué seul sur les cellules (15 ou 30 min). Résultats normalisés par rapport au niveau basal. Valeurs correspondant à des expériences indépendantes. * : $p < 0,05$ en comparaison au niveau basal.

B. Mesure du courant calcique

L'amplitude du courant du $I_{Ca^{2+},L}$ est mesurée en présence de 1 μ M de ML10375 suivie de l'addition de 20 nM puis 1 μ M 5-HT et enfin 10 μ M forskoline (Fk). Courbe représentative.

Le ML10375 seul ne modifie pas l'amplitude du courant basal $I_{Ca^{2+},L}$ normalisé à 100 % ($79 \pm 10 \%$). Toutefois, il inhibe le courant induit par l'application de 5-HT ($75 \pm$

11 % *versus* 164 ± 12 % avec la 5-HT seule). De plus, cette substance n'agit pas sur l'activité des adénylates cyclases. En effet, la forskoline induit une augmentation similaire de l'intensité du courant calcique après ou sans application de ML10375 (216 ± 40 % *versus* 170 ± 15 % avec la forskoline seule). Pau et al., 2003 ont montré que la substance GR113808 module également le courant calcique $I_{Ca^{2+},L}$ à la surface des cellules atriales humaines, de façon similaire au ML10375.

L'ensemble de ces données indiquent que le ML10375 et le GR113808 sont deux antagonistes spécifiques du récepteur h5-HT₄ exprimé à la surface des myocytes atriaux humains. Leur activité fonctionnelle semble varier en fonction du tissu analysé et des isoformes du récepteur h5-HT₄ exprimé. En effet, le ML10375 et le GR113808 sont des antagonistes des isoformes (a) (Claeyssen et al., 2000 ; Ponimaskin et al., 2002) et (b) du récepteur 5-HT₄ (Bach et al., 2001), et des agonistes inverses pour l'isoformes (e) (Mialet et al., 2000b). Le ML10375 est également un agoniste inverse de l'isoforme (c) de ce récepteur (Blondel et al., 1998b).

Actuellement, aucune donnée indique la ou les isoformes du récepteur 5-HT₄ impliquées dans la stimulation sérotoninergique des cellules cardiaques. Les effets antagonistes du GR113808 et du ML10375 observés sur le récepteur 5-HT₄ cardiaque natif et sur les récepteurs recombinants 5-HT_{4(a),(b)} (Claeyssen et al., 2000; Bach et al., 2001) suggèrent que les isoformes (a) et (b) de ce récepteur pourraient être majoritairement impliquées dans l'activité fonctionnelle du récepteur h5-HT₄ au sein des cellules atriales humaines.

G-Relation entre l'intensité de la stimulation sérotoninergique et le traitement des patients avec des beta-bloqueurs

Il a été montré dans la littérature, que suite à une stimulation sérotoninergique, la force de contraction développée par des lambeaux d'oreillettes provenant de patients traités avec des β -bloqueurs était augmentée (Sanders et al., 1995). L'amplitude du courant calcique de type L est également amplifiée dans ces conditions expérimentales (Pau et al., 2003). Nous avons donc séparé nos données en fonction de l'origine des cellules atriales isolées. Les résultats sont présentés dans la figure 18 et les valeurs numériques sont détaillées dans le tableau IV.

Suite à une stimulation sérotoninergique, la production d'AMPC chez des patients traités avec des beta-bloqueurs est similaire à celle mesurée chez des patients non traités. La même observation a été faite avec le courant $I_{Ca^{2+},L}$. Suivant nos paramètres mesurés, le

traitement des patients avec des beta-bloqueurs ne semble pas modifier la réponse sérotoninergique des cellules atriales.

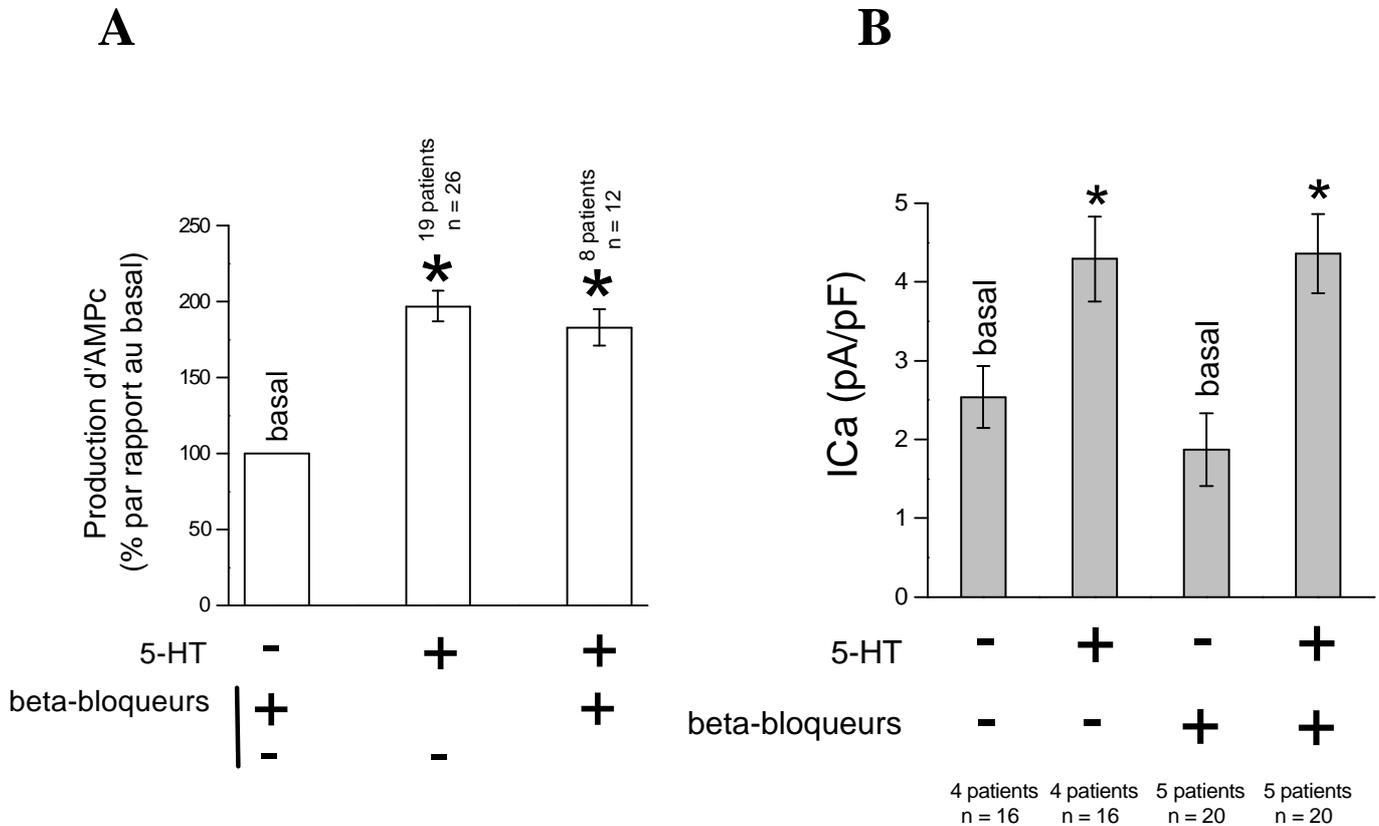


Figure 18 : Relation entre le traitement des patients avec des beta-bloqueurs et la réponse sérotoninergique des myocytes atriaux humains

Représentation graphique du taux d'AMPC intracellulaire (A) et de l'amplitude du courant $I_{Ca^{2+}, L}$ (B) de cellules issues de patients traités (+) ou non (-) avec des beta-bloqueurs suite à une stimulation sérotoninergique (1 μ M). Résultats normalisés par rapport au taux basal d'AMPC et au courant $I_{Ca^{2+}, L}$ basal respectivement. Les valeurs correspondent à des expériences indépendantes. * : $p < 0,05$ en comparaison au niveau basal.

Traitement	Avec β -bloqueurs	sans β -bloqueur
Taux d'AMPC (%)	183 ± 12	197 ± 10
$I_{Ca^{2+}, L}$ (pA/pF)	$4,29 \pm 0,54$	$4,36 \pm 0,5$

Tableau IV : Récapitulatif des effets des beta-bloqueurs sur la production d'AMPC et sur l'activité du courant $I_{Ca^{2+}, L}$ exprimés respectivement en % et en pA/pF après stimulation sérotoninergique sur les myocytes humains.

H-Oligomérisation du récepteur h5-HT₄ cardiaque

La figure 19 montre les résultats obtenus par Western blot sur les myocytes atriaux humains avec l'anticorps polyclonal anti-G21V. Trois bandes de poids moléculaire apparent 40, 77 et 170 kDa, ont été identifiées (figure 19A). Elles sont abolies en présence d'IgG purifiées du sérum préimmun de lapin (IgG contrôle).

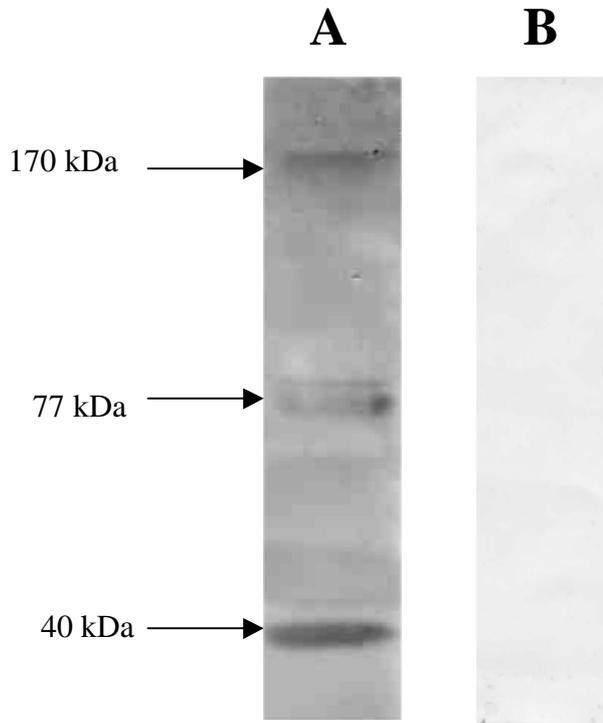


Figure 19 : Identification du récepteur 5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains réalisée en condition dénaturante (Western-Blot)

Membrane de nitrocellulose incubée avec l'anticorps anti-G21V (A) et les IgG purifiées contrôle (B)

L'anticorps anti-G21V reconnaît donc spécifiquement le récepteur h5-HT₄ cardiaque dans des conditions dénaturantes.

La bande de poids moléculaire 40 kDa correspond à la masse du récepteur h5-HT₄ monomérique déterminée à partir de sa séquence primaire en acides aminés. Dans la littérature, le récepteur apparaît à un poids moléculaire situé entre 40 (Ponimaskin et al., 2001) et 60 kDa (Mialet et al., 2000b; Eftekhari et al., 2000) suivant les préparations cellulaires étudiées. Cette différence semble provenir d'une variabilité dans la glycosylation (Eftekhari et al., 2000). En effet, la nature de cette modification post-traductionnelle dépend du système d'expression utilisé. Dans les cellules atriales humaines, le récepteur h5-HT₄ monomérique semblerait donc être peu ou pas glycosylé.

Les bandes de poids moléculaire 77 et 170 kDa semblent correspondre à la masse du récepteur monomérique multipliée par un facteur deux ou quatre. Le récepteur h5-HT₄ serait

donc présent sous forme de dimères et de tétramères dans la membrane des cellules atriales. Ces caractéristiques ont déjà été signalées dans la littérature pour d'autres récepteurs RCPG. Ces protéines semblent exister sous forme d'oligomères dans la membrane plasmique. Le maintien de ces complexes malgré les conditions expérimentales dénaturantes et réductrices, semblerait provenir d'interactions fortes entre les segments transmembranaires des récepteurs. L'hélice 7 serait probablement impliquée dans ces inter- relations (Lee et al., 2003).

I-Conclusions et perspectives

Bien que les récepteurs h5-HT₄ soient 5 à 10 fois moins nombreux que les récepteurs β -adrénergiques dans les cellules atriales (Kaumann et al., 1995) et qu'ils produisent 2 à 3 fois moins d'AMPC intracellulaire suite à une stimulation sérotoninergique; ils sont cependant capables d'activer de façon maximale le courant calcique aux mêmes concentrations que l'isoprotérénol. Ces résultats pourraient être expliqués par un seuil d'activation maximale du canal calcique en dessous du seuil de production d'AMPC global. Il est également probable que ces résultats soient corrélés avec une organisation particulière des récepteurs h5-HT₄ dans la membrane plasmique. Les données de la littérature proposent que certains récepteurs RCPG cardiaques tels que les β_2 -adrénergiques, soient localisés dans des microdomaines de régulation (Bers & Ziolo, 2001; Rich et al., 2001; Steinberg & Brunton, 2001; Zaccolo et al., 2002; Zaccolo & Pozzan, 2002). Nos résultats pourraient alors suggérer ce type de répartition membranaire pour les récepteurs h5-HT₄ ou une proportion d'entre eux.

Les effets fonctionnels observés avec l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT₄ via I_{Ca2+, L} semblent correspondre à une réponse locale des cellules atriales. Ces observations seraient également en faveur de l'existence de microdomaines de régulation pour ce récepteur au sein de ces cellules.

Deux hypothèses concernant le mode d'action de l'anticorps peuvent être proposées.

Hypothèse 1 : L'anticorps induirait une cascade de transduction différente de celle de la voie AMPC en se fixant sur le récepteur h5-HT₄. Peu ou pas de modifications du taux global d'AMPC intracellulaire seraient détectées.

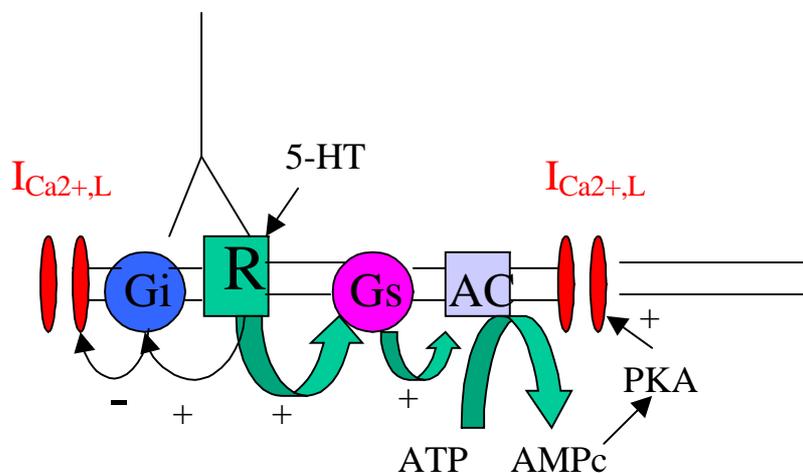
Hypothèse 2 : L'anticorps agirait sur des récepteurs localisés dans des microdomaines de régulation, autour du canal calcique de type L. Ces récepteurs seraient régulés différemment des autres récepteurs h5-HT₄ dispersés dans la membrane.

Les arguments confortant chaque hypothèse vont être maintenant détaillés.

Hypothèse 1 : Trois voies de transduction peuvent être envisagées.

1) Le récepteur h5-HT₄ serait couplé via une protéine G_i au canal calcique :

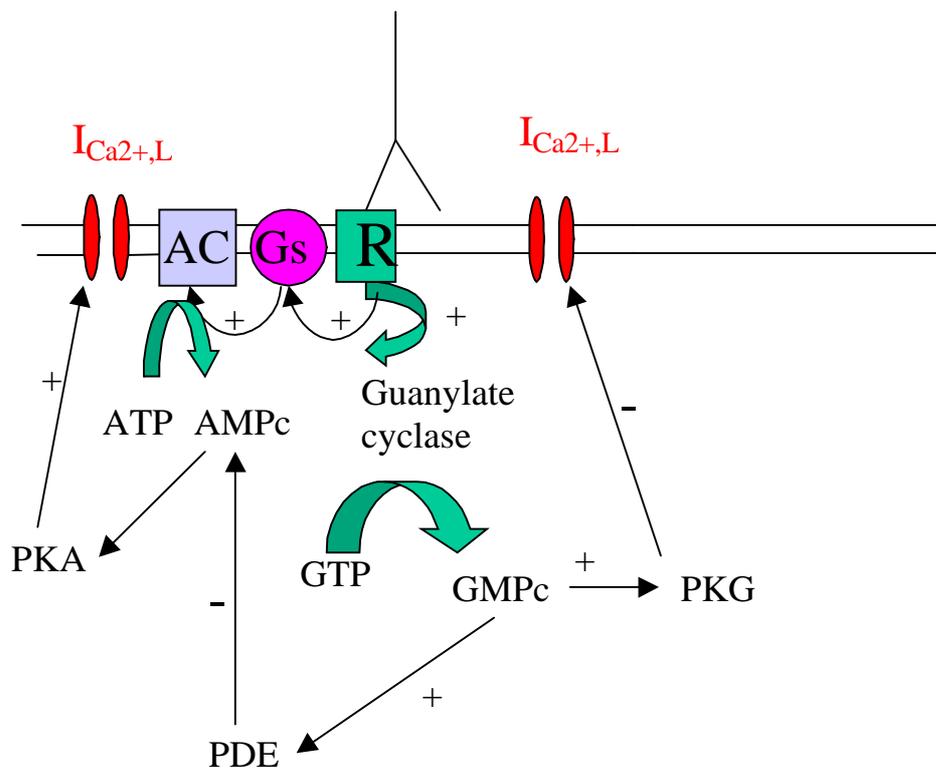
Les données de la littérature montrent un couplage préférentiel du récepteur h5-HT₄ cardiaque avec les protéines G_s (Kaumann, 1991; Ouadid et al., 1991; Sanders & Kaumann, 1992; Jahnel et al., 1992). Cependant une étude récente vient d'identifier une co-précipitation du récepteur avec une protéine G_i (Kilts et al., 2000). La fixation de l'anticorps pourrait donc induire des changements de conformation du récepteur h5-HT₄ permettant ainsi le couplage avec une protéine G_i. La production inchangée d'AMPC suggère que cette protéine serait en interaction directe avec le canal calcique et ne régulerait pas l'adénylate cyclase. L'inhibition de l'action de la 5-HT en présence de l'anticorps anti-G21V ne proviendrait pas d'une gêne stérique apportée par cet anticorps étant donné que le niveau d'AMPC reste constant. Seul I_{Ca2+,L} varie. Il existerait un équilibre entre les voies 5-HT/récepteur h5-HT₄/protéine G_s/adénylate cyclase/courant I_{Ca2+,L} et anticorps anti-G21V/récepteur h5-HT₄/protéine G_i/courant I_{Ca2+,L} (voir schéma ci-dessous). La réponse globale mesurée serait une inhibition du I_{Ca2+,L} par l'anticorps sans modification de la production d'AMPC.



2) Voie GMP cyclique :

Au cours de travaux antérieurs réalisés au laboratoire, il a été montré que l'anticorps B8E5 dirigé contre la seconde boucle extracellulaire du récepteur M2 muscarinique chez le cobaye, activait la voie du GMP cyclique (Nascimento et al., 2001). L'anticorps anti-G21V en se fixant sur le récepteur h5-HT₄ pourrait également stimuler cette voie de transduction. Le GMPc produit activerait la protéine kinase G (PKG), qui phosphorylerait le canal calcique de type L et l'inhiberait. L'anticorps appliqué sur le récepteur avant ou après la 5-HT pourrait alors inhiber complètement ou partiellement l'activité de la 5-HT comme décrit par Sallé et

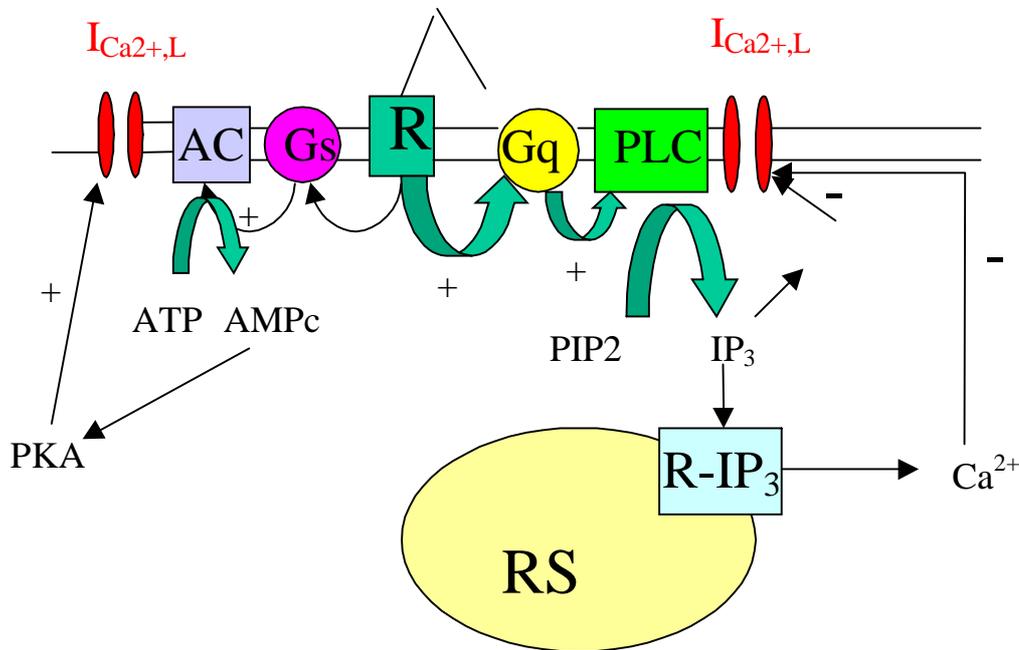
al., 2001. La quantité globale d'AMPC produite suite à la stimulation sérotoninergique serait inchangée en présence d'anticorps. Par ailleurs, le GMPc peut également activer les PDE ce qui provoquerait une dégradation de l'AMPC intracellulaire et donc une diminution du courant $I_{Ca^{2+},L}$ (voir schéma ci-dessous). Lors de nos expériences, les PDE sont inhibées par la théophylline, afin de pouvoir mesurer les niveaux d'AMPC. Ces conditions expérimentales pourraient empêcher la régulation par les PDE de l'AMPC produit et donc être à l'origine d'un taux constant d'AMPC en présence ou en absence d'anticorps. Cependant, remarquons qu'une absence d'effet de l'anticorps a également été visualisée sur les cellules CHO clone 1 alors qu'aucun inhibiteur n'était présent. Bien que les tissus soient différents, il est possible que cette voie n'intervienne pas ou très peu au sein des cellules atriales humaines.



3) Voie IP_3 /PKC :

La fixation de l'anticorps anti-G21V provoquerait le couplage du récepteur h5-HT₄ avec une protéine G_q , qui induirait la synthèse d' IP_3 et l'activation de la PKC. Cette kinase phosphorylerait l'extrémité N-terminale de la sous-unité α du canal calcique de type L et l'inhiberait (Bourinet et al., 1992; McHugh et al., 2000). En parallèle, l' IP_3 entraînerait la libération du calcium contenu dans le RS. Ce dernier aurait un rétrocontrôle négatif sur le

canal calcique et l'inhiberait. Si la fixation de l'anticorps sur le récepteur h5-HT₄, induit cette voie, le taux global d'AMPC ne sera pas modifié et l'intensité du courant I_{Ca2+,L} diminuera (voir schéma ci-dessous).



Hypothèse 2 : L'anticorps anti-G21V pourrait agir préférentiellement sur les récepteurs h5-HT₄ localisés autour du canal calcique dans des microdomaines de régulation. Seules les réponses cellulaires locales pourraient être modifiées contrairement à l'hypothèse 1. Plusieurs situations peuvent être rencontrées suite à la fixation de l'anticorps sur le récepteur h5-HT₄.

1) L'anticorps gêne la fixation de la 5-HT :

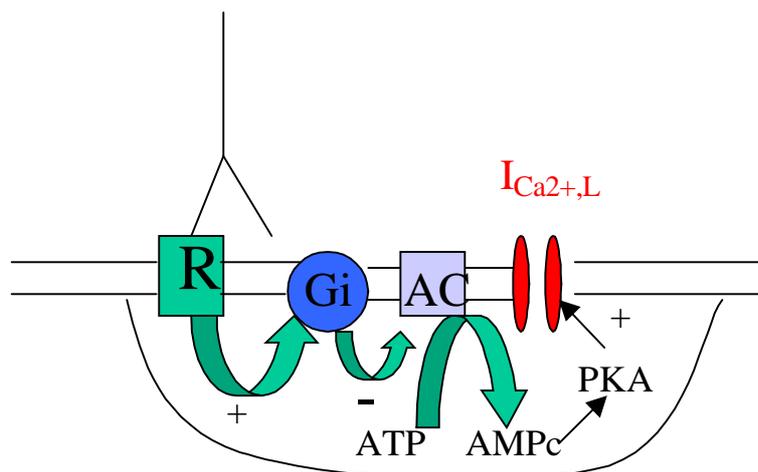
La présence de l'anticorps amènerait une gêne stérique à la surface du récepteur h5-HT₄ empêchant la fixation de la 5-HT. Par ailleurs, il pourrait également entraîner des modifications de conformation du récepteur. Le site de liaison de la 5-HT serait alors perturbé. Ces deux phénomènes pourraient entraîner une inhibition de l'activité sérotoninergique en présence de l'anticorps. Le taux local d'AMPC produit devrait alors diminuer et conduire à une inhibition du courant I_{Ca2+,L}. Toutefois, ces variations ne seront visibles qu'au sein du microdomaine. Le taux global d'AMPC intracellulaire induit par une stimulation sérotoninergique ne sera pas modifié. Les variations locales de la quantité d'AMPC ne pourront pas être détectées avec nos méthodes. Néanmoins, cette hypothèse nous

semble peu probable. En effet, les résultats obtenus sur les cellules CHO clone 1 en cytométrie de flux et en dosage de second messager suggèrent que l'anticorps et la 5-HT peuvent se fixer simultanément sur les récepteurs recombinants.

2) L'anticorps ne gêne pas la fixation de la 5-HT :

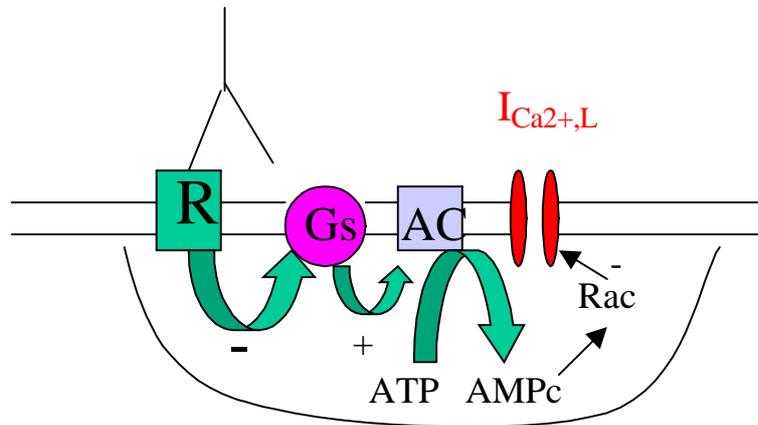
a) Les trois voies de transduction citées pour l'hypothèse 1 sont également envisageables. Toutefois, elles se dérouleront au sein de microdomaines de régulation. Deux paramètres doivent donc être considérés, les PDE et les adénylates cyclases :

- Les PDE auront une influence plus importante. En effet, dans la littérature, des études indiquent que l'activité des PDE serait plutôt localisée dans des microdomaines (Georget et al., 2003). L'activation de la voie GMPcyclique par l'anticorps permettrait la stimulation des PDE et favoriserait la dégradation de l'AMPC local. L'intensité du courant calcique sera alors plus faible et l'activité de la 5-HT sera inhibée.
- L'activité des adénylates cyclases pourrait être régulée par une protéine G_i . L'anticorps anti-G21V pourrait inhiber la réponse sérotoninergique en favorisant le couplage du récepteur h5-HT₄ avec une protéine G_i . Cette dernière pourrait à son tour interagir directement avec ; soit le canal calcique et entraîner son inhibition (hypothèse 1) ; soit une adénylate cyclase provoquant une diminution du taux d'AMPC produit et une baisse de l'intensité du courant $I_{Ca^{2+},L}$ (voir schéma ci-dessous).

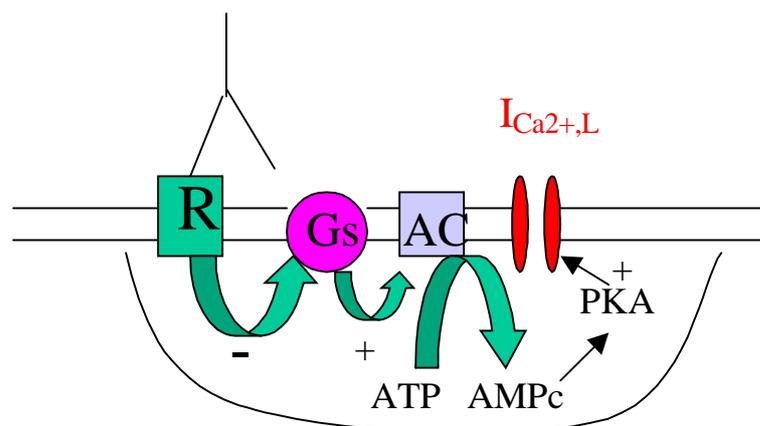


b) L'anticorps pourrait également favoriser ou amplifier l'activité d'une GTPase appartenant à la famille des protéines Rac (Maillet et al., 2003). L'anticorps modifierait localement la production d'AMPC liée à la stimulation du récepteur h5-HT₄, conduisant ainsi à une activation de la protéine Rac de façon PKA-indépendante. Il a été montré par

Wilk-Blaszczak et al., 1997 que la protéine Rac intervenait dans l'inhibition des canaux calciques dépendants du voltage après stimulation avec des neurotransmetteurs. L'anticorps induirait alors par l'intermédiaire de cette protéine Rac, une diminution de l'activité du courant calcique sans modifier la production d'AMPC globale (voir schéma ci-dessous).



c) Enfin, en se basant sur les études réalisées sur les cellules CHO clone 1 et 2, l'anticorps pourrait diminuer l'efficacité de couplage entre le récepteur 5-HT₄ et la protéine G_s au sein de microdomaines de régulation. Les récepteurs seraient peu présents dans les microdomaines (équivalent aux cellules CHO clone 2) et seraient exprimés plus abondamment dans le reste de la membrane (comme le clone 1). Cette répartition provoquerait une absence de variation du taux d'AMPC global produit dans la cellule et une diminution locale d'AMPC à l'origine d'une inhibition du courant calcique (voir schéma ci-dessous).



Afin de valider ou de réfuter ces hypothèses, il serait nécessaire de mettre en évidence la participation de ces différents paramètres lors de l'application de l'anticorps anti-G21V. Les cellules devront être traitées avec divers inhibiteurs spécifiques tels que des inhibiteurs des

protéines kinases C et G, des guanylates cyclases (comme l'ODQ), de la protéine Gi (la PTX).....

La caractérisation pharmacologique du récepteur h5-HT₄ exprimé dans les cellules atriales indique que les substances GR113808 et ML10375 agissent comme des antagonistes spécifiques sur ce récepteur. Ces résultats pourraient suggérer une participation fonctionnelle majeure des isoformes (a) et (b) du récepteur h5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains.

D'autre part, nous avons observé une amplification des actions de la sérotonine et de l'isoprotérénol sur l'activité du courant I_{Ca2+,L}, lorsque ceux-ci sont utilisés conjointement à des concentrations faibles (20 nM). Dans ce contexte, la sérotonine pourrait alors amplifier les effets induits par une stimulation β-adrénergique. Le courant calcique de type L atteignant alors une intensité maximale pourrait favoriser la survenue d'arythmies auriculaires.

Nous avons également montré que contrairement (Pau et al., 2003) ou en accord (Sanders & Kaumann, 1992) avec certaines données de la littérature, les taux d'AMPC intracellulaires ainsi que l'amplitude du courant calcique sont similaires suite à une stimulation sérotoninergique sur des cellules atriales isolées provenant de patients traités ou non avec des beta-bloqueurs. Une grande variabilité du courant calcique basal observé pourrait être à l'origine des différences entre nos travaux et ceux de Pau et al., 2003.

De plus, le récepteur 5-HT₄ cardiaque humain serait exprimé dans les myocytes atriaux sous formes de monomères et d'oligomères. Il a été montré que l'oligomérisation pouvait réguler les propriétés fonctionnelles des récepteurs couplés aux protéines G (Lee et al., 2003). L'existence d'oligomères suggère que le récepteur 5-HT₄ humain cardiaque serait actif sous forme de monomères et/ou d'oligomères. Ce résultat est à approfondir afin de mieux comprendre le rôle fonctionnel et physiologique de ces différentes formes membranaires du récepteur 5-HT₄.

Nos données expérimentales proviennent de deux techniques dont les conditions d'étude sont différentes. Chacune possède ses propres limites. Le dosage d'AMPC est réalisé sur un ensemble de cellules traitées avec de la théophylline. De plus, les stimulations des récepteurs h5-HT₄ et β-adrénergiques sont effectuées sur des temps d'incubation relativement longs (au moins 15 min). La production de second messenger, correspond donc à l'accumulation de l'AMPC dans les cellules en présence de théophylline et n'est pas évaluée en temps réel. En revanche, les mesures électrophysiologiques du courant calcique sont réalisées sur une cellule perforée sans inhibiteur de PDE. Les expériences sont effectuées en temps réel sur des durées courtes d'environ quelques minutes. Cependant, la perforation des cellules nécessaire à l'obtention de la configuration « cellule entière », peut entraîner une

dialyse des constituants intracellulaires. Les réponses cellulaires peuvent donc être altérées. En effet, l'amplitude du courant calcique est très souvent diminuée. Ce phénomène est appelé le « run down ».

Annexe 3 : soumis à Journal of Cardiovascular Electrophysiology

High efficiency activation of L-type Ca²⁺ current by 5-HT in human atrial myocytes.

Emmanuella Di Scala, M.Sc.¹, Ian Findlay, Ph.D.¹, Stephanie. Rose¹, Michel Aupart, M.D.²,
Jorge Argibay, Ph.D.¹, Pierre Cosnay, M.D.^{1,3} and Veronique Bozon, Ph.D.¹.

¹ CNRS UMR 6542, Faculté des Sciences, Université de Tours, France.

² Service de Chirurgie Cardiaque, CHU de Trousseau, Tours, France.

³ Service de Cardiologie B, CHU de Trousseau, Tours, France.

This research was supported in part by Fondation pour la Recherche Médicale, la Fondation de France, and le Conseil Général et Régional de la Région Centre (France). E. Di Scala is a post-graduate scholar of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Author and address for correspondence

V. Bozon, CNRS UMR 6542, Faculté des Sciences, Parc de Grandmont,
37200 Tours, France.

Telephone : (33) 2 47 36 71 14 : Fax : (33) 2 47 36 71 12 : e-mail : bozon@univ-tours.fr

SHORT TITLE : Ca²⁺ current activation by 5-HT

ABSTRACT

Introduction: In human atrial myocytes serotonin and isoproterenol activate the G_s-adenylate cyclase-PKA pathway via respectively 5-HT₄ and β-adrenergic receptors. But, serotonin rather than sympathetic stimulation is more frequently associated with the initiation and persistence of human atrial fibrillation. We questioned whether the arrhythmogenic effect of serotonin resulted from the mechanism of action of the receptor or the context of its action upon cardiac myocytes ?

Methods and Results: Experiments were conducted upon enzymatically isolated human atrial myocytes which were obtained from fragments of right atrium removed during surgical interventions. Intracellular cAMP was measured with RIA. I_{CaL} was recorded with whole-cell patch clamp. The efficacy of agonists to produce cAMP followed the sequence 5-HT<Iso<Forskolin. The efficacy of agonists to increase I_{CaL} was 5-HT=Iso=Forskolin. The simultaneous application of threshold concentrations of 5-HT and Iso maximally increased I_{CaL}.

Conclusion: We show that the effect of 5-HT upon human atrial myocytes is an imbalance between low production of cAMP and maximal activation of I_{CaL}. This could contribute to intracellular Ca²⁺ overload. In particular, when 5-HT is secreted from platelets in the presence of background sympathetic tone.

KEY WORDS : Human atrial myocytes : serotonin : Ca current : cAMP : atrial fibrillation

INTRODUCTION

In human atrial myocytes serotonin (5-HT) activates the G_s-adenylate cyclase-PKA pathway via 5-HT₄ receptors.¹⁻³ The effects of 5-HT are therefore similar to those which result from sympathetic stimulation activating β-adrenergic receptors which use the same intracellular signalling pathway.⁴ But it is 5-HT rather than sympathetic stimulation that has been associated with human atrial fibrillation.⁵ A variety of mechanisms have been proposed for the genesis and progression of atrial fibrillation.^{6,7} The question therefore arises as to whether the arrhythmogenic effect of 5-HT results from its mechanism of action and signalling pathway or the context of its action upon cardiac myocytes which is in consequence to platelet aggregation and secretion.⁸ Previous studies of the mechanisms of action of 5-HT upon human atrial tissue have found that, by comparison with β-adrenergic agonists and receptors, there are fewer 5-HT₄ receptors⁹, that 5-HT evokes the production of less intracellular cAMP¹ and that 5-HT induces less contraction.¹⁰ On the other hand, this consensus that 5-HT has similar but lesser effects upon human atrial myocytes than β-adrenergic agonists is contradicted by the observation that 5-HT and isoprenaline enhance equally and apparently maximally the L-type Ca²⁺ current (ICaL).² In which case 5-HT would be associated with an imbalance between the myocytes electrical and mechanical activity which could give rise to arrhythmia.

The objective of this study was therefore to evaluate the efficacy of 5-HT and Iso to produce intracellular cAMP and increase ICaL in human atrial myocytes and to compare this with the capacity of the cells to produce cAMP and increase ICaL by maximal activation of the adenylylase with forskolin. We show that the capacity of isolated human atrial myocytes to produce cAMP is not a limiting factor in the efficacy of stimulation by either Iso or 5-HT. But that, on the other hand, both agonists evoked equivalent and maximal activation of ICaL. Also that the mixture of low, individually, barely active concentrations of

the two agonists resulted in maximal activation of I_{CaL}, which suggests that it may be the context of the application of 5-HT to cardiac myocytes in the presence of sympathetic background that may result in atrial arrhythmia.

METHODS

Surgery

All protocols for obtaining human cardiac tissue were approved by the Ethics Committee of our institution (Hôpital Trousseau, Tours, France). Right atrium tissue fragments were obtained from discarded tissue from 48 patients subjected to coronary artery disease or valve replacement at the Hôpital Trousseau, Tours, France. Most of the patients had received treatments which included calcium-channel blockers, β -adrenergic antagonists, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, diuretics, NO-donors and/or anti-arrhythmic drugs. Cell dissociation was performed as soon as possible after surgery. Tissue from 17 patients (66 cells from 13 males and 4 females aged between 47 and 84 years) was used for electrophysiology studies and tissue from 31 patients (19 males and 12 females aged between 28 and 91 years) was used to measure cAMP production.

Human atrial cell dissociation

Individual atrial cells were obtained with the technique described by Sallé et al., 2001¹¹ with some modifications. Briefly, the atrial tissue was cleaned of fat and connective tissue and washed in a solution composed of (in mM) : NaCl 135, KCl 4.75, Na₂HPO₄ 16, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, HEPES 10, Glucose 134, Saccharose 10, pH 7.4 supplemented with 30 mM 2, 3-butanedionemonoxime (BDM). Tissue was then incubated in the same solution (without BDM) containing 200 UI/ml collagenase (type V, Sigma), 6 UI/ml protease (type XXIV, Sigma) and 5 mg/ml bovine serum albumin (BSA) for 30 min. The solution was replaced

three times, by fresh enzymatic solution containing 400 UI/ml collagenase and 0.1 mg/ml of trypsin inhibitor (type I-S, Sigma) until cells were obtained (5-30 min). All steps were performed at 37°C and all solutions were continuously gassed with 95 % O₂ / 5 % CO₂. Cells were filtered through a 250 µm pore diameter nylon filter. The resulting cell suspension was centrifuged at 1500 r.p.m. for one minute and the pellet resuspended in solution composed of (in mM) : NaCl 130, KCl 4.8, KH₂PO₄ 1.2, HEPES 25, Glucose 134, Saccharose 5, pH 7.4 supplemented with 20 mg/ml BSA.

Quantification of cAMP production

To measure intracellular cAMP, approximately 3.10⁴ myocytes were incubated in 130 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 5 mM Saccharose, 5 mM theophylline, 10 µM pargyline at pH 7.4 for 15 min. Stimulation of cAMP production was evoked by the addition of either 10 µM forskolin or different concentrations of 5-HT or Iso for a further 15 min. Cells were then centrifuged at 1500 r.p.m. for 1 min and pellets were diluted in 100 µl perchloric acid 1N for 30 min. Then, 100 µl KOH 1N was added to neutralize the pH. After centrifugation at 10 000 r.p.m. for 5 minutes, cAMP in the supernatant was measured by conventional RIA methods (Immunotech, Marseille France).

Electrophysiology

Voltage clamp experiments were conducted at room temperature (23-25°C) using the whole-cell patch clamp technique¹² to record I_{CaL}. Cells were allowed to settle in Petri dishes and superfused with experimental solutions using a set of 250 µm inner-diameter capillaries placed over the interrogated cell. The extracellular solution contained (in mM) : TEACl 140 (tetraethylammonium chloride), CaCl₂ 2, CsCl 6, MgCl₂ 1, glucose 11, HEPES 10, pH 7.3 adjusted with TEAOH. Patch electrodes (—, 2MΩ) were filled with internal solution that

contained (in mM) : CsCl 100, TEACl 40, ATP-Mg²⁺ 2, MgCl₂ 1, CaCl₂ 10⁻⁶, 0.1 GTP, HEPES 10, EGTA 5, pH 7.2 adjusted with CsOH. Voltage-clamped cell currents were recorded with an Axon Instruments 202A amplifier (Axon Instruments, CA, USA) and voltage-clamp protocols and data acquisition were controlled by Acquis1 software (Dipsi Industrie, Chatillon, France). Data were filtered at either 1 or 2 kHz and acquired at 5 or 10 kHz. Cell capacitance and series resistance were compensated (— 80 %) with the Axon Instruments amplifier. Data analysis was performed with Acquis1 and Origin 6.0 (Microcal Software, MA, USA). I_{CaL} was evoked by voltage steps to 0 mV from a prepulse step to -50 mV from the holding potential of -80 mV every 5 s. The amplitude of the current was measured as the difference between the peak initial inward current and that recorded at the end of a 300 ms duration step. 5-HT and Iso were prepared as 10 mM stock solutions in distilled water. Forskolin was prepared as a 10 mM stock solution in DMSO. An equivalent quantity of DMSO was added to all experimental solution.

RESULTS

Figure 1 illustrates the increases in cAMP evoked by activation of 5-HT₄ receptors (5-HT), β-adrenergic receptors (Iso) and the adenylate cyclase (Fk). Both 5-HT and Iso evoked dose-dependent increases in cAMP which were maximal with 1.0 μM of each agonist. Clearly, 5-HT stimulated less cAMP production than either Iso or Forskolin. This shows that the capacity of the adenylate cyclase is not a limiting factor in the relative efficacy of transduction by the two classes of agonist.

Figure 2 illustrates individual examples of the activation of I_{CaL} by 5-HT (Fig. 2A) and Iso (Fig. 2B). The effects of 20 nM of either 5-HT (Fig. 2A) or Iso (Fig. 2B) had no significant effect upon the amplitude of I_{CaL} (Fig. 3). The application of 1 μM of each of the agonists strongly and significantly increased I_{CaL} (Figs. 2 & 3). In both cases the addition of

10 μM Forskolin which would maximally activate the adenylate cyclase¹³ had no further effect than 1 μM of each agonist. All of the effects of 5-HT could be blocked by application of the selective 5-HT₄ receptor blocker ML10375 (Fig. 4).¹⁴

Figure 5 shows an individual example of the activation of ICaL by mixing 5-HT and Iso. As was shown in Fig 2A, the application of 20 nM 5-HT alone to the cell had little or no effect upon the amplitude of ICaL. The addition of 20 nM Iso, in the continued presence of 20 nM 5-HT, strongly increased ICaL. Increasing first the concentration of 5-HT and then that of Iso to 100 nM resulted in no further increase in the amplitude of ICaL. The addition of 10 μM forskolin, in the continued presence of both 100 nM 5-HT and 100 nM Iso, also had no further effect.

A number of studies of human atrial myocytes have suggested a sensitisation of the 5-HT receptor and its signalling pathway in material obtained from patients who have followed treatment with beta-blocker compounds.^{10,15} In this study we have compared the results obtained in tissue from patients treated with beta-blockers and those who had followed other regimes of medication. In our material there was no significant difference in the ability of 5-HT to stimulate the production of cAMP (Fig. 6A) or to increase ICaL (Fig. 6B) in the two groups.

DISCUSSION

It is counterintuitive to consider that a ligand with lesser effect will provoke arrhythmia rather than a ligand with greater effect. Yet this is the situation with regard to the effects of 5-HT and Iso upon human atrial myocytes. In this study we confirm that there is an imbalance between the ability of 5-HT to provoke the production of intracellular cAMP and to increase one of the key targets of the cAMP signalling pathway in cardiac myocytes, the L-type Ca²⁺ current. Thus although 5-HT evoked the production of less cAMP than Iso,^{1,16} it

equally and maximally increased the amplitude of I_{CaL}.² It is also worthy of note that although Iso evoked the production of more cAMP than 5-HT, this was less than that resulting from the direct stimulation of the adenylate cyclase with forskolin, while Iso and forskolin also evoked similar and maximal augmentation of I_{CaL}.

The simplest explanation of these results is that the ceiling for the increase of I_{CaL} caused by cAMP activation of PKA is lower than the level of cAMP evoked by 5-HT and therefore much lower than the levels of cAMP produced by either Iso or forskolin. On the other hand recently a number of studies have highlighted the effects of localised rather than general increases in cAMP resulting from stimulation of G-protein linked receptors. This may derive from a close physical association between receptor, enzyme and effector.¹⁷⁻²¹ It may result from simultaneous activation of G_i as well as G_s, limiting activation of the adenylate cyclase.^{22,23} It may be caused by phosphodiesterases forming a physical barrier to the diffusion of cAMP.²⁴ Further studies are required to determine the extent and the locality of the increase in cAMP which results from stimulation of 5-HT receptors in human atrial myocytes.

We thus find that the apparent efficacy of 5-HT, Iso and forskolin to produce cAMP does not relate to their relative efficacy to increase the amplitude of I_{CaL}. Other studies have evaluated the efficacy of ligands to increase I_{CaL} with reference to the current amplitude recorded under basal condition in the absence of any agonists.²⁵ In this way, tissue obtained from patients treated with beta-blockers show an increase of the effects of 5-HT.¹⁰ It has also been suggested that Iso is more efficient to increase I_{CaL} in cells obtained from infants than in cells obtained from adults.²⁵ In our study we noted a very wide range of values for the amplitude of I_{CaL} recorded under basal conditions in adult human atrial myocytes (0.16 to 7.41 pA/pF : n = 141). In consequence, the expression of the efficacy of each ligand relative to basal, led to extreme values which ranged from a 2-fold to a 50-fold increase. Since these

results could be obtained from the same batch of cells isolated from the tissue obtained from a single patient, this cannot be due to either medication or age or sex. We note also that in our study we were able to record extremely small basal I_{CaL} amplitude in cells obtained from adult patients, this therefore cannot be considered to be a defining characteristic of I_{CaL} in human infants.²⁵

This extreme variation in basal I_{CaL} amplitude and consequent wild variety of the apparent efficacy of the effects of the different ligands led us to evaluate the behaviour of I_{CaL} in each isolated myocyte by the application of 10 μ M forskolin. In this way, by directly stimulating the adenylate cyclase, we could evaluate the capacity of each myocyte to produce cAMP and the consequent maximal increase in I_{CaL}. Thus, although it might have seemed that in different cells, 5-HT or Iso might result in absolute terms to increase I_{CaL} to different levels, the application of forskolin was able to reveal the amplitude of I_{CaL} of which each cell was capable. In this way we can be certain that both 5-HT and Iso were both capable of maximal stimulation of I_{CaL}. This method prevented us from finding the apparent sensitisation of the effects of 5-HT in cells obtained from patients treated with beta-blockers which was reported by Pau et al. 2003¹⁵, since even in cells which were obtained from patients which had not followed such treatments, 5-HT evoked maximal activation of I_{CaL}.

A number of studies have suggested that treatment of patients with β -adrenergic receptor blockers leads to an increase of the effects of 5-HT₄ receptor stimulation.^{10,15,26} In this study, 13 of the 36 patients had been treated with β -blockers. In measurements of the effects of 5-HT upon either cAMP production or Ca²⁺ current amplitude, there were no significant differences between results obtained from these two groups (Fig. 6). Therefore, we could find no evidence for a systematic upgrading of the 5-HT₄ receptor in patients treated with β -adrenergic blockers.

The absence of an effect of ML10375 upon either basal cAMP production or the basal Ca^{2+} current contradicts results obtained in expression systems.^{14,27} Thus either this compound is not an inverse agonist of the 5-HT₄ receptor, or, in human atrial myocytes the receptor does not show constitutive activity. Nevertheless, it completely inhibited the effects of 5-HT and therefore, acts as an antagonist which could suggest that it is isoforms a and b of the receptor^{28,29} which are functional in this tissue.

This study provides a step towards understanding the paradox which arises from the fact that whereas the known actions of 5-HT upon human atrial myocytes are quantitatively less than those resulting from β -adrenergic stimulation, it is the former and not the latter which is frequently associated with atrial arrhythmia and the prolongation of atrial fibrillation.^{5,30} It has been suggested that the effects of 5-HT upon the physiology of human atrial myocytes were limited by comparison with those of Iso because the 5-HT₄ receptor was linked to the activation of G_i as well as G_s proteins.²² But other studies^{1-3,5,10,11,15,16,26} have observed effects of 5-HT upon human atrial myocytes in the absence of treatment with PTX and here (Fig. 2) 5-HT maximally increased I_{CaL} in the absence of inhibition of G_i. There is therefore no evidence for a difference in the signalling pathway used by the 5-HT₄ receptor relative to that used by the β -adrenergic receptor that could account for its particular association with arrhythmia.⁵ On the other hand, we did find that the addition of low, barely active as individual concentrations of 5-HT and Iso, provoked maximal activation of I_{CaL}. It is therefore possible that 5-HT released from aggregating platelets during haemodynamic stress^{5,8} would concur with low level β -adrenergic stimulation due to sympathetic tone which could then result in maximal activation of I_{CaL}. How this could result in arrhythmogenic Ca^{2+} overload⁵ remains to be determined, but rather than surcharge of the sarcoplasmic reticulum⁶ which would result also from β -adrenergic stimulation, we propose a new mechanism. The localised production of cAMP and activation of PKA in subsarcolemmal microdomains could

result in maximal activation of the L-type Ca^{2+} current (Fig. 2) and maximal Ca^{2+} entry into the cells. But, if this is not associated with enhanced Ca^{2+} uptake by the sarcoplasmic reticulum due to PKA phosphorylation of phospholamban³¹ Ca^{2+} would accumulate in the sub-membrane fuzzy space and could provoke extra systoles and thus initiate atrial fibrillation. Further studies will be undertaken to test this hypothesis.

CONCLUSION

This study confirms that while 5-HT and Iso result in different levels of production of cAMP in human atrial myocytes both agonists are able to equally and maximally increase the L-type Ca^{2+} current.^{1,2} We also find that threshold concentrations of each agonist, added together result in maximal activation of I_{CaL}. The secretion of 5-HT from platelets and sympathetic background tone could therefore combine to provoke an imbalance between Ca^{2+} entry and myocyte contractility^{2,5,10} which would result in arrhythmogenic Ca^{2+} overload.

REFERENCES

- 1 Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ: A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 1990;100:879-885.
- 2 Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J, Nargeot J: Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Mol Pharmacol* 1991;41:346-351.
- 3 Jahnel U, Rupp J, Ertl R, Nawrath H: Positive inotropic response to 5-HT in human atrial but not in ventricular heart muscle: *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992;346:482-485.
- 4 Yusuf S, Al-Saady N, Camm J: 5-Hydroxytryptamine and atrial fibrillation : how significant is this piece in the puzzle ? *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;14:209-214.
- 5 Kaumann AJ: Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias ? *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:451-455.
- 6 Alessie MA, Ausma J, Schotten U: Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;54:230-246.
- 7 Nattel S: New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;415:219-226.
- 8 Côté F, Fligny C, Fromes Y, Mallet J, Vojdani G: Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol Med* 2004;10:232-238.
- 9 Kaumann AJ, Lynham JA, Brown AM: Comparison of the densities of the 5-HT₄ receptors, β 1- and β 2-adrenoceptors in human atrium: functional implications. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995;353:592-595.
- 10 Sanders L, Lynham JA, Bond B, del Monte F, Harding SE, Kaumann AJ: Sensitization of human atrial 5-HT₄ receptors by chronic β -blocker treatment. *Circ Res* 1995;92:2527-2539.
- 11 Sallé L, Eftekhari P, Aupart M, Cosnay P, Hoebeke J, Argibay J: Inhibitory activity of antibodies against the human atrial 5-HT₄ receptor. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:405-417.

- 12 Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Plugers Arch* 1981;391:85-100.
- 13 Simonds W: G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:66-72.
- 14 Blondel O, Gastineau M, Langlois M, Fischmeister R: The 5-HT₄ receptor antagonist ML10375 inhibits the constitutive activity of human 5-HT_{4(c)} receptor. *Br J Pharmacol* 1998;124:1-3.
- 15 Pau D, Workman AJ, Kane KA, Rankin AC: Electrophysiological effects of 5-hydroxytryptamine on isolated human atrial myocytes, and the influence of chronic β -adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol* 2003;140:1434-1441.
- 16 Sanders L, Kaumann AJ: A 5-HT₄-like receptor in human left atrium. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992;345:382-386.
- 17 Bers D.M, Ziolo MT: When is cAMP not cAMP ? Effects of compartmentalization. *Circ Res* 2001;89:445-452.
- 18 Rich T, Fagan KA, Tse TE, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW: A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13049-13054.
- 19 Steinberg SF, Brunton LL: Compartmentation of G protein-coupled signaling pathway in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:751-773.
- 20 Zaccolo M, Malgalhaes P, Pozzan T: Compartmentalization of cAMP and Ca²⁺ signals. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:160-166.
- 21 Zaccolo M, Pozzan T: cAMP and Ca²⁺ interplay : a matter of oscillation patterns. *Trends Neurosci* 2003;26:53-55.

- 22 Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen B, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM: β_2 -adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G_s and G_i . *Circ Res* 2000;87:705-709.
- 23 Gong H, Sun H, Koch WJ, Rau T, Eschenhagen T, Ravens U, Heubach JF, Adamson DL, Harding SE: Specific β_2 AR blocker ICI 118551 actively decreases contraction through a G_i -coupled form of the β_2 AR in myocytes from failing human heart. *Circulation* 2002;105:2497-2503.
- 24 Georget M, Mateo P, Vandecasteele G, Lipskaia L, Defer N, Hanoune J, Hoerter J, Lugnier C, Fischmeister R: Cyclic AMP compartmentation due to increased cAMP-phosphodiesterase activity in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8). *FASEB J* 2003;17:1380-1391.
- 25 Tipparaju SM, Kumar R, Wang Y, Joyner RW, Wagner MB: Developmental differences in L-type calcium current of human atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1963-H1969.
- 26 Kaumann AJ, Sanders L: 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium: facilitation by chronic β -adrenoceptor blockade. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994;349:331-337.
- 27 Mialet J, Berque-Bestel I, Eftekhari P, Gastineau M, Giner M, Dahmoune Y, Donzeau-Gouge P, Hoebeke J, Langlois M, Siscic S, Fischmeister R, Lezoualc'h F: Isolation of the serotonergic 5-HT_{4(e)} receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines. *Brit J Pharmacol* 2000;129:771-781.
- 28 Claeysen S, Sebben M, Becamel C, Eglen RM, Clark RD, Bockaert J, Dumuis A: Pharmacological properties of 5-Hydroxytryptamine₄ receptor antagonists on constitutively active wild-type and mutated receptors. *Mol Pharmacol* 2000;58:136-144.

- 29 Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Krobert KA, Brattelid T, Kaumann AJ, Levy FO: 5-HT_{4(a)} and 5-HT_{4(b)} receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;363:146-160.
- 30 Workman AJ, Rankin AC: Serotonin, I(f) and human atrial arrhythmia. *Cardiovasc Res* 1998;40:436-437.
- 31 Bers DM: Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415:198-204.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Stimulation of cAMP production by 5-HT, isoproterenol and forskolin in human atrial myocytes. cAMP production is expressed as a percentage of that recorded in the absence of agonists (basal). Cells were stimulated for 15 minutes with either 20 nM (6 values from 4 patients) or 1 μ M 5-HT (38 values from 27 patients); 20 nM (6 values from 4 patients) or 1 μ M isoproterenol (Iso: 13 values from 12 patients); or 10 μ M Forskolin (Fk: 10 values from 10 patients). Columns and bars represent the mean \pm s.e.m. values. Stars indicate $p < 0.05$ with one-way ANOVA for comparison with basal. Crosses indicate $p < 0.05$ with one-way ANOVA for comparison between 1 μ M 5-HT and 1 μ M Iso, and between 1 μ M Iso and 10 μ M Forskolin.

Figure 2. Stimulation of L-type Ca^{2+} currents by 5-HT, isoproterenol and forskolin in two representative human atrial myocytes. The graphs represent the time course of the reaction of the Ca^{2+} current to the superfusion of different agonists for the periods indicated by the bars. Representative traces of Ca^{2+} currents recorded at the indicated points in each experiment are shown above each graph. A. The effects of 5-HT. B. The effects of isoproterenol.

Figure 3. Stimulation of L-type Ca^{2+} currents by 5-HT, isoproterenol and forskolin. I_{CaL} is expressed as a percentage of that recorded in the absence of agonists (basal). Cells were stimulated with either 20 nM (9 values from 4 patients) or 1 μM 5-HT (36 values from 9 patients); 20 nM (7 values from 2 patients) or 1 μM isoproterenol (Iso: 7 values from 2 patients); 20 nM 5-HT and 20 nM isoproterenol (Iso : 6 values from 3 patients) or 10 μM Forskolin (Fk: 36 values from 13 patients). Columns and bars represent the mean \pm s.e.m. values. Stars indicate $p < 0.05$ with one-way ANOVA for comparison with basal. NS indicates no significant difference with one-way ANOVA for comparison between 20 nM 5-HT plus 20 nM Iso and 10 μM Forskolin.

Figure 4. Abolition of the effects of 5-HT by ML 10375.

A. The effects of 1 μ M ML10375, 5-HT and Forskolin upon the Ca^{2+} current. Agonists were applied to this representative myocyte for the periods indicated by the bars. Individual Ca^{2+} currents recorded at the indicated points are shown above the graph.

B. The effects of 1 μ M ML 10375 upon cAMP production. Columns and bars represent the mean and s.e.m. values. ML : 1 μ M ML 10375 (8 values from 8 patients). 5-HT : 1 μ M 5-HT (38 values from 27 patients). ML+5-HT : 1 μ M ML 10375 + 1 μ M 5-HT (7 values from 7 patients).

Figure 5. Stimulation of L-type Ca^{2+} currents by mixtures of 5-HT, isoproterenol and forskolin in one representative human atrial myocyte. The graph represents the time course of the reaction of the Ca^{2+} current to the superfusion of the different agonists for the periods indicated by the bars. Representative traces of Ca^{2+} currents recorded at the indicated points are shown above the graph.

Figure 6. Effects of β -blocker treatments on 5-HT stimulation of human atrial myocytes

A. cAMP production evoked by 1 μ M 5-HT in cells from patients treated with (12 values from 8 patients) or without (26 values from 19 patients) β -blockers. cAMP production is expressed as a percentage of that recorded in the absence of agonists.

B. L-type Ca^{2+} currents in presence or absence of 1 μ M 5-HT in cells from patients treated with (20 values from 5 patients) or without (16 values from 4 patients) β -blockers.

Columns and bars represent the mean \pm s.e.m. values. Stars indicate $p < 0.05$ with one-way ANOVA for comparison with basal (in absence of agonist). NS indicates no significant difference with one-way ANOVA for comparison between 5-HT stimulation on cells from patients treated with or without β -blockers.

Fig 1

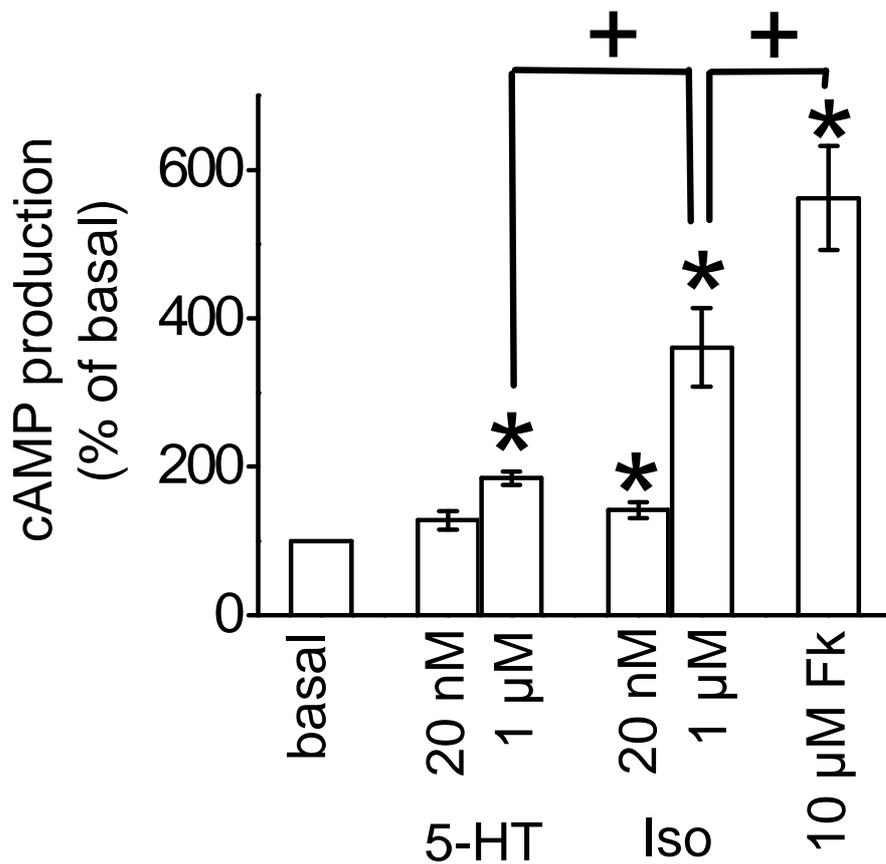


Fig 2

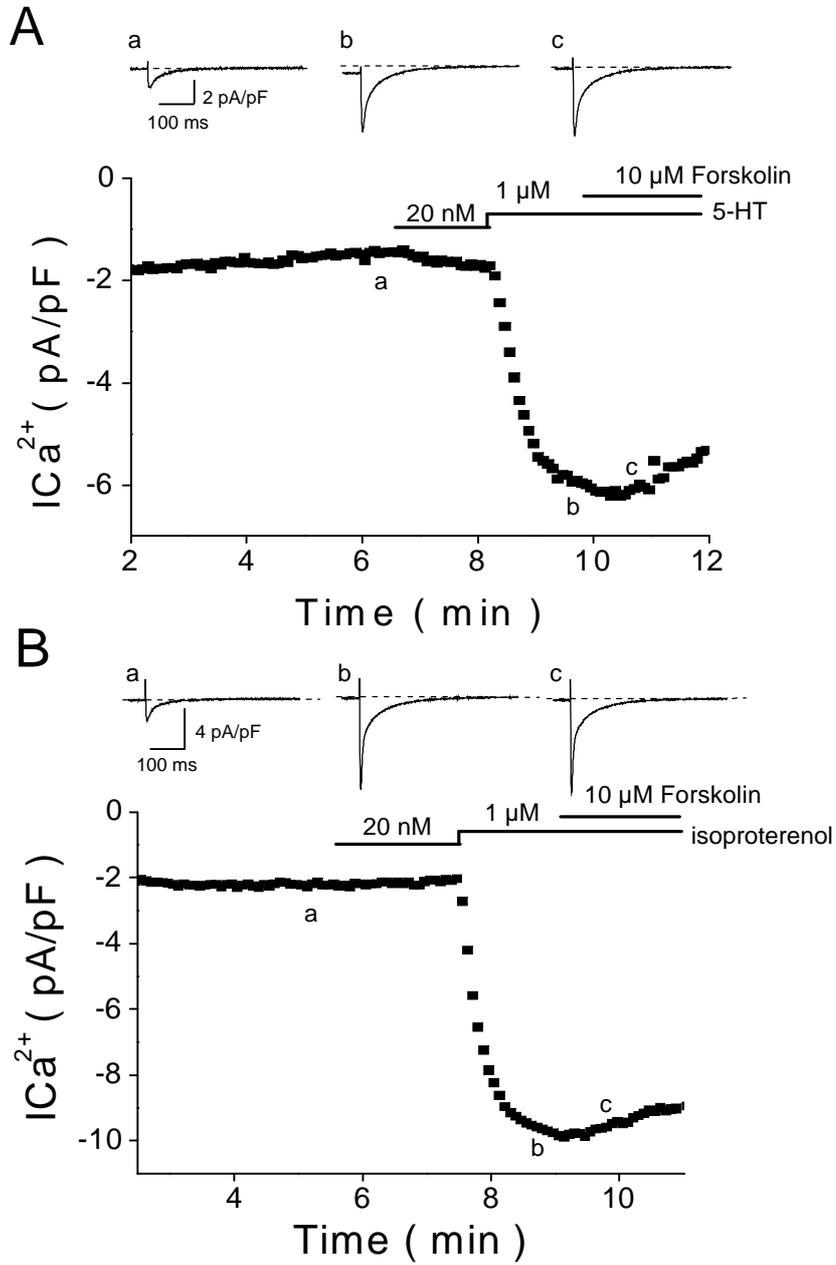


Fig 3

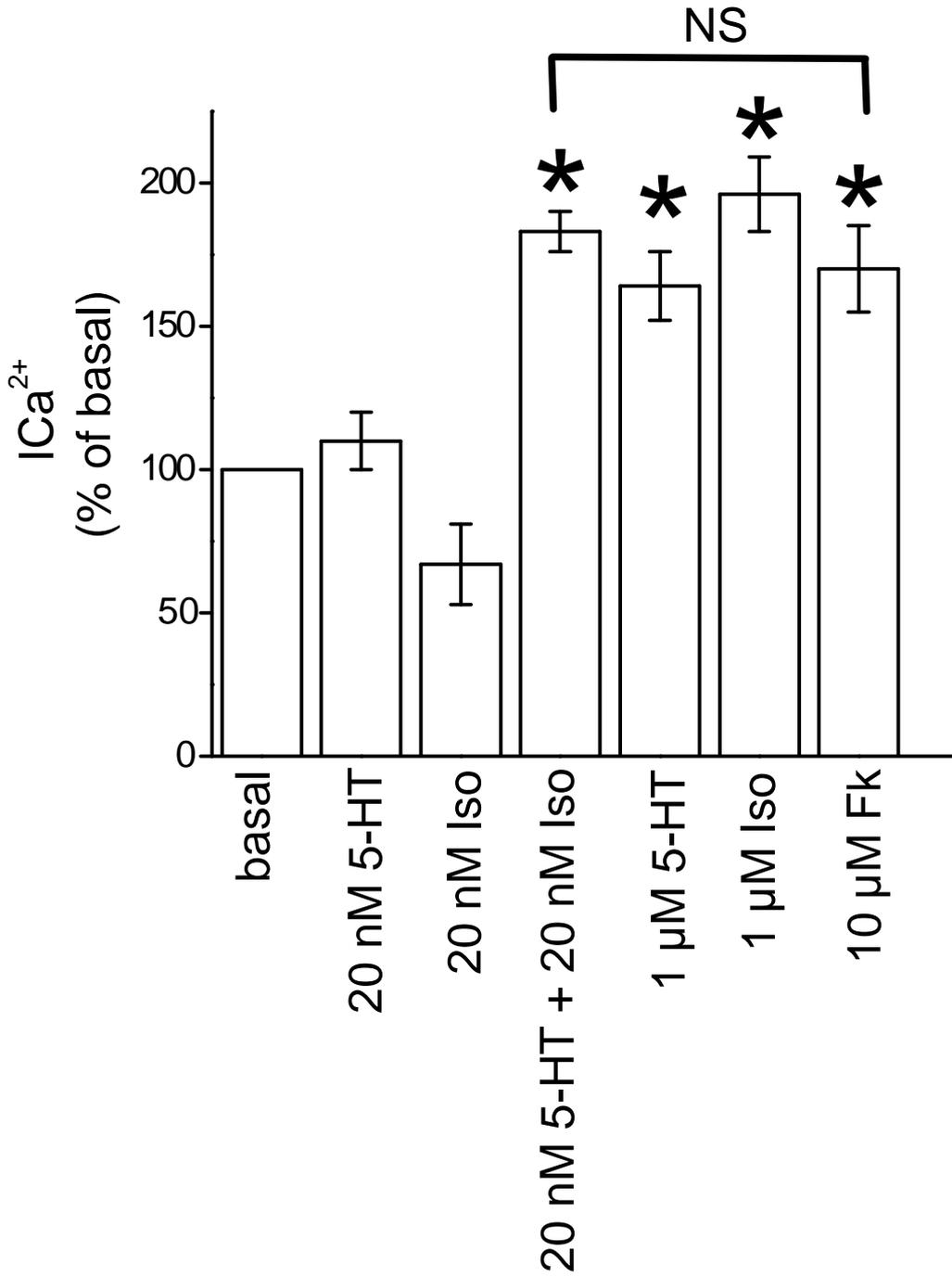


Fig 4

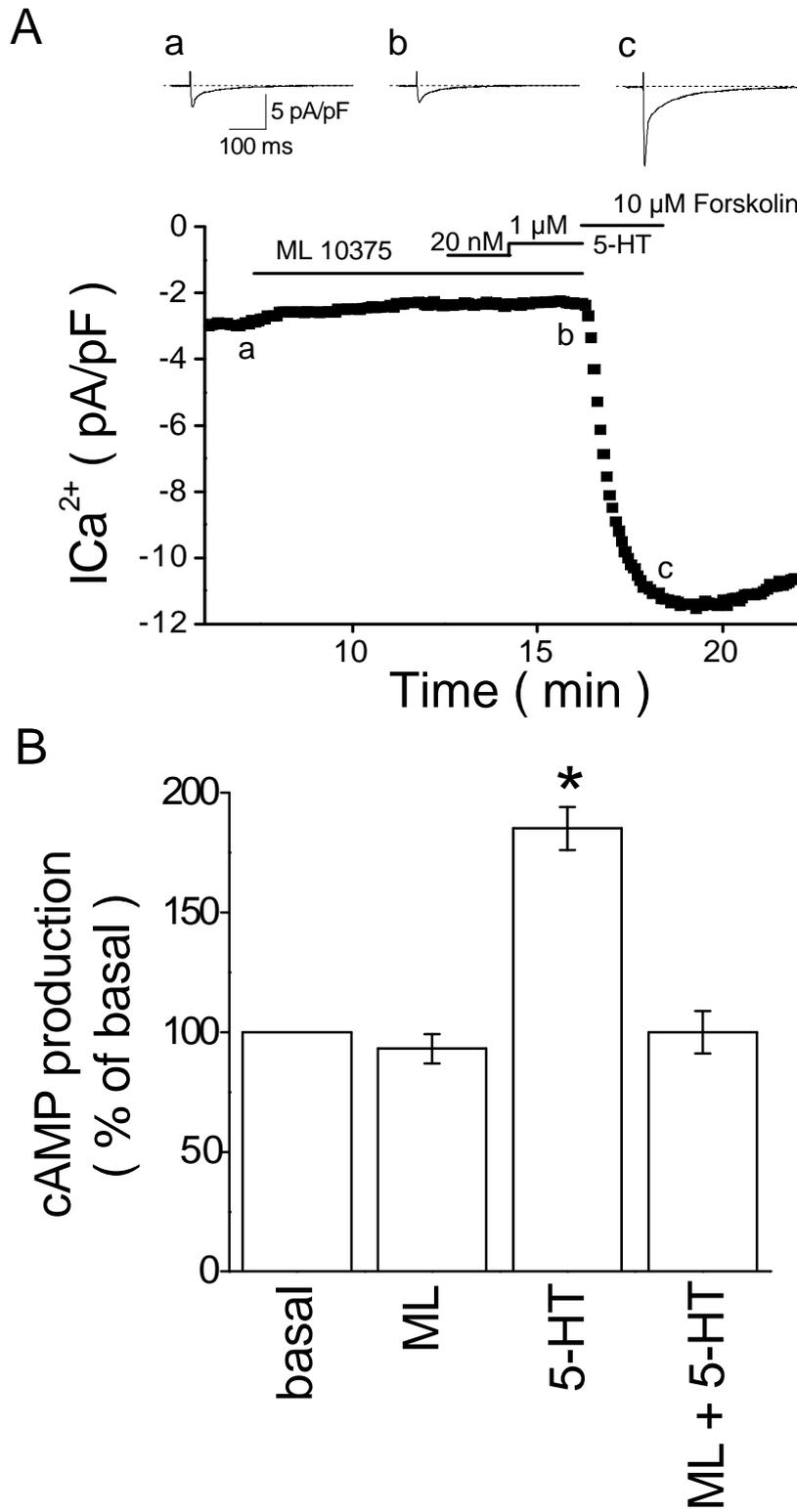


Fig 5

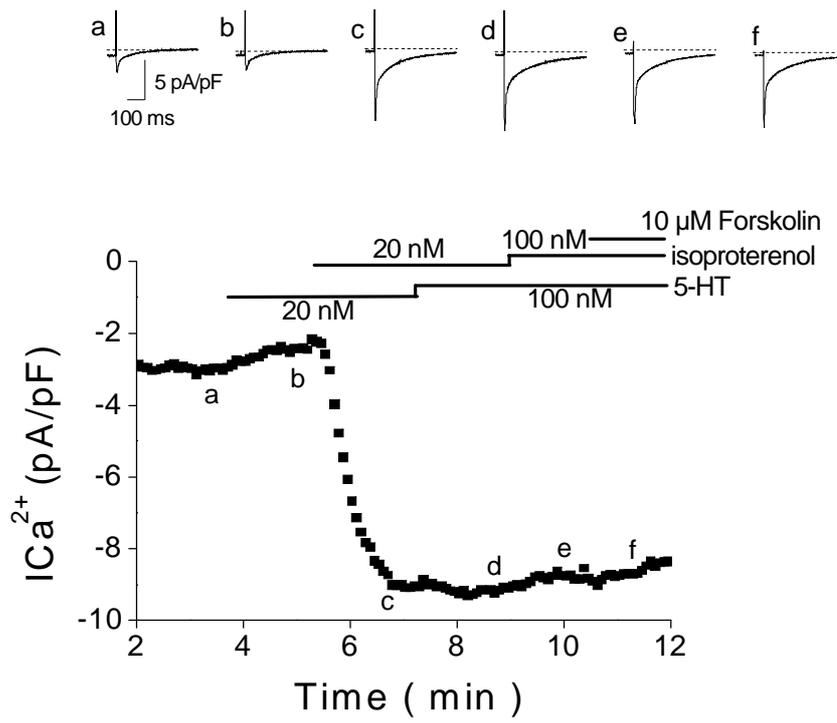
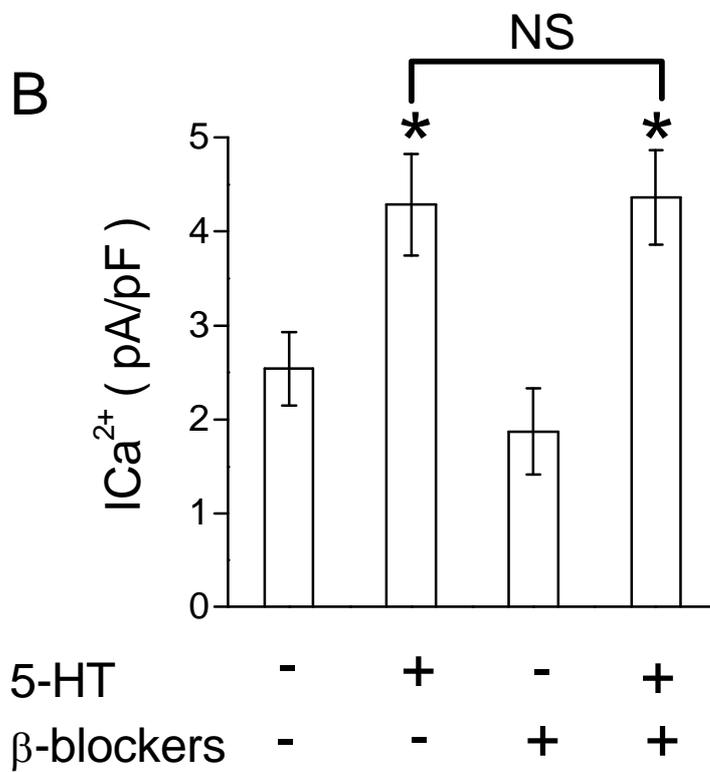
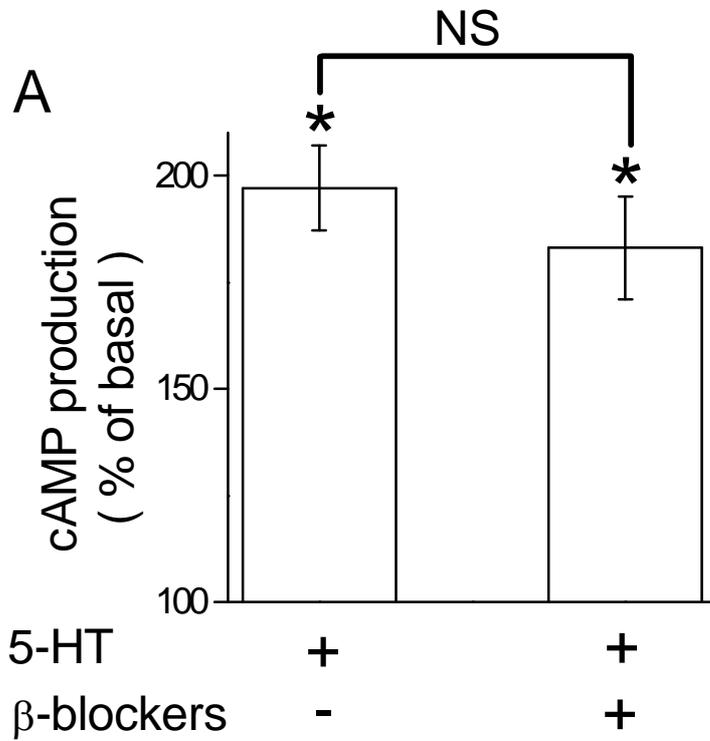


Fig 6



Partie 3 : Détection d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur 5-HT₄ humain cardiaque dans le sérum de patients atteints de fibrillations auriculaires d'origine inconnue. Effets fonctionnels des auto-anticorps sur les myocytes atriaux humains exprimant le récepteur 5-HT₄

A-Détection de la présence d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur 5-HT₄ humain cardiaque dans le sérum de patients atteints de fibrillations auriculaires paroxystiques idiopathiques

1-Présence d'anticorps dirigés contre le peptide G21V

18 sérums de patients ont été utilisés dans cette étude : 8 proviennent de sujets sains (témoins) et 10 (P1 à P10) de patients atteints de fibrillations auriculaires d'origine inconnue. Ces 10 échantillons proviennent d'une sélection longue et rigoureuse établie d'après des critères précis. Les IgG précipitées au sulfate d'ammonium des différents sérums ont été analysées par la technique ELISA contre le peptide G21V mimant la seconde boucle extracellulaire du récepteur 5-HT₄. Deux patients, P2 et P6, présentent dans leur sérum des auto-anticorps dirigés contre cette séquence peptidique (Tableau V). Ces anticorps semblent reconnaître des épitopes linéaires.

Patients	Présence spécifique d'anticorps (+)	S/N
Patient 1	-	(0,84 ± 0,09)
Patient 2	+	(2,15 ± 0,05)
Patient 3	-	(0,86 ± 0,02)
Patient 4	-	(1,07 ± 0,06)
Patient 5	-	(1,20 ± 0,09)
Patient 6	+	(2,28 ± 0,03)
Patient 7	-	(1,77 ± 0,06)
Patient 8	-	(1,56 ± 0,09)
Patient 9	-	(1,70 ± 0,03)
Patient 10	-	(1,00 ± 0,03)
anti-G21V*	+	(3,00 ± 0,02)

* : contrôle positif

Tableau V : Test ELISA : Réactivité de la fraction d'IgG précipitées de patients atteints de fibrillations auriculaires paroxystiques idiopathiques face au peptide G21V mimant la seconde boucle extracellulaire du récepteur h5-HT₄

La reconnaissance spécifique est établie suivant un rapport S/N > 2. Le ratio S/N correspond au rapport de la DO des IgG patients sur la DO des IgG témoins. Le contrôle positif est obtenu avec l'anticorps anti-G21V. Les valeurs sont des moyennes ± s.e.m

2-Présence d'anticorps dirigés contre le récepteur humain 5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone1

Afin de détecter dans le sérum de ces patients la présence d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur 5-HT₄, une analyse en cytométrie de flux a été réalisée. Les fractions d'IgG ont été appliquées à la surface des cellules CHO clone 1 exprimant l'isoforme (e) de ce récepteur. Les contrôles négatifs sont représentés par le mélange des 8 solutions d'IgG précipitées des patients témoins (figure 20b). La moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence est de 337. Deux patients sur dix, P2 et P6, présentent une intensité plus élevée que le mélange des témoins : 539 pour le patient P2 (figure 20c) et 507 pour le patient P6 (figure 20d). Pour les autres patients (P1, P3, P4, P5, P7, P8, P9 et P10) aucune fixation spécifique sur le récepteur 5-HT_{4(e)} a été détectée. En effet, le patient P8 montre une moyenne de 338 (figure 20e). Cette étude a permis de montrer la présence d'auto-anticorps reconnaissant spécifiquement le récepteur 5-HT_{4(e)} dans le sérum de deux patients sur dix : P2 et P6.

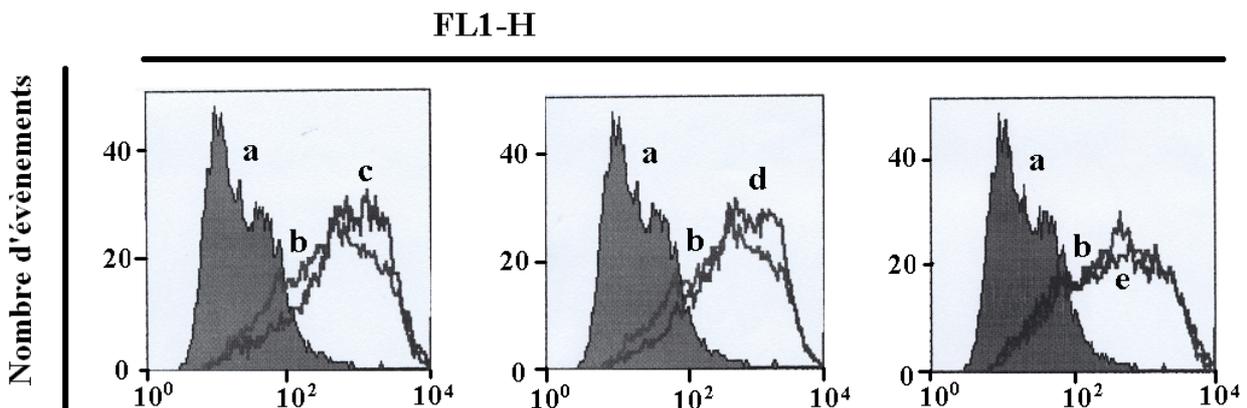


Figure 20 : Identification par cytométrie de flux de la fixation d'auto-anticorps sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1

20 µl de la fraction d'IgG précipitées des patients sains et atteints de fibrillation auriculaire ont été appliqués pendant 30 min à la surface des cellules CHO clone 1. IgG de : (b) témoins mélangés; (c) patient P2; (d) patient P6; (e) patient P8. (a) correspond au contrôle négatif. Représentation de l'intensité de fluorescence suite à une analyse avec le programme CelleQuest (Becton Dickinson, SanatClara CA USA). Expérience représentative.

B-Effets fonctionnels des IgG précipitées des patients P2 et P6 sur les myocytes atriaux humains

1-Effets des IgG précipitées sur la production d'AMPC

Nous avons étudié l'activité des fractions d'IgG des témoins (T) et des patients P2, P6 et P8 sur le récepteur 5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains (figure 21A). Les IgG de P8 ont été choisies pour représenter les patients atteints des fibrillations auriculaires sans détection d'anticorps dirigés contre le récepteur 5-HT₄. Quelque soit les fractions analysées, aucun changement significatif a été observé sur la production basale d'AMPC : 86 ± 19 % pour T, 100 ± 6 % pour P2, 86 ± 15 % pour P6 et 88 ± 16 % pour P8 (figure 21A). Dans d'autres expériences, les IgG précipitées ont été incubées avec 1 µM de 5-HT (figure 21B). Dans ces conditions expérimentales, la production intracellulaire est augmentée de façon similaire à celle obtenue en présence de 5-HT seule (figure 17A). Les valeurs mesurées sont de 198 ± 15 % pour T, 212 ± 11 % pour P2, 234 ± 21 % pour P6 et 205 ± 18 % pour P8 par rapport à 185 ± 9 % avec la 5-HT seule. Les IgG précipitées ne modifient pas l'activité fonctionnelle du récepteur 5-HT₄. De plus, elles n'inhibent pas l'action de la 5-HT. Bien que les patients P2 et P6 contiennent des auto-anticorps dirigés contre le récepteur 5-HT₄, aucune réactivité fonctionnelle visible n'a pu être détectée par la voie de transduction AMPc.

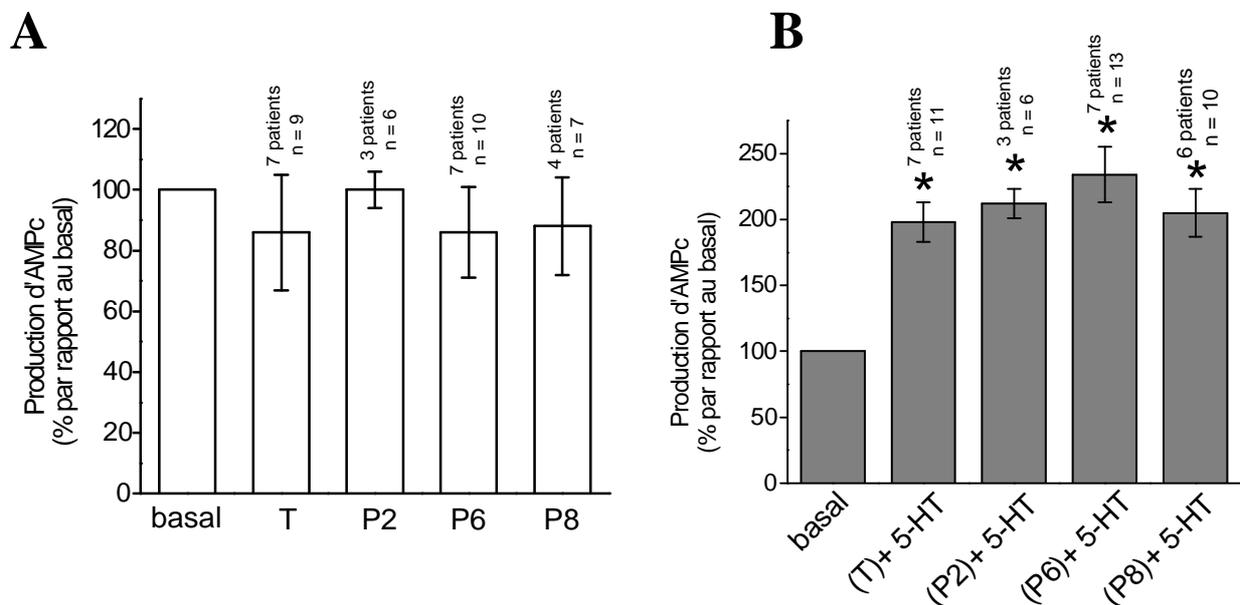


Figure 21 : Activité fonctionnelle des fractions IgG sur la production d'AMPC dans les myocytes atriaux humains

Les myocytes atriaux humains sont soit incubés avec les IgG précipitées (dilution : 25) seules pendant 15 min (A), soit pré-incubées avec les fractions IgG (dilution : 25) pendant 15 min suivie de l'addition de 5-HT (1 µM) pendant 15 min supplémentaires (B). Résultats normalisés par rapport au niveau basal. Valeurs correspondant à la moyenne ± s.e.m : * : p<0,05 en comparaison avec le basal.

2-Effets des IgG précipitées sur l'amplitude du courant $I_{Ca^{2+},L}$

Etant donné que les IgG des patients n'induisent pas de modifications du taux d'AMPc intracellulaire, nous avons recherché un effet fonctionnel potentiel à un autre niveau dans les cellules. Nous avons donc sélectionné comme pour les travaux effectués dans la partie 2 de ce mémoire, le canal calcique de type L. Les valeurs de l'amplitude du courant calcique sont normalisées par rapport aux intensités maximales obtenues avec la forskoline.

Les IgG des témoins (T) et des patients (P6 et P8) diminuent significativement l'amplitude du courant $I_{Ca^{2+},L}$ par rapport à une application de 10 μ M de forskoline (figure 22C). Les valeurs mesurées sont de $28 \pm 5,7$ % pour T (figure 22C); $47 \pm 8,2$ % pour P6 (figure 22C) et $41 \pm 7,4$ % pour P8 (figure 22C). De plus, ces intensités sont inférieures ou égales à celles observées en condition basale ($45 \pm 6,4$ %; figure 22C). Ces diminutions pourraient être liées à une très grande variabilité des amplitudes de courant mesurées au sein des myocytes atriaux humains isolés, ainsi qu'au « run down » du courant fréquemment observé sur ces préparations cellulaires.

Nos résultats indiquent également que les IgG du patient P8 inhibent le courant calcique induit par la 5-HT ($38 \pm 6,8$ %; figure 22A, B et C). De plus, cet effet est réversible (figure 22B). Des résultats comparables ont été obtenus avec les IgG du patient P6 (32 ± 5 %; figure 22C) et des témoins T ($22 \pm 3,5$ %; figure 22C). Les données obtenues avec les témoins sont extrêmement surprenantes. Elles suggèrent que les fractions IgG précipitées (T) contiennent un facteur qui peut entraîner l'inhibition du courant calcique $I_{Ca^{2+},L}$ induit par une stimulation sérotoninergique. Cet élément serait présent dans toutes les solutions d'IgG et aurait une action complètement réversible.

Nous avons voulu savoir si cet effet inhibiteur était spécifique de la voie sérotoninergique. Les IgG du patient P8 ont donc été incubées en présence d'isoprotérénol sur les myocytes atriaux humains (1 μ M; figure 23A). Les résultats indiquent que les IgG inhibent également le courant $I_{Ca^{2+},L}$ induit par la voie β -adrénergique de façon réversible (figure 23A). Toutefois, ce facteur ne bloque pas les effets de la forskoline (figure 23B).

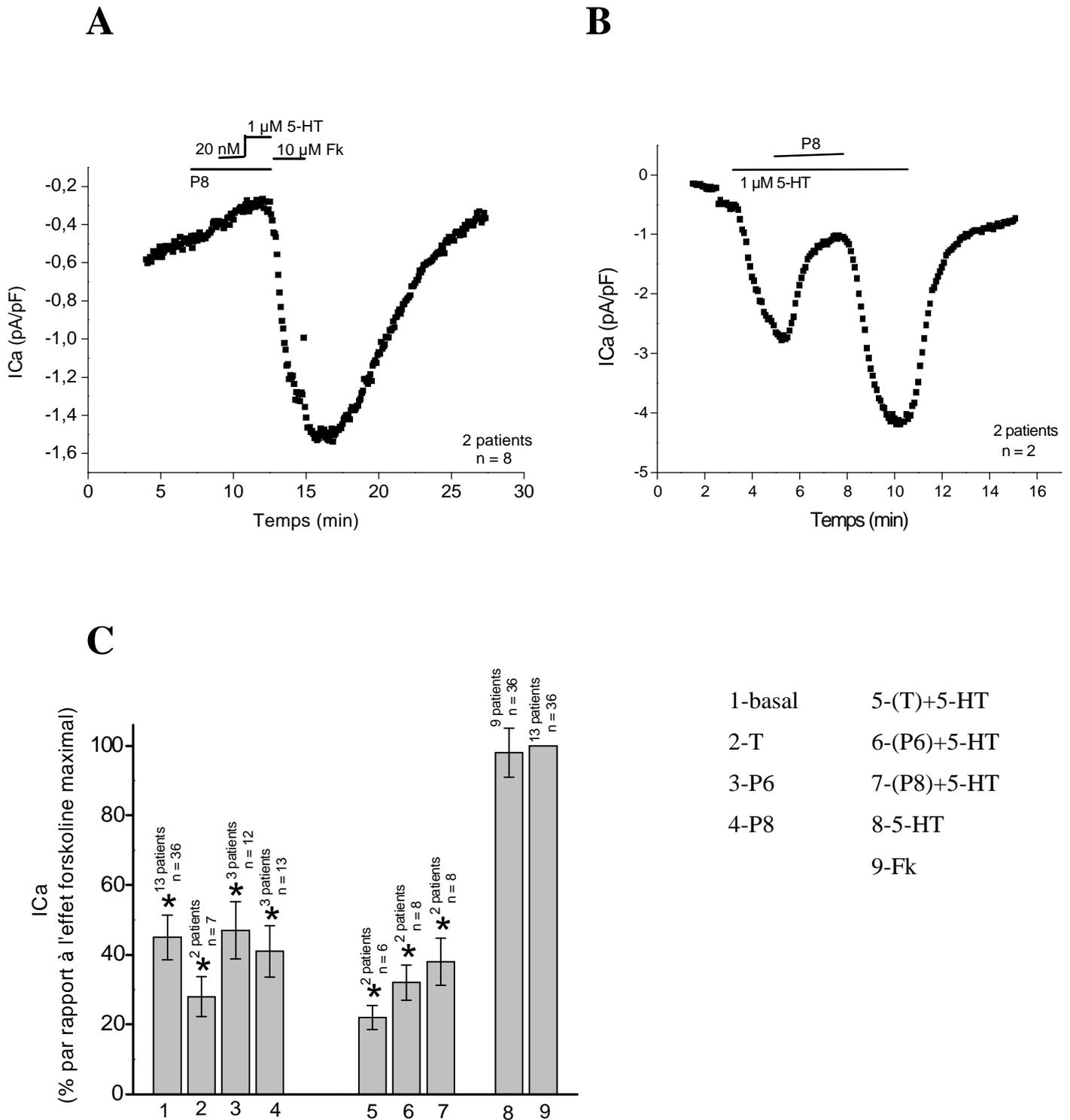


Figure 22 : Effet fonctionnel des fractions d'IgG précipitées sur le courant calcique $I_{Ca_{2+,L}}$ induit par une stimulation sérotoninergique

Evolution du courant $I_{Ca_{2+,L}}$ en fonction du temps au cours de deux protocoles expérimentaux: (A) Application d'IgG du patient P8 puis de 20 nM et 1 μM 5-HT suivi de l'ajout de 10 μM forskoline; (B) Incubation en présence de 5-HT (1 μM) suivie de l'addition d'IgG du patient P8 (dilution : 25); (C) Activité fonctionnelle des différentes fractions d'IgG sur le $I_{Ca_{2+,L}}$ en présence et en absence de 5-HT. Résultats normalisés par rapport à la forskoline : * : $p < 0,05$. T, témoin; P6 et P8, patients atteints de fibrillations auriculaires avec et sans auto-anticorps respectivement; Fk, forskoline.

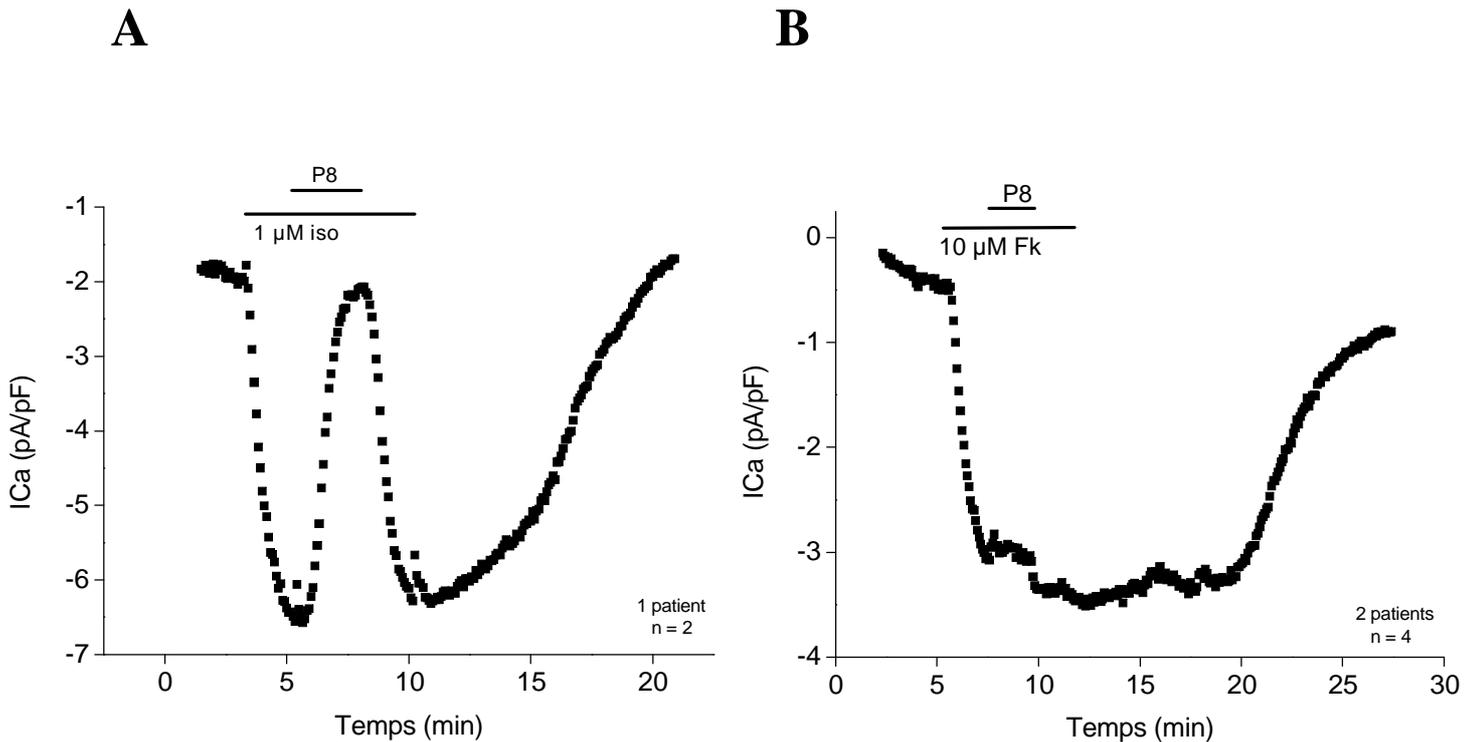


Figure 23 : Effet fonctionnel des fractions d'IgG précipitées du sérum de patient P8 sur le courant calcique suite à une stimulation β -adrénergique et à l'addition de forskoline

Evolution du courant $I_{Ca_{2+}, L}$ au cours du temps en fonction de deux protocoles expérimentaux: (A) Application de $1 \mu\text{M}$ d'isoprotérénol suivi de l'ajout d'IgG du patient P8 (dilution : 25); (B) Incubation de cellules atriales avec $10 \mu\text{M}$ de Forskoline (Fk) suivie de l'addition d'IgG de P8 (dilution : 25).

Les fractions d'IgG précipitées au sulfate d'ammonium contiennent donc un élément qui inhibe le courant calcique de type L stimulé par les voies sérotoninergiques et β -adrénergiques. Les expériences présentées dans la figure 23B permettent d'exclure une action directe de ce facteur sur le canal calcique. Nos données suggèrent plutôt un rôle dans la cascade de transduction avant l'adénylate cyclase.

Ce facteur pourrait être soit une immunoglobuline de type G, soit une substance contaminante (protéine, lipide...). Il semble donc impossible d'observer dans ces conditions une activité fonctionnelle potentielle des auto-anticorps identifiés dans le sérum du patient P6.

C-Conclusions et perspectives

La présence d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur 5-HT_4 dans le sérum de patients atteints de fibrillations auriculaires paroxystiques idiopathiques, a été identifiée pour 2 patients sur 10 étudiés. Dans la littérature l'intervention d'une composante immunitaire

retrouvée lors de cette pathologie est évaluée à 30 % des cas (Frustaci et al., 1997). La proportion établie dans notre étude se rapproche ainsi de celle proposée. Ces résultats valident donc notre hypothèse suivant laquelle le récepteur 5-HT₄ cardiaque serait la cible d'auto-anticorps chez des patients atteints de fibrillations auriculaires idiopathiques.

Les IgG précipitées n'induisent pas de modification du taux basal d'AMPc et n'inhibent pas l'action de la 5-HT (via les mesures d'AMPc). Ces données sont similaires à celles obtenues avec l'anticorps anti-G21V. Ces similitudes d'effets valident donc les résultats de notre étude.

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré que l'anticorps anti-G21V induisait un effet de type antagoniste sur le courant calcique $I_{Ca2+,L}$ suite à une stimulation sérotoninergique (Sallé et al., 2001). Avec les auto-anticorps, nous n'avons pas pu détecter d'activité en raison du facteur contaminant présent dans les fractions IgG précipitées. Cet élément inhibe de façon réversible le courant $I_{Ca2+,L}$ suite à une stimulation sérotoninergique et β -adrénergique et est sans effet sur l'activité de l'adénylate cyclase. Il semble donc agir sur la cascade de transduction en amont de cette enzyme. L'effet inhibiteur pourrait provenir de l'activation d'une protéine G_i au sein de microdomaines de régulation. En effet, il inhibe le courant calcique et ne modifie pas la production globale d'AMPc intracellulaire. La nature de cet élément pourrait être de deux types : 1) soit une IgG qui pourrait induire l'activation d'une protéine G_i et inhiber le courant $I_{Ca2+,L}$, 2) soit un lipide. Suivant la littérature, un facteur inhibant $I_{Ca2+,L}$ semblerait être présent dans des sérums dialysés d'homme et de certains mammifères (Banach et al., 1993a). Il serait également activateur du canal $I_{K,Ach}$ présent sur des myocytes de cobaye (Banach et al., 1993b; Bunemann & Pott, 1993). Cet élément est un sphingolipide qui interagit avec un récepteur membranaire spécifique couplé à une protéine G_i , le récepteur sphingosine-1-phosphate (Tigyi & Miledi, 1992; Banach et al., 1993a; Bunemann & Pott, 1993; Bunemann et al., 1995; Bunemann et al., 1996; Van Koppen et al., 1996; An et al., 2000; Himmel et al., 2000; Liliom et al., 2001). De plus, ce lipide a la propriété de se lier à l'albumine. Il est donc plausible qu'une fraction contaminante d'albumine ait précipité avec les IgG lors du traitement des sérums de patients au sulfate d'ammonium (33 %).

Afin de poursuivre et d'affiner cette étude, il serait nécessaire de sélectionner de nouveau des sérums de patients atteints de fibrillations auriculaires paroxystiques idiopathiques. Le nombre de patients étudiés devra être plus grand ainsi que les volumes de sérums pour pouvoir purifier les immunoglobulines de type G par affinité contre le peptide G21V.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES

Nos travaux ont permis pour la première fois de montrer qu'un anticorps dirigé contre la seconde boucle extracellulaire d'un RCPG cardiaque pouvait avoir des effets fonctionnels variés sur l'activité de son récepteur. En effet, l'anticorps anti-G21V peut agir comme un agoniste, un agoniste inverse ou induire aucun effet sur le récepteur h5-HT_{4(e)} recombinant. Ces actions sont différentes de celles observées avec d'autres anticorps anti-récepteurs RCPG tels que le récepteur β_2 -adrénergique (Mijares et al., 1996b, Lebesgue et al., 1998) et le récepteur M2 muscarinique (Elies et al., 1998, Nascimento et al., 2001). Les caractéristiques fonctionnelles de l'anti-G21V semblent dépendre du type cellulaire étudié et de la densité d'expression du récepteur. Récemment, Peter et al., 2003 a montré que la nature des anticorps pouvait également influencer leur activité fonctionnelle. Nos résultats obtenus en système d'expression, bien que réalisés sur une seule isoforme du récepteur h5-HT₄, pourraient permettre d'évaluer les conséquences physiologiques liées à la fixation de cet anticorps sur son récepteur.

Dans les cardiomyocytes humains, l'anticorps anti-G21V inhibe la réponse sérotoninergique en diminuant l'amplitude du courant calcique sans toutefois modifier le taux d'AMPc intracellulaire. Ces données suggèrent que :

- Des voies de transduction autres que la voie adénylate cyclase/AMPc seraient activées en présence de l'anticorps. Ces cascades modèleraient l'activité du canal calcique (voie GMPc, IP₃/PKC.....)
- Et/ou les récepteurs h5-HT₄ ou une proportion d'entre eux seraient présents autour du canal calcique au sein de microdomaines de régulation.

Nous avons pu également montrer pour la première fois, la présence d'une composante auto-immune dirigée contre le récepteur h5-HT₄ cardiaque chez deux patients sur dix atteints de fibrillation auriculaire d'origine indéterminée. Les fractions IgG précipitées du sérum de ces patients induisent la même réponse cellulaire que l'anticorps anti-G21V sur les myocytes atriaux humains, à savoir : pas de modification du taux d'AMPc intracellulaire suite à une stimulation sérotoninergique. Quel est donc le rôle physiopathologique de ces auto-anticorps ? Sont-ils impliqués dans le maintien des fibrillations auriculaires ? Les fibrillations sont étroitement associées à une surcharge calcique des cellules atriales (Kaumann, 1994 ; Allesie et al., 2002). Parmi les voies de transduction pouvant être stimulées par l'anticorps citées dans la partie 2/conclusion, seule la voie IP₃/PKC pourrait être à l'origine d'une accumulation de calcium intracellulaire. En effet, la PKC inhiberait le canal calcique pendant que l'IP₃

Conclusions et perspectives générales

provoquerait une libération du calcium contenu dans le RS. Toutefois, cette charge calcique intracellulaire serait-elle suffisante pour provoquer ou maintenir des arythmies auriculaires ? Cette composante auto-immune pourrait à l'inverse avoir un rôle de protection cardiaque et/ou de régulation des effets arythmogènes provoqués par le récepteur h5-HT₄. Ce récepteur est toujours associé à des réponses arythmogènes contrairement au récepteur β-adrénergique. Par conséquent, si les anticorps inhibent l'activité sérotoninergique sur les cellules atriales, ils auront un effet bénéfique en diminuant les arythmies auriculaires. Il reste cependant à comprendre pourquoi et comment le récepteur h5-HT₄ est impliqué dans des arythmies auriculaires, alors que les récepteurs β-adrénergiques ne le sont que rarement.

Nos résultats nous ont permis de proposer un modèle d'action du récepteur h5-HT₄ cardiaque. Ce dernier s'appliquerait exclusivement dans un contexte physiopathologique. Lors d'agrégation plaquettaire par exemple, la sérotonine sera libérée abondamment dans la circulation sanguine. Les récepteurs h5-HT₄ seront activés par de fortes concentrations de 5-HT, de l'ordre du micromolaire. Ils provoqueront une augmentation importante du taux d'AMPC intracellulaire. Cette augmentation sera cependant plus faible que celle provoquée par une stimulation β-adrénergique. Par conséquent lors d'une stimulation sérotoninergique, le recaptage du calcium dans le RS sera plus modéré. En effet, la quantité d'AMPC produite étant plus petite, les protéines PKA seront donc moins activées. Les phospholambanes seront moins phosphorylés et les protéines SERCA seront moins actives. Si le recaptage du calcium est plus faible, alors la quantité de Ca²⁺ libéré du RS via le récepteur de la ryanodine RyR sera également plus petite. Les protéines contractiles seront donc moins activées et la force de contraction développée sera plus faible lors d'une stimulation sérotoninergique par rapport à une stimulation β-adrénergique.

Parallèlement, les récepteurs h5-HT₄ induiront une activité maximale du canal calcique I_{Ca2+,L}. Une élévation importante de la concentration en calcium se produira sous la membrane, probablement au sein de microdomaines de régulation. L'entrée de cet ion provoquera la sortie de calcium du RS par un phénomène de CICR. Ces phénomènes seront similaires lors de stimulations sérotoninergique et β-adrénergique. Cependant, le pourcentage de recapture du calcium par le RS est dépendant de la substance appliquée. En présence de sérotonine, ce mécanisme étant plus faible, il restera donc une quantité de calcium sous-membranaire supérieure à celle détectée en présence d'isoprotérénol. Cette surcharge calcique activera alors l'échangeur Na⁺/Ca²⁺, afin d'extruder le surplus de calcium. Cette protéine transmembranaire a une activité électrogénique. Son activation excessive provoquera la formation d'un courant

Conclusions et perspectives générales

entrant ionique supérieur à la normale. Ce processus pourrait alors être à l'origine d'arythmies auriculaires.

Ce modèle devra être étudié et disséqué afin de connaître la participation de chaque composante (RS, calcium, échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Cette caractérisation permettra de valider ou de réfuter ce mécanisme général d'action du récepteur 5-HT₄ au niveau de la cellule cardiaque dans des conditions pathologiques.

D'autre part, il est indiqué dans la littérature que l'AMPC agit directement sur le canal I_f . Ce second messager active ce courant, nommé courant pacemaker au niveau de l'oreillette (Di Francesco & Tortora, 1991). Dans les myocytes atriaux humains, le récepteur h5-HT₄ induit également l'activation de ce courant. Cette stimulation pourrait alors participer à la genèse ou à la prolongation des arythmies auriculaires (Pino et al., 1998).

Il serait donc intéressant de poursuivre notre projet en étudiant l'activité de l'anticorps anti-G21V et des auto-anticorps sur l'amplitude du courant calcique $I_{\text{Ca}^{2+},\text{L}}$ et du courant I_f après fixation sur le récepteur h5-HT₄, afin de mieux comprendre les phénomènes d'arythmie auriculaire.

Enfin, nous pourrions envisager de vérifier la présence de sphingolipides dans les fractions d'IgG de patients atteints de fibrillations auriculaires paroxystiques idiopathiques et d'analyser leurs effets fonctionnels sur le récepteur sérotoninergique. En effet, ces lipides sont stockés, comme la 5-HT, dans les plaquettes sanguines (Kaumann, 1994 ; Yatomi et al., 1997). Après agrégation et lyse plaquettaire, ces deux substances peuvent donc être libérées simultanément dans la circulation. Les sphingolipides et la 5-HT agissent respectivement sur des récepteurs couplés à la protéine G_i et G_s à la surface des cardiomyocytes humains (Ouadid et al., 1991 ; Himmel et al., 2000). Ces molécules pourraient donc permettre de réaliser par leurs effets opposés, une régulation de l'activité du canal calcique de type L. Les sphingolipides pourraient alors modifier l'action de la sérotonine. Suivant leur cinétique d'action sur les cellules atriales, ces substances (sérotonine-sphingolipides) libérées de façon massive et irrégulière pourraient participer à la genèse et au maintien de la fibrillation auriculaire.

- **Abd Alla S.**, Lothar H., Abdel-Tawab A.M. & Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist (2001) *J Biol Chem* 276 (43), 39721-39726.
- **Adham N.**, Gerald C., Schechter L., Vaysse P., Weinshank R. & Branchek T. [³H]5-hydroxytryptamine labels the agonist high affinity state of the cloned rat 5-HT₄ receptor (1996) *Eur J Pharmacol* 304, 231-235.
- **Alberts B.**, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J.D. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd Edition, New York, 1994.
- **Allessie M.A.** Atrial electrophysiologic remodeling : another vicious circle ? (1998) *J Cardiovasc Electr* 9, 1378-1393.
- **Allessie M.A.**, Ausma J. & Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation (2002) *Cardiovasc Res* 54, 230-246.
- **Alquist R.P.** A study of adrenotropic receptors (1948) *Am J Physiol* 153, 586-600.
- **Altenbach C.**, Cai K., Klein-Seetharaman J., Khorana H.G. & Hubbell W.L. Structure and function in rhodopsin : mapping light-dependent changes in distance between residue 65 in helix TM1 and residues in the sequence 306-319 at the cytoplasmic end of helix TM7 and in helix H8 (2001a) *Biochemistry* 40, 15483-15492.
- **Altenbach C.**, Klein-Seetharaman J., Cai K., Khorana H.G. & Hubbell W.L. Structure and function in rhodopsin : mapping light-dependent changes in distance between residue 316 in helix 8 and residues in the sequence 60-75, covering the cytoplasmic end of helix TM1 and TM2 and their connection loop CL1 (2001b) *Biochemistry* 40, 15493-15500.
- **An S.**, Zheng Y. & Bleu T. Sphingosine-1-phosphate induced cell proliferation, survival, related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5 (2000) *J Biol Chem* 275(1), 288-296.
- **Anderson M.E.** Ca²⁺-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels : is a unifying mechanism at hand ? (2001) *J Mol Cell Cardiol* 3, 639-650.
- **Argibay J.A.**, Fischmeister R. & Hartzell H.C. Inactivation, reactivation and pacing dependence of calcium current in frog cardiocytes : correlation with current density (1988) *J Physiol (London)* 401, 201-226.
- **Arnis S.**, Fahmy K., Hofmann K.P. & Sakmar T.P. A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin (1994) *J Biol Chem* 269 (39), 23879-23881.

- **Attuel P.**, Childers R., Cauchemez B., Poveda J., Mugica J. & Coumel P. Failure in the rate adaptation of the atrial refractory period : its relation-ship to vulnerability (1982) *Int J Cardiol* 2, 179-197.
- **Babcock G.J.**, Farzan M. & Sodroski J. Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor (2003) *J Biol Chem* 278 (5), 3378-3385.
- **Bach T.**, Syversveen T., Kvingedal A.M., Krobert K.A., Brattelid T., Kaumann A.J. & Levy F.O. 5-HT_{4(a)} and 5-HT_{4(b)} receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle (2001) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363, 146-160.
- **Bai M.** Dimerization of G-protein-coupled receptors : roles in signal transduction (2004) *Cell Signal* 16, 175-186.
- **Baldwin J.M.**, Schertler G.F. & Unger V.M. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors (1997) *J Mol Biol* 272, 144-164.
- **Balligand J.L.**, Longrois D., Mebazza A. & Mery P.F. Les affaires de cœur du monoxyde d'azote : les NOS cardiaques (1999) *M&S* 15, 310-318.
- **Banach K.**, Hüser J., Lipp P., Wellner M.C. & Pott L. Activation of muscarinic K⁺ current in guinea-pig atrial myocytes by a serum factor (1993a) *J Physiol (London)* 461, 263-281.
- **Banach K.**, Bünemann M., Hüser J. & Pott L. Serum contains a potent factor that decreases β -adrenergic receptor-stimulated L-type Ca²⁺ current in cardiac myocytes (1993b) *Pflugers Arch* 423, 245-250.
- **Bassani J.W.M.**, Bassani R.A. & Bers D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells : species-dependent differences in cellular mechanisms (1994) *J Physiol* 476, 279-293.
- **Beavo J.A.**, Cyclic nucleotide phosphodiesterases : functional implications of multiple isoforms (1995) *Physiol Rev* 75, 725-748.
- **Beebe S.J.** The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction (1994) *Semin Cancer Biol* 5, 285-294.
- **Beeler G.W.** & Reuter H. Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres (1970) *J Physiol (London)* 207, 191-209.
- **Bernstein L.S.**, Linder M.E. & Hepler J.R. Analysis of RGS protein palmitoylation (2004) *Methods Mol Biol* 237, 195-204.

- **Bers D.M.** & Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes : structure and function in Ca influx and intracellular Ca release (1999) *Cardiovasc Res* 42, 339-360.
- **Bers D.M.** & Ziolo M.T. When is cAMP not cAMP ? Effects of compartmentalization (2001) *Circ Res* 89, 445-452.
- **Bers D.M.** Cardiac excitation-contraction coupling (2002) *Nature* 415, 198-204.
- **Biel M.**, Schneider A. & Wahl C. Cardiac HCN channels : structure, function and modulation (2002) *Trends Cardiovas Med* 12, 206-212.
- **Birnbaumer L.**, Abramowitz J. & Brown A.M. Receptor-effector coupling by G proteins (1990) *Biochim Biophys Acta* 1031, 163-224.
- **Blondel O.**, Vandecasteele G., Gastineau M., Leclerc S., Dahmoune Y., Langlois M. & Fischmeister R. Molecular and functional characterisation of a 5-HT₄ receptor cloned from human atrium (1997) *FEBS Lett* 412, 465-474.
- **Blondel O.**, Gastineau M., Dahmoune Y., Langlois M. & Fischmeister R. Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine₄ receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus (1998a) *J Neurochem* 70, 2252-2261.
- **Blondel O.**, Gastineau M., Langlois M. & Fischmeister R. The 5-HT₄ receptor antagonist ML10375 inhibits the constitutive activity of human 5-HT_{4(c)} receptor (1998b) *Br J Pharmacol* 124,1-3.
- **Bockaert J.** & Pin J.P. Use of a G protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success (1998) *CR Acad Sci III* 321, 529-551.
- **Bockaert J.** & Pin J.P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors : an evolutionary success (1999) *EMBO J* 18, 1723-1729.
- **Bockaert J.**, Marin P., Dumuis A. & Fagni L. The 'magic tail' of G protein-coupled receptors : an anchorage for functional protein network (2003) *FEBS Lett* 546 (1), 65-72.
- **Bockaert J.**, Claeysen S., Compan V. & Dumuis A. 5-HT(4) receptors (2004) *Curr Drug Target CNS Neurol Disord* 3(1), 39-51.
- **Borda E.**, Pascual J., Cossio P., De La Vega M., Arana R. & Sterin-Borda L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity (1984) *Clin Exp Immunol* 57, 679-686.
- **Bosch R.F.**, Zeng X., Grammer J.B., Popovic K., Mewis C. & Kuhlkamp V. Ionic mechanism of electrical remodeling in human atrial fibrillation (1999) *Cardiovasc Res* 44, 121-131.

- **Bounhoure** J.P. La fibrillation auriculaire (2000) *Supplément A.I.M* 38-41.
- **Bourinet** E., Fournier F., Lory P., Charney P. & Nargeot J. Protein kinase C regulation of cardiac calcium channels expressed in xenopus oocytes (1992) *Pflugers Arch* 421(2-3), 247-255.
- **Bouvier** M. Oligomerization of G protein-coupled transmitter receptors (2001) *Nat Rev Neurosci* vol 2 (4), 274-286.
- **Branchek** T.A. 5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT₇: molecular pharmacology of adenylate cyclase stimulating receptors (1995) *Neuroscience* 7, 375-382.
- **Bridge** J.H.B., Ershler P.R. & Cannell M.B. Properties of Ca²⁺ sparks evoked by action potentials in mouse ventricular myocytes (1999) *J Physiol* 518, 469-478.
- **Brodde** O.E. Beta adrenoceptors in cardiac disease (1993) *Pharmacol Ther* 60, 405-430.
- **Brodde** O.E., Michel M.C. & Zerkowski H.R. Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure (1995) *Cardiovasc Res* 30, 570-584.
- **Brodde** O.E. & Michel M.C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart (1999) *Pharmacol Rev* 51, 651-690.
- **Brundel** B.J., Van Gelder I.C., Henning R.H., Tuinenburg A.E., Deelman L.E., Tieleman R.G., Grandjean J.G., Van Gilst W.H. & Crijns H.J. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation (1999) *Cardiovasc Res* 42, 443-454.
- **Bunemann** M. & Pott L. Membrane-delimited activation of muscarinic K current by an albumin-associated factor in guinea-pig atrial myocytes (1993) *Pflugers Arch* 425(3-4), 329-334.
- **Bunemann** M., Brandts B., Heringdorf D.M., Koppen C.J., Jakobs K.H. & Pott L. Activation of muscarinic K⁺ current in guinea-pig atrial myocytes by sphingosine-1-phosphate (1995) *J Physiol (London)* 489(3), 701-707.
- **Bunemann** M., Liliom K., Brandts B.K., Pott L., Tseng J.L., Desiderio D.M., Sun G., Miller D. & Tigyi G. A novel membrane receptor with high affinity for lysosphingomyelin and sphingosine-1-phosphate in atrial myocytes (1996) *EMBO J* 15(20), 5527-5534.
- **Bunemann** M., Lee K.B., Pals-Rylaarsdam R., Roseberry A.G. & Hosey M.M. Desensitization of G protein-coupled receptors in the cardiovascular system (1999) *Annu Rev Physiol* 61, 169-192.

- **Buyon J.P.**, Ben-Chetrit E., Karp S., Roubey R.A., Pompeo L., Reeves W., Tan E.M. & Winchester R. Acquired congenital heart block. pattern of maternal antibodies response to biochemically defined antigens of the SSA/Ro-SSB/La system in neonatal lupus (1989) *J Clin Invest* 84(2), 627-634.
- **Caforio A.L.**, Goldman J.H., Haven A.J., Baig K.M. & McKenna W.J. Evidence for autoimmunity to myosin and other heart-specific autoantigens in patients with dilated cardiomyopathy and their relatives (1996) *Int J Cardiol* 54, 157-163.
- **Cannell M.B.** & Soeller C., Sparks of interest in cardiac excitation-contraction coupling (1998) *TiPS* 19, 16-20.
- **Carafoli E.** & Brini M. Calcium pumps : structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport (2000) *Curr Opin Chem Biol* 4, 152-161.
- **Caulfield M.P.** Muscarinic receptors-characterization, coupling and function (1993) *Pharmacol Ther* 58, 319-379.
- **Cens T.**, Restituto S., Vallentin A. & Charnet P. Promotion and inhibition of L-type Ca²⁺ channel facilitation by distinct domains of the subunit (1998) *J Biol Chem* 273, 18308-18315.
- **Chamberlain P.D.**, Jennings K.H., Paul F., Cordell J., Berry A., Holmes S.D., Park J., Chambers J., Sennitt M.V., Stock M.J., Cawthorne M.A., Young P.W. & Murphy G.J. The tissue distribution of the human beta3-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody : direct evidence of the beta3-adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle (1999) *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 1057-1065.
- **Cheng H.**, Lederer W.J. & Cannell M.B. Calcium sparks : elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle (1993) *Science* 262, 740-744.
- **Cheng Z.J.** & Miller L.J. Agonist-dependent dissociation of oligomeric complexes of G protein-coupled cholecystokinin receptors demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (2001) *J Biol Chem* 276 (51), 48040-48047.
- **Cheng H.J.**, Zhang Z.S., Onishi K., Ukai T., Sane D.C. & Cheng C.P. Upregulation of functional β_3 -adrenergic receptor in the failing canine myocardium (2001) *Circ Res* 89, 599-606.
- **Chidiac P.**, Hebert T.E., Valiquette M., Dennis M. & Bouvier M. Inverse agonist activity of β -adrenergic antagonist (1994) *Mol Pharmacol* 45, 490-499.

- **Claeysen S.**, Faye P., Sebben M., Lemaire S., Bockaert J. & Dumuis A. Cloning and expression of human 5-HT_{4s} receptors. Effect of receptor density on their coupling to adenylyl cyclase (1997) *Neuroreport* 8, 3189-3196.
- **Claeysen S.**, Sebben M., Becamel C., Bockaert J. & Dumuis A. Novel brain-specific 5-HT₄ receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain (1999) *Mol Pharmacol* 55, 910-920.
- **Claeysen S.**, Sebben M., Becamel C., Eglen R.M., Clark R.D., Bockaert J. & Dumuis A. Pharmacological properties of 5-Hydroxytryptamine₄ receptor antagonists on constitutively active wild-type and mutated receptors (2000) *Mol Pharmacol* 58, 136-144.
- **Claeysen S.**, Sebben M., Becamel C., Parmentier M.L., Dumuis A. & Bockaert J. Constitutively active mutants of 5-HT₄ receptors are they in unique active states ? (2001) *EMBO Rep* 2, 61-67.
- **Colledge M.** & Scott J.D. AKAPs : from structure to function (1999) *Trends Cell Biol* 9, 216-221.
- **Colquhoun D.** Affinity, efficacy and receptor classification : is the classical theory still useful ? In : Perspectives on hormones receptor classification. Ed Black.J.W. : Jenkinson D.H. & Gerskowitch V.P. (1987) *Alan R Liss Inc New York*, pp 103-114.
- **Colquhoun D.** Binding, gating, affinity and efficacy (1998) *Br J Pharmacol* 125, 923-947.
- **Conti M.** & Jin S.L. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases (2000) *Prog Nucleic Acid Re* 63, 1-38.
- **Cooper D.M.F.**, Mons N. & Karpen J.W. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling (1995) *Nature* 374, 421-424.
- **Coraboeuf E.** & Weidmann S. Temperature effects on the electrical activity of Purkinje fibres (1954) *Helv Physiol Pharmacol Acta* 12(1), 32-41.
- **Coraboeuf E.** & Otsuka M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères (1956) *C.R Acad Sci Paris* 243, 441-444.
- **Cordeaux Y.** & Hill S.J. Mechanisms of cross-talk between G protein-coupled receptors (2002) *Neurosignals* 11, 45-47.
- **Cornea A.**, Janovick J.A., Maya-Nunez G. & Conn P.M. Gonadotropin releasing hormone receptor microaggregation. Rate monitored by fluorescence resonance energy transfer (2001) *J Biol Chem* 276 (3), 2153-2158.

- **Costa T.** & Hertz A. Antagonists with negative intrinsic activity at δ opioid receptors and GTP-binding regulatory proteins in native membranes : specific regulation by antagonists and sodium ions (1989) *Mol Pharmacol* 37, 383-394.
- **Cotoi S.,** Gavrilesco S., Pop T. & Vicas E. The prognostic value of right atrium monophasic action potential after conversion of atrial fibrillation (1972) *Eur J Clin Invest* 2, 472-474.
- **Daaka Y.,** Luttrell L.M. & Lefkowitz R.J. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A (1997) *Nature* 390, 88-91.
- **Daeffler L.** & Landry Y. Inverse agonism at heptahelical receptors : concept, experimental approach and therapeutic potential (2000) *Fund Clin Pharmacol* 14, 73-87.
- **Dai S.,** Klugbauer N., Zong X., Seisenberger C. & Hofmann F. The role of subunit composition on prepulse facilitation of the cardiac L-type calcium channel (1999) *FEBS Lett* 442, 70-74.
- **Dale H.H.,** The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine (1914) *J Pharmacol Exp Ther* 6, 147-190.
- **Davare M.A.,** Avdonin V., Hall D.D., Peden E.M., Burette A., Weinberg R.J., Horne M.C., Hoshi T. & Hell J.W. A β_2 -adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca^{2+} channel Cav1.2 (2001) *Science* 293, 98-101.
- **De Jongh K.S.,** Warner C., Colvin A.A. & Catterall W.A. Characterization of two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10778-10782.
- **De Jongh K.S.,** Murphy B.J., Colvin A.A., Hell J.W. Takahashi M. & Catterall W.A. Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase (1996) *Biochemistry* 35, 10392-10402.
- **De Lean A.,** Stradel J.M. & Lefkowitz R.J. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor (1980) *J Biol Chem* 255, 7108-7117.
- **De Leon M.,** Wang Y., Jones L., Perez-Reyes E., Wei X., Soong T.W., Snutch T.P. & Yue D.T. Essential Ca^{2+} binding motif for Ca^{2+} sensitive inactivation of L-type Ca^{2+} channels (1995) *Science* 270, 1502-1506.

- **De Ligt** R.A., Kourounakis A.P. & Ijzerman A.P. Inverse agonism at G protein-coupled receptors : (patho)physiological relevance and implications for drug discovery (2000) *Brit J Pharmacol* 130, 1-12.
- **De Tombe** P.P. Cardiac myofilaments : mechanics and regulation (2003) *J Biochem* 36(5), 721-730.
- **Defer** N., Best-Belpomme M. & Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase (2000) *Am J Physiol- Renal* 279, F400-416.
- **Del Castillo** J. & Katz B. Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives (1957) *Proc R Soc Lond B Biol Sci B* 146, 369-381.
- **Delgado** C., Artiles A., Gomez A.M. & Vassort G. Frequency-dependent increase in cardiac Ca^{2+} current is due to reduced Ca^{2+} release by the sarcoplasmic reticulum (1999) *J Mol Cell Cardiol* 31, 1783-1793.
- **Dessauer** C., Tesmer J., Sprang S. & Gilman A. The interactions of adenylate cyclases with P-sites inhibitors (1999) *Trends Pharmacol SCI* 20, 205-209.
- **Devic** E., Xiang Y., Gould D. & Kobilka B. β -adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from β_1 and β_2 adrenoceptor knockout mice (2001) *Mol Pharmacol* 60, 577-583.
- **Di Francesco** D. & Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP (1991) *Nature* 351, 145-147.
- **Dipla** K., Mattiello J.A., Margulies K.B., Jeevanandam V. & Houser S.R. The sarcoplasmic reticulum and the Na^+/Ca^{2+} exchanger both contribute to the Ca^{2+} transient of failing human ventricular myocytes (1999) *Circ Res* 84, 435-444.
- **Dodge** K.L., Khouangsathiene S., Kapiloff M.S., Mouton R., Hill E., Houslay M.D., Langeberg L.K. & Scott J.D. mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module (2001) *EMBO J* 20, 1921-1930.
- **Dolphin** A.C. Facilitation of Ca^{2+} current in excitable cells (1996) *Trends Neurosci* 19, 35-43.
- **Dulhunty** A.F. & Pouliquin P. What we don't know about the structure of ryanodine receptor calcium release channels (2003) *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30, 713-723.
- **Dumuis** A., Bouhelal R., Sebben M., Cory M. & Bockaert J. A non-classical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system (1988) *Mol Pharmacol* 34, 880-887.

- **Eftekhari P.**, Sallé L., Lezoualc'h F., Mialet J., Gastineau M., Briand J-P., Isenberg D.A., Fournie G.J., Argibay J., Fischmeister R., Muller S. & Hoebeke J. Anti-SSA/Ro52 autoantibodies blocking the cardiac 5-HT₄ serotonergic lupus congenital heart block (2000) *Eur J Immunol* 30, 2782-2790.
- **Egger M.** & Niggli E. Paradoxical block of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger by extracellular protons in guinea-pig ventricular myocytes (2000) *J Physiol (London)* 523, 353-366.
- **Eglen R.M.**, Wong E.H.F., Dumuis A. & Bockaert J. Central 5-HT₄ receptors (1995) *Trends Pharmacol SCI* 16, 391-398.
- **Eglen R.M.**, Hedge S.S. & Watson N. Muscarinic receptor subtype and smooth muscle function (1996) *Pharmacol Rev* 48, 531-565.
- **Eisner D.A.**, Trafford A.W., Diaz M.E., Overend C.L & O'Neill S.C. The control of Ca release from the cardiac sarcoplasmic reticulum : regulation versus autoregulation (1998) *Cardiovasc Res* 38, 589-604.
- **Elies R.**, Ferrari I., Wallukat G., Lebesgue D., Chiale P., Elizari M., Rosenbaum M., Hoebeke J. & Levin M.J. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease (1996) *J Immunol* 157, 4203-4211.
- **Elies R.**, Fu L.X., Eftekhari P., Wallukat G., Schulze W., Granier C., Hjalmarson A. & Hoebeke J. Immunochemical and functional characterization of an agonist-like monoclonal antibody against the M2 acetylcholine receptor (1998) *Eur J Biochem* 251, 659-666.
- **Ertel E.A.**, Campbell K.P., Harpold M.M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snuth T.P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R.W. & Catterall W.A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels (2000) *Neuron* 25, 533-535.
- **Fabiato A.** & Fabiato F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells (1975) *J Physiol (London)* 249, 469-495.
- **Fabiato A.** Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum (1983) *Am J Phys* 245, C1-C14.
- **Fabiato A.** Stimulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell (1985) *J Gen Physiol* 85, 291-320.

- **Farahbakhsh** Z.T, Hideg K. & Hubbell W.L. Photoactivated conformational changes in rhodopsin : a time-resolved spin label study (1993) *Science* 262, 1416-1419.
- **Fatt** P. & Katz B., The electrical properties of crustacean muscle fibers (1953) *J Physiol (London)* 120, 171-204.
- **Fedida** D., Noble D. & Spindler A.J. Use-dependent reduction and facilitation of Ca²⁺ current in guinea-pig myocytes (1988) *J Physiol (London)* 405, 439-460.
- **Feliciello** A., Gottesman M.E & Avvedimento E.V. The biological functions of A-kinase anchor proteins (2001) *J Mol Biol* 308, 99-114.
- **Ferrari** I., Levin M.J., Wallukat G., Elies R., Lebesgue D., Chiale P., Elizari M., Rosenbaum M. & Hoebcke J. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of trypanosoma cruzi and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor (1995) *J Exp Med* 182, 59-65.
- **Findlay** I. β -adrenergic stimulation modulates Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channel currents in guinea-pig ventricular myocytes (2002) *J Physiol (London)* 541(3), 741-751.
- **Findlay** I. Physiological modulation of inactivation in L-type Ca²⁺ channels : one switch (2003) *J Physiol (London)* 554(2), 275-283.
- **Fink** M.A., Zakhary D.R., Mackey J.A., Desnoyer R.W., Apperson-Hansen C., Damron D.S. & Bond M. AKAP-mediated targeting of protein kinase a regulates contractility in cardiac myocytes (2001) *Circ Res* 88, 291-297.
- **Fischmeister** R. & Hartzell H.C. Mechanism of action of acetylcholine on calcium current in single cells from frog ventricle (1986) *J Physiol (London)* 376, 183-202.
- **Flaker** G.C., Blackshear J.L., McBride R., Kronmal R.A., Halperin J.L. & Hart R.G. Antiarrhythmic drug therapy and cardiac mortality in atrial fibrillation. The stroke prevention in atrial fibrillation investigators (1992) *J AM Coll Cardiol* 20, 527-532.
- **Fong** T.M. Mechanistic hypotheses for the activation of G protein-coupled receptors (1996) *Cell Signal* 8, 217-224.
- **Franke** R.R., Konig B., Sakmar T.P., Khorana H.G. & Hofmann K.P. Rhodopsin mutants that bind but fail to activate transduction (1990) *Science* 250, 123-125.
- **Franz** M.R., Karasik P.L., Li C., Moubarak J. & Chavez M. Electrical remodeling of the human atrium : similar effects in patients with chronic atrial fibrillation and atrial flutter (1997) *J Am Coll Cardiol* 30, 1785-1792.

- **Franzini-Armstrong** C. & Protasi F. Ryanodine receptors of striated muscles : a complex channel capable of multiple interactions (1997) *Physiol Rev* 77, 699-729.
- **Fruen** B.R., Bardy J.M., Byrem T.M., Strasburg G.M. & Louis C.F. Differential Ca^{2+} sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin (2000) *Am J Phys* 279, C724-C733.
- **Frustaci** A., Chimenti C., Bellocci F., Morgante E., Russo A.M. & Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation (1997) *Circulation* 96, 1180-1184.
- **Fu** L.X., Magnusson Y., Bergh C.H., Liljeqvist J.A., Waagstein F., Hjalmarson A. & Hoebcke J. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy (1993) *J Clin Invest* 91, 1964-1968.
- **Fu** M.L. Anti-peptide antibodies against an autoimmune epitope on human muscarinic receptor mimic functional autoantibodies against the same epitope in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy (1995) *Eur Heart J* 16 Suppl O:89-91.
- **Fujioka** Y., Komeda M. & Matsuoka S. Stoichiometry of Na^{+} - Ca^{2+} exchange in inside-out patches excised from guinea-pig ventricular myocytes (2000) *J Physiol (London)* 523, 339-351.
- **Fukuda** N., Sasaki D., Ishiwata S., & Kurihara S. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle (2001) *Circ Res* 104, 1639-1645.
- **Furchgott** R.F. The use of β -halohalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes (1966) *Adv Drug Res* 3, 21-55.
- **Galazka** A. Immunologie générale (1993) Organisme Mondial de la Santé.
- **Gao** T., Yatani A., Dell'Acqua M.L., Sako H., Green S.A., Dascal N., Scott J.D. & Hosey M.M. cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channels subunits (1997) *Neuron* 19, 185-196.
- **Gaspo** R., Sun H., Fareh S., Levi M., Yue L., Allen B.G., Hebert T.E. & Nattel S. Dihydropyridine and beta adrenergic receptor binding in dogs with tachycardia-induced atrial fibrillation (1999) *Cardiovasc Res* 42, 434-442.
- **Gauthier** C., Leblais V., Kobzik L., Trochu J.N., Khandoudi N., Bril A., Balligand J.L. & Le Marec H. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is

mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle (1998) *J Clin Invest* 102, 1377-1384.

- **Gauthier C.**, Langin D. & Balligand J.L. β_3 -adrenoceptors in the cardiovascular system (2000) *Trends Pharmacol SCI* 21, 426-431.
- **George S.R.**, Lee S.P., Varghese G., Zeman P.R., Seeman P., Ng G.Y.K. & O'Dowd B.F. A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization (1998) *J Biol Chem* 273 (46), 30244-30248.
- **George S.R.**, Fan T., Xie Z., Tse R., Tam V., Varghese G. & O'Dowd B.F. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties (2000) *J Biol Chem* 275 (34), 26128-26135.
- **George S.R.**, O'Dowd B.F. & Lee S.P. G protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery (2002) *Nat Rev Drug Discov* 1 (10), 808-820.
- **Georget M.**, Mateo P., Vandecasteele G., Lipskaia L., Defer N., Hanoune J., Hoerter J., Lugnier C. & Fischmeister R. Cyclic AMP compartmentation due to increased cAMP-phosphodiesterase activity in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8) (2003) *FASEB J* 17, 1380-1391.
- **Gerald C.**, Adham N., Kao H.T., Olsen M.A., Laz T.M., Schechter L.E., Bard J.A., Vaysse P.J., Hartig P.R., Branchek T.A. et al. The 5-HT₄ receptor : molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variant (1995) *EMBO J* 14, 2806-2815.
- **Gerhart C.C.** & Van Heerikhuizen H. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors (1997) *Eur J Pharmacol* 334, 1-23.
- **Gether U.**, Lin S. & Kobilka B.K. Fluorescent labeling of purified beta2-adrenergic receptor : evidence for ligand-specific conformational changes (1995) *J Biol Chem* 270, 28268-28275.
- **Gether U.**, Lin S., Ghanouni P., Ballesteros J.A., Weinstein H. & Kobilka B.K. Agonist induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor (1997) *EMBO J* 16, 6737-6747.
- **Gether U.** Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors (2000) *Endocr Rev* 21, 90-113.
- **Gether U.**, Asmar F., Meinild A.K. & Rasmussen G.F. Structural basis for activation of G protein-coupled receptors (2002) *Pharmacol Toxicol* 91, 304-312.

- **Ghanouni** P., Steenhuis J.J. Farrens D.L. & Kobilka B.K. Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5997-6002.
- **Gilman** A.G. G proteins : transducers of receptor-generated signals (1987) *Annu Rev Biochem* 56, 615-649.
- **Giros** B. Les kinases couplées aux protéines G : désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques et régulation de l'activité cardiaque (1998) *M&S* 14, 210-214.
- **Goin** J.C., Borda E., Leiros C.P., Storino R. & Sterin-Borda L. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease : pathological implications (1994) *J Auton Nerv Syst* 47, 45-52.
- **Gong** H., Sun H., Koch W.J., Rau T., Eschenhagen T., Ravens U., Heubach J.F., Adamson D.L. & Harding S.E. Specific β_2 AR blocker ICI 118551 actively decreases contraction through a G_i -coupled form of the β_2 AR in myocytes from failing human heart (2002) *Circulation* 105, 2497-2503.
- **Gorbunova** Y.V. & Spitzer N.C. Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca^{2+} spikes (2002) *Nature* 418, 93-96.
- **Grammer** J.B., Zeng X., Bosch R.F. & Kühlkamp V. Atrial L-type Ca^{2+} -channel, β -adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation (2001) *Basic Res Cardiol* 96, 82-90.
- **Gudermann** T., Schöneberg T. & Schultz G. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors (1997) *Annu Rev Neurosci* 20, 399-427.
- **Guenard** H. Physiologie humaine, Pradel, 2^{ème} édition, 1996.
- **Guo** W., Shi L. & Javitch J.A. The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer (2003) *J Biol Chem* 278 (7), 4385-4388.
- **Gurney** A.M., Charnet P., Pye J.M. & Nargeot J. Augmentation of cardiac calcium current by flash photolysis of intracellular caged- Ca^{2+} molecules (1989) *Nature* 341, 65-68.
- **Hamill** O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. & Sigworth F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches (1981) *Pluvers Arch* 391, 85-100.
- **Hartzell** H.C. & Fischmeister R. Effect of forskolin and acetylcholine on calcium current in single isolated cardiac myocytes (1987) *Mol Pharmacol* 32, 639-645.

- **Hartzell** H.C. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems (1988) *Prog Biophys Mol Bio* 52, 165-247.
- **Hatem** S., Marty I., Villaz M. & Charlemagne D. De nouveaux partenaires dans l'intimité du couple canal calcique de type L-récepteur de la ryanodine dans le muscle cardiaque (1999) *M&S* 15, 338-344.
- **Hausdorff** W.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. Turning off the signal : desensitization of beta-adrenergic receptor function (1990) *FASEB J* 4(11), 2881-2889.
- **Hegde** S.S. & Eglén R.M. Peripheral 5-HT₄ receptors (1996) *FASEB J* 10, 1398-1407.
- **Hepler** J.R. Emerging roles for RGS proteins in cell signalling (1999) *Trends Pharmacol SCI* 20, 376-382.
- **Herbert** T.E., Moffett S., Morello J.P., Loisel T.P., Bichet D.G., Barret C. & Bouvier M. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation (1996) *J Biol Chem* 271 (27), 16384-16392.
- **Hermans** E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G protein-coupled receptors (2003) *Pharmacol Ther* 99 (1), 25-44.
- **Herzig** S. & Neumann J. Effects of serine-threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes (2000) *Physiol Rev* 80, 173-210.
- **Hess** P. & Tsien R.W. Mechanism of ion permeation through calcium channels (1984) *Nature* 309, 453-456.
- **Hill** A.V. The mode of action of nicotine and curari determined by the form of the contraction curve and the method of temperature coefficients (1909) *J Physiol (London)* 39, 361-373.
- **Hille** B. Ionic channel of excitable membranes (1992) *Sinauer Associate INC, second Edition*.
- **Himmel** H.M., Heringdorf D.M., Graf E., Dobrev D., Kortner A., Schüler S., Jakobs K.H. & Ravens U. Evidence for Edg-3 receptor-mediated activation of I_{K,Ach} by sphingosine-1-phosphate in human atrial cardiomyocytes (2000) *Mol Pharmacol* 58, 449-454.
- **Hobbs** A.J., Soluble guanylate cyclase : the forgotten sibling (1997) *Trends Pharmacol Sci* 18(12), 484-491.
- **Hoebcke** J. La seconde boucle extracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G : une cible préférentielle pour des auto-anticorps fonctionnels (1995) *M&S* 11, 1661-1667.

- **Hoffman** B.B. & Lefkowitz R.J. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (1996) 9th edition, pp 199-248.
- **Hofmann** F., Lacinova L. & Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels : from structure to function (1999) *Rev Physiol Bioch P* 139, 33-87.
- **Hollinger** S. & Hepler J.R. Methods for measuring RGS protein phosphorylation by G protein-regulated kinases (2004) *Methods Mol Biol* 237, 205-219.
- **Houslay** M.D. & Milligan G. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity (1997) *Trends Biochem Sci* 22(6), 217-224.
- **Hulme** J.T., Ahn M., Hauschka S.D., Scheuer T. & Catterall W.A. A novel leucine zipper targets AKAP15 and cyclic AMP-dependent protein kinase to the C-terminus of the skeletal muscle Ca²⁺ channel and modulates its function (2001) *J Biol Chem* 277, 4079-4087.
- **Hunyady** L., Vauquelin G. & Vanderheyden P. Agonist induction and conformational selection during activation of a G protein-coupled receptor (2003) *Trend Pharmacol* 24 (2), 81-86.
- **Hurley** J.H., Cahill A.L., Currie K.P. & Fox A.P. The role of dynamic palmitoylation in Ca²⁺ channel inactivation (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9293-9298.
- **Ishii** M. & Kurachi Y., Physiological actions of regulators of G-protein signalling (RGS) proteins (2003) *Life SCI* 74, 163-171.
- **Jahnel** U., Rupp J., Ertl R. & Nawrath H. Positive inotropic response to 5-HT in human atrial but not in ventricular heart muscle (1992) *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 346, 482-485.
- **Jalili** T., Takeishi Y. & Walsh R.A. Signal transduction during cardiac hypertrophy : the role of G alpha q, PLC beta I, and PKC (1999) *Cardiovasc Res* 44, 5-9.
- **Jensen** A.D., Guarnieri F., Rasmussen S.G., Asmar F., Ballesteros J.A. & Gether U. Agonist-induced conformational changes at the cytoplasmic side of TM6 in the beta 2 adrenergic receptor mapped by site-selective fluorescent labeling (2001) *J Biol Chem* 276, 9279-9290.
- **Ji** T.H., Grossmann M., & Ji I. G protein-coupled receptors. Diversity of receptor-ligand interactions (1998) *J Biol Chem* 273, 17299-17302.
- **Jiang** L.H., Gawler D.J., Hodson N., Milligan C.J., Pearson H.A., Porter V. & Wray D. Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase (2000) *J Biol Chem* 275, 6135-6143.

- **Jiang** Y., Ruta V., Chen J., Lee A. & MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel (2003a) *Nature* 423(6935), 42-48.
- **Jiang** Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T. & MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel (2003b) *Nature* 423(6935), 33-41.
- **Joubert** L., Claeysen S., Sebben M., Bessis A.S., Clark R.D., Martin R.S., Bockaert J. & Dumuis A. A 5-HT₄ receptor transmembrane network implicated in the activity of inverse agonists but not agonists (2002) *J Biol Chem* 277 (28), 25502-25511.
- **Kapiloff** M.S. Contributions of protein kinase A anchoring proteins to compartmentation of cAMP signaling in the heart (2002) *Mol Pharmacol* 62, 193-199.
- **Karnik** S.S., Gogonea C., Patil S., Saad Y. & Takezako T. Activation of G-protein-coupled receptors : a common molecular mechanism (2003) *Trends Endocrin Met* 14 (9), 431-437.
- **Kaumann** A.J., Sanders L., Brown A.M., Murray K.J. & Brown M.J. A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium (1990) *Br J Pharmacol* 100, 879-885.
- **Kaumann** A.J. Piglet atrial 5-HT receptors resemble human atrial 5-HT₄ -like receptors (1991) *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342, 619-622.
- **Kaumann** A.J. & Sanders L. 5-hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium : facilitation by chronic β-adrenoceptor blockade. (1994) *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349, 331-337.
- **Kaumann** A.J. Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias? (1994) *Trends Pharmacol SCI* 15, 451-455.
- **Kaumann** A.J., Lynham J.A. & Brown A.M. Comparison of the densities of the 5-HT₄ receptors, β₁- and β₂-adrenoceptors in human atrium: functional implications (1995) *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353, 592-595.
- **Kaumann** A.J., Engelhardt S., Hein L., Molenaar P. & Lohse M. Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double β₁ /β₂-adrenoceptor knockout mice (2001) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363, 87-93.
- **Kenakin** T., Morgan P. & Lutz M. On the importance of the 'antagonist assumption' to how receptors express themselves (1995) *Biochem Pharmacol* 50, 17-26.
- **Kenakin** T. Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor / G protein stoichiometry (1997) *Trends Pharmacol SCI* 18, 456-464.

- **Kenakin** T. Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation (2001) *FASEB J* 15, 598-611.
- **Kilts** J.D., Gerhardt M.A., Richardson M.D., Sreeram G., Mackensen B., Grocott H.P., White W.D., Davis R.D., Newman M.F., Reves J.G., Schwinn D.A. & Kwatra M.M. β_2 -adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G_s and G_i (2000) *Circ Res* 87, 705-709.
- **Kim** G.D., Adie E.J. & Milligan G. Quantitative stoichiometry of the proteins of the stimulatory arm of the adenylyl cyclase cascade in neuroblastoma x glioma hybrid, NG108-15 cells (1994) *Eur J Biochem* 219, 135-143.
- **Kitamura** T., Onishi K., Dohi K., Okinaka T., Isaka N. & Nakano T. The negative inotropic effect of β_3 -adrenoceptors stimulation in the beating guinea pig heart (2000) *J Cardiovasc Pharm* 35, 786-790.
- **Klugbauer** N., Dai S., Specht V., Lacinova L., Marais E., Bohn G. & Hofmann F. A. family of γ -like calcium channel subunits (2000) *FEBS Lett* 470, 189-197.
- **Kohout** T.A., Takaoka H., McDonald P.H., Perry S.J., Mao L., Lefkowitz R.J. & Rockman H.A. Augmentation of cardiac contractility mediated by the human β_3 -adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice (2001) *Circulation* 104, 2485-2491.
- **Konkar** A.A., Zhai Y. & Granneman J.G. β_1 -adrenergic receptors mediate β_3 -adrenergic-independent effects of CGP 12177 in brown adipose tissue (2000) *Mol Pharmacol* 57, 252-258.
- **Korzick** D.H. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update (2003) *Adv Physiol Educ* 27, 192-200.
- **Krall** J., Tasken K., Staheli J., Jahnsen T. & Movsesian M.A. Identification and quantitation of cAMP-dependent protein kinase R subunit isoforms in subcellular fractions of failing human myocardium (1999) *J Mol Cell Cardiol* 31, 971-980.
- **Kroeger** K.M., Hanyaloglu A.C., Seeber R.M., Miles L.E. & Eidne K.A. Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (2001) *J Biol Chem* 276 (16), 12736-12743.
- **Kuschel** M., Zhou Y.Y., Cheng H., Zhang S.J., Chen Y., Lakatta E.G. & Xiao RP. G_i protein-mediated functional compartmentalization of cardiac β_2 -adrenergic signaling (1999) *J Biol Chem* 274, 22048-22052.

- **Lai L.P.**, Su M.J., Lin J.L., Lin F.Y., Tsai C.H., Chen Y.S., Huang S.K., Tseng Y.Z. & Lien W.P. Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban : an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling (1999) *J Am Coll Cardiol* 33, 1231-1237.
- **Langlois M.** & Fischmeister R. 5-HT₄ receptor ligands : applications and new prospects (2003) *J Med Chem* 46 (3), 319-344.
- **Latif R.**, Graves P. & Davies T.F. Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor (2002) *J Biol Chem* 277 (47), 45059-45067.
- **Law S.F.**, Yasuda K., Bell G.I. & Reisine T. Gi alpha 3 and G(o) alpha selectivity associate with the cloned somatostatin receptor subtype SSTR2 (1993) *J Biol Chem* 268, 10721-10727.
- **Lebesgue D.**, Wallukat G., Mijares A., Granier C., Argibay J. & Hoebeke J. An agonist-like monoclonal antibody against the human beta2-adrenoceptor (1998) *Eur J Pharmacol* 348, 123-133.
- **Leblanc N.** & Hume J.R. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum (1990) *Science* 248, 372-376.
- **Lee S.P.**, O'Dowd B.F., Ng G.Y., Varghese G., Akil H., Mansour A., Nguyen T. & George S.R. Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D2 dopamine receptors exist as oligomers in the cell (2000) *Mol Pharmacol* 58 (1), 120-128.
- **Lee S.P.**, O'Dowd B.F. & George S.R. Homo- and hetero-oligomerization of G protein-coupled receptors (2003) *Life Sci* 74, 173-180.
- **Leff P.** The two-state model of receptor activation (1995) *Trends Pharmacol SCI* 16, 89-97.
- **Lefkowitz R.J.** Cotecchia S., Samama P. & Costa T. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins (1993) *Trends Pharmacol SCI* 14, 303-307.
- **Lefkowitz R.J.** G-protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization (1998) *J Biol Chem* 273, 18677-18680.
- **Lemessurier D.H.**, Scharz C.J. & Whelan R.F. Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man (1959) *Br J Pharmacol* 14, 246-250.

- **Letts** V.A., Felix R., Biddlecome G.H., Arikath J., Mahaffey C.L., Valenzuela A., Bartlett F.S., Mori Y., Campbell K.P. & Frankel W.N. The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca^{2+} -channel γ subunit (1998) *Nat Gen* 19, 340-347.
- **Leurs** R., Smit M.J., Alewijnse A.E. & Timmerman H. Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors (1998) *Trends Biochem Sci* 23, 418-422.
- **Levi** R.C., Alloatti G. & Fischmeister R. Cyclic GMP regulates the Ca-channel current in guinea-pig ventricular myocytes (1989) *Pflügers Arch* 413, 685-687.
- **Li** L., De santiago J., Chu G., Kranias E.G. & Bers D.M. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in β -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation (2000) *Am J Physiol* 278, H769-H779.
- **Liliom** K., Sun G., Bünemann M., Virag T., Nusser N., Baker D.L., Wang D., Fabian M.J., Brandts B., Benders K., Eickel A., Malik K.U., Miller D.D., Desiderio D.M., Tigyi G. & Pott L. Sphingosylphosphocholine is a naturally occurring lipid mediator in blood plasma : a possible role in regulating cardiac function via sphingolipid receptors (2001) *Biochem J* 355, 189-197.
- **Limas** C.J., Goldenberg I.F. & Limas C. Autoantibodies against β -adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy (1989) *Circ Res* 64, 97-103.
- **Lin** S.W. & Sakmar T.P. Specific tryptophan UV-absorbance changes are probes of the transition of rhodopsin to its active state (1996) *Biochemistry* 35, 11149-11159.
- **Lipskaia** L., Defer N., Esposito G., Hajar I., Garel M.C, Rockman H.A. & Hanoune J. Enhanced cardiac function in transgenic mice expressing a Ca^{2+} -stimulated adenylyl cyclase (2000) *Circ Res* 86, 795-801.
- **Lodish** H., Baltimore D., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P. & Darnell J. Biologie moléculaire de la cellule, De Boeck Université, 3rd edition, 1997.
- **Lohse** M.J., Engelhardt S. & Eschenhagen T. What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure ? (2003) *Circ Res* 93, 896-906.
- **Lukyanenko** V., Gyorke I., Subramanian S., Smirnov A., Wiesner T.F. & Gyorke S. Inhibition of Ca^{2+} sparks by ruthenium red in permeabilized rat ventricular myocytes (2000) *Biophys J* 79, 1273-1284.
- **Luo** X., Zhang D. & Weinstein H. Ligand-induced domain motion in the activation mechanism of a G-protein-coupled receptor (1994) *Protein Eng* 7, 1441-1448.

- **Magnusson** Y., Wallukat G., Waagstein F., Hjalmarson A. & Hoebcke J. Characterisation of antibodies against the β_1 -adrenoceptor with positive chronotropic effect (1994) *Circ Res* 89, 2760-6767.
- **Maier** L.S. & Bers D.M. Calcium, calmodulin and calcium-calmodulin kinase II : heartbeat to heartbeat and beyond (2002) *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939.
- **Maillet** M., Robert S.J., Cacquevel M., Gastineau M., Vivien D., Bertoglio J., Zugaza J.L., Fischmeister R. & Lezoualc'h F. Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPP α (2003) *Nat Cell Biol* 5(7), 633-639.
- **Marks** A.R. Intracellular calcium-release channels : regulators of cell life and death (1997) *Am J Physiol* 272, H597-H605.
- **Marks** A.R. Clinical implications of cardiac ryanodine receptor/calcium release channel mutations linked to sudden cardiac death (2002) *Circulation* 106, 8-10.
- **Marshall** F.H. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors in the CNS (2001) *Curr Opi Pharmacol* 1 (1), 40-44.
- **Marx** S.O., Reiken S., Hisamatsu Y., Jayaraman T., Burkhoff D., Rosemblyt N. & Marks A.R. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor) : defective regulation in failing hearts (2000) *Cell* 101, 365-376.
- **Matsui** S., Fu M.L., Katsuda S., Hayase M., Yamaguchi N., Teraoka K., Kurihara T., Takekoshi N., Murakami E., Hoebcke J. & Hjalmarson A. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits (1997) *J Mol Cell Cardiol* 29(2), 641-655.
- **Matthews** G.G. Neurobiology, molecules cells and systems, 2nd edition, 1998.
- **Mc Hugh** D., Sharp E.M., Scheuer T. & Catterall W.A. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (22), 12334-12338.
- **McDonald** T.F., Pelzer S., Trautwein W. & Pelzer D.J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells (1994) *Physiol Rev* 74, 365-507.
- **Meissner** G. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors (1994) *Annu Rev Physiol* 56, 485-508.
- **Mellado** M., Vila-Coro A.J., Martinez C. & Rodriguez-Frade J.M. Receptor dimerization : a key step in chemokine signaling (2001) *Cell Mol Biol* 47 (4), 575-582.

- **Mery P.F.**, Lohmann S.M., Walter U. & Fischmeister R. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1197-1201.
- **Mery P.F.**, Pavoine C., Pecker F. & Fischmeister R. Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes (1995) *Mol Pharmacol* 48, 121-130.
- **Mialet J.**, Dahmoune Y., Lezoualc'h F., Berque-Bestel I., Eftekhari P., Hoebeke J., Siscic S., Langlois M. & Fischmeister R., Exploration of the ligand binding site of the human 5-HT₄ receptor by site-directed mutagenesis and molecular modeling (2000a) *Brit J Pharmacol* 130, 527-538.
- **Mialet J.**, Berque-Bestel I., Eftekhari P., Gastineau M., Giner M., Dahmoune Y., Donzeau-Gouge P., Hoebeke J., Langlois M., Siscic S., Fischmeister R. & Lezoualc'h F. Isolation of the serotonergic 5-HT_{4(e)} receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines (2000b) *J Pharmacol* 129, 771-781.
- **Mialet J.**, Fischmeister R. & Lezoualc'h F., Characterization of human 5-HT_{4(d)} receptor desensitization in CHO cells (2003) *Brit J Pharmacol* 138, 445-452.
- **Michikado I.**, Tsutomu Y., Akiyasu B., Toshihisa A., Mitamura H. & Satoshi O. Autoantibodies against the second extracellular loop of Beta₁-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy (2001) *J Am Coll Cardiol* 37, 418-424.
- **Mijares A.**, Verdot L., Peineau N., Vray B., Hoebeke J. & Argibay J. Antibodies from *Trypanosoma cruzi* infected mice recognize the second extracellular loop of the alpha₁-adrenergic and M₂-muscarinic receptors and regulate calcium channels in isolated cardiomyocytes. (1996a) *Mol Cell Biochem* 163/164, 107-112.
- **Mijares A.**, Lebesgue D., Argibay J. & Hoebeke J. Anti-peptide antibodies sensitive to the 'active' state of the beta₂-adrenergic receptor (1996b) *FEBS Lett* 399, 188-191.
- **Mijares A.**, Lebesgue D., Wallukat G. & Hoebeke J. From agonist to antagonist: Fab fragments of an agonist-Like monoclonal anti-beta₂-adrenoceptor antibody behave as antagonists (2000) *Mol Pharmacol* 58, 373-379.
- **Milligan G.** & Bond R.A. Inverse agonism and the regulation of receptor number (1997) *Trends Pharmacol SCI* 18, 468-474.

- **Milligan** G., Ramsay D., Pascal G. & Carillo J.J. GPCR dimerisation (2003) *Life Sci* 74, 181-188.
- **Morris** A.J. & Malbon C.C. Physiological regulation of G protein-linked signaling (1999) *Physiol Rev* 79, 1373-1430.
- **Nascimento** J.H., Sallé L., Hoebeke J., Argibay J. & Peineau N. cGMP-mediated inhibition of cardiac L-type Ca²⁺ current by a monoclonal antibody against the M₂ Ach receptor (2001) *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1251-C1258.
- **Nimchinsky** E.A., Hof P.R., Janssen W.G., Morrison J.H. & Schmauss C. Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells (1997) *J Biol Chem* 272, 29229-29237.
- **Noble** S. & Shimoni Y. The calcium and frequency dependence of the slow inward current 'staircase' in frog atrium (1981) *J Physiol (Lond)* 310, 57-75.
- **Olsson** S.B., Cotoi S. & Varnauskas E. Monophasic action potential and sinus rhythm stability after conversion of atrial fibrillation (1971) *Acta Med Scand* 190, 381-387.
- **Ono** K. & Trautwein W. Potentiation by cyclic GMP of beta-adrenergic effect on Ca²⁺ current in guinea-pig ventricular cells (1991) *J Physiol (Lond)* 443, 387-404.
- **Orlov** S.N. & Maksimova N.V. Efflux of cyclic adenosine monophosphate from cells : mechanisms and physiological implications (1999) *Biochemistry (Moscow)* 64 (2), 127-135.
- **Ostrom** R.S., Gregorian C., Drenan R.M., Xiang Y., Regan J.W. & Insel P.A. Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase (2001) *J Biol Chem* 276, 42063-42069.
- **Ouadid** H., Seguin J., Dumuis A., Bockaert J. & Nargeot J. Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors (1991) *Mol Pharmacol* 41, 346-351.
- **Overton** M.C. & Blumer K.J. The extracellular N-terminal domain and transmembrane domains 1 and 2 mediate oligomerization of a yeast G protein-coupled receptor (2002) *J Biol Chem* 277 (44), 41463-41472.
- **Palczewski** K.T., Kumasaka T., Hori T., Behnke A.C., Motoshima B.A., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., & Miyano M. Crystal structure of rhodopsin : a G protein-coupled receptor (2000) *Science* 289, 739-745.

- **Pau D.**, Workman A.J., Kane K.A., & Rankin A.C. Electrophysiological effects of 5-hydroxytryptamine on isolated human atrial myocytes, and the influence of chronic β -adrenoceptor blockade (2003) *Br J Pharmacol* 140, 1434-1441.
- **Pavoine C.**, Behforouz N., Gauthier C., Le Gouvello S., Roudot-Thoraval F., Martin C.R., Pawlak A., Feral C., Defer N., Houel R., Magne S., Amadou A., Loisanche D., Duvaldestin P. & Pecker F. Beta2-adrenergic signaling in human heart : shift from the cyclic AMP to the arachidonic acid pathway (2003) *Mol Pharmacol* 64 (5), 1117-1125.
- **Perez-Reyez E.** & Schneider T. Calcium channels : structure, function and classification (1994) *Drug Dev Res* 33, 295-318.
- **Perez-Reyez E.** Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels (1998) *J Bioenerg Biomembr* 30, 313-318.
- **Peter J.C.**, Eftekhari P., Billiald P., Wallukat G. & Hoebcke J. scFv single chain antibody variable fragment as inverse agonist of the β_2 -adrenergic receptor (2003) *J Biol Chem* 278(38), 36740-36747.
- **Peterson B.Z.**, De Maria C.D. & Yue D.T. Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channels (1999) *Neuron* 22, 549-558.
- **Pfeiffer M.**, Koch T., Schroder H., Klutzny M., Kirscht M., Kreienkamp S., Hollt H.J. & Schulz V. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A) (2001) *J Biol Chem* 276 (1), 14027-14036.
- **Pindon A.**, Van Hecke G., Van Gompel P., Lesage A.S., Leysen J.E. & Jurzak M. Differences in signal transduction of two 5-HT₄ receptor splice variants : compound specificity and dual coupling with G α_s - and G α_i/o -proteins (2002) *Mol Pharmacol* 61, 85-96.
- **Pino R.**, Cerbai E., Calamai G., Alajmo F., Borgioli A., Braconi L., Cassai M., Montesi G.F. & Mugelli A. Effect of 5-HT₄ receptor stimulation on the pacemaker current I_f in human isolated atrial myocytes (1998) *Cardiovasc Res* 40, 516-522.
- **Pitcher J.A.**, Freedman N.J. & Lefkowitz R.J. G protein-coupled receptor kinases (1998) *Annu Rev Biochem* 67, 653-692.
- **Ponimaskin E.G.**, Schmidt M.F.G., Heine M., Bickmeyer U. & Richter D.W. 5-hydroxytryptamine 4(a) receptor expressed in Sf9 cells is palmitoylated in a agonist-dependent manner (2001) *Biochem J* 353, 627-634.

- **Ponimaskin** E.G, Heine M., Joubert L., Sebben M., Bickmeyer U., Richter D.W. & Dumuis A. The 5-Hydroxytryptamine (4a) receptor is palmitoylated at two different sites, and acylation is critically involved in regulation of receptor constitutive activity (2002) *J Biol Chem* 277, 2534-2546.
- **Pragnell** M., De waard M., Mori Y., Tanabe T., Snutch T.P. & Campbell K.P. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit (1994) *Nature* 368, 67-70.
- **Puri** T.S., Gerhardstein B.L., Zhao X.L., Ladner M.B. & Hosey M.M. Differential effects of subunit interactions on protein kinase A and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels (1997) *Biochemistry* 36(31), 9605-9615.
- **Qin** N., Olcese R., Bransby M., Lin T. & Birnbaumer L. Ca²⁺-induced inhibition of the cardiac Ca²⁺ channel depends on calmodulin (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2435-2438.
- **Rapp** P.E. & Berridge M.J. Oscillations in calcium-cyclic AMP control loops form the basis of pacemaker activity and other high frequency biological rhythms (1977) *J Theor Biol* 66, 497-525.
- **Ravens** U. & Dobrev D. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban in the failing and nonfailing heart (2000) *Cardiovasc Res* 45, 245-252.
- **Retondaro** F.C., Dos Santos Costa P.C., Pedrosa R.C. & Kurtenbach E. Presence of antibodies against the third intracellular loop of the m2 muscarinic receptor in the sera of chronic Chagas patients (1999) *FASEB J* 13, 2015-2020.
- **Reuter** H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration (1967) *J Physiol (London)* 192, 479-492.
- **Rich** T., Fagan K.A., Tse T.E., Schaack J., Cooper D.M. & Karpen J.W. A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 13049-13054.
- **Richard** S., Leclercq F., Lemaire S., Piot C., Nargeot J. Ca²⁺ currents in compensated hypertrophy and heart failure (1998) *Cardiovasc Res* 37(2), 300-311.
- **Ringer** S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart (1883) *J Physiol* 4, 29.
- **Rivet-Bastide** M., Vandecasteele G., Hatem S., Verde I., Benardeau A., Mercadier J.J. & Fischmeister R. cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes (1997) *J Clin Invest* 99, 2710-2718.

- **Rockman** H.A., Koch W.J. & Lefkowitz R.J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function (2002) *Nature* 415, 206-212.
- **Rodbell** M., Birnbaumer L., Pohl S.L. & Krans H.M. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action (1971) *J Biol Chem* 246, 1877-1882.
- **Roden** D.M. Antiarrhythmic drugs : past, present, and future (2003) *Naspe History* 26, 2340-2349.
- **Rosen** M.R. Leady dikes and fibrillating swine (1999) *Circulation* 100, 1942-1944.
- **Rougier** O., Vassort G., Garnier D., Gargouil Y.M. & Coraboeuf E. Données nouvelles concernant le rôle des ions Na⁺ et Ca²⁺ sur les propriétés électrophysiologiques des membranes cardiaques ; existence d'un canal lent (1968) *C.R Acad Sci Paris* 266, 802-805.
- **Rougier** O., Vassort G., Garnier D., Gargouil Y.M. & Coraboeuf E. Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential (1969) *Pflügers Arch* 308, 91-110.
- **Rücker-Martin** C., Hatem S., Dubus I., Mace L., Samuel J.L. & Mercadier J.J. Behaviour of human atrial myocyte in culture is donor age dependent (1993) *Neuromuscul Disord* 3, 385-390.
- **Rybin** V.O., Xu X., Lisanti M.P. & Steinberg S.F. Differential targeting of β -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae (2000) *J Biol Chem* 275, 41447-41457.
- **Salahpour** A., Angers S. & Bouvier M. Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors (2000) *Trends Endocrinol Metab* 11 (5), 163-168.
- **Sallé** L., Eftekhari P., Aupart M., Cosnay P., Hoebeker J. & Argibay J. Inhibitory activity of antibodies against the human atrial 5-HT₄ receptor (2001) *J Mol Cell Cardiol* 33, 405-417.
- **Samana** P., Cotecchia S., Costa T. & Lefkowitz R.J. A mutation-induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model (1993) *J Biol Chem* 268, 4625-4636.
- **Sanders** L. & Kaumann A.J. A 5-HT₄-like receptor in human left atrium (1992) *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345, 382-386.

- **Sanders** L., Lynham J.A., Bond B., Del Monte F., Harding S.E. & Kaumann A.J. Sensitization of human atrial 5-HT₄ receptors by chronic β-blocker treatment. (1995). *Circ Res* 92, 2527-2539.
- **Sanguinetti** M.C.C. & Kass R.S. Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists (1984) *Circ Res* 55, 336-348.
- **Saxena** P.R. & Villalon C.M. Cardiovascular effects of serotonin agonists and antagonists (1990) *J Cardiovasc Pharm* 15, s17-s34.
- **Scheer** A, Fanelli F., Costa T., De Benedetti P.G. & Cotecchia S. Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor : role of highly conserved polar amino acids in receptor activation (1996) *EMBO J* 15, 3566-3578.
- **Schertler** G.F., Villa C. & Henderson R. Projection structure of rhodopsin (1993) *Nature* 362, 770-772.
- **Schertler** G.F. & Hargrave P.A. Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11578-11582.
- **Schneider** M.F. & Chandler W.K. Voltage dependent charge movement of skeletal muscle : a possible step in excitation-contraction coupling (1973) *Nature* 242, 244-246.
- **Scott** J.D., Cyclic nucleotide-dependent protein kinases (1991) *Pharmacol Ther* 50, 123-145.
- **Seifert** R. & Wenzel-Seifert K. Constitutive activity of G protein-coupled receptors : cause of disease and common property of wild-type receptors (2002) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 366, 381-416.
- **Shistik** E., Ivanima T., Blumenstein Y. & Dascal N. Crucial role of N terminus in function of cardiac L-type Ca²⁺ channel and its modulation by protein kinase C (1998) *J Biol Chem* 273, 17901-17909.
- **Simonds** W. G protein regulation of adenylate cyclase (1999) *Trends Pharmacol SCI* 20, 66-72.
- **Skalhegg** B.S. & Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA (2000) *Front Biosci* 5, D678-D693.
- **Skasa** M., Jüngling E., Picht E., Schöndube F. & Lückhoff A. L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation (2001) *Basic Res Cardiol* 96, 151-159.

- **Sperelakis** N., Katsube Y., Yokoshiki H., Sada H. & Sumii K. Regulation of the slow Ca^{2+} channels of myocardial cells (1996) *Mol Cell Biochem* 163-164, 85-98.
- **Steinberg** S.F. & Brunton L.L. Compartmentation of G protein-coupled signaling pathway in cardiac myocytes (2001) *Annu Rev Pharmacol* 41, 751-773.
- **Sterin-Borda** L., Echague A.V., Leiros C.P., Genaro A. & Borda E. Endogenous nitric oxide signalling system and the cardiac muscarinic acetylcholine receptor-inotropic response (1995) *Br J Pharmacol* 115, 1525-1531.
- **Sterin-Borda** L., Gorelik G., Postan M., Gonzalez , Cappa S. & Borda E. Alterations in cardiac beta-adrenergic receptors in chagasic mice and their association with circulating beta-adrenoceptor-related autoantibodies (1999) *Cardiovasc Res* 41, 116-125.
- **Stoclet** J.C, Keravis K., Komasa N. & Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterases as therapeutic targets in cardiovascular diseases (1995) *Exp Opin Invest Drugs* 4, 1081-1100.
- **Strader** C.D., Fong T.M., Tota M.R., Underwood D., & Dixon A.F. Structure and function of G protein-coupled receptors (1994) *Annu Rev Biochem* 63, 101-132.
- **Striessnig** J., Grabner M., Mitterdorfer J., Hering S., Sinneger M. & Glossmann H. Structural basis of drug binding to L-type Ca^{2+} channels (1998) *Trends Pharmacol SCI* 19, 108-115.
- **Striessnig** J. Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca^{2+} channels (1999) *Cell Physiol Biochem* 9, 242-269.
- **Sutko** J.L & Airey J.A. Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels : does diversity in form equal diversity in function? (1996) *Physiol Rev* 76, 1027-1071.
- **Swynghedauw** B. Molecular cardiology for the cardiologist (1995) *Kluwer Academic, Boston*.
- **Takehima** H., Nishimura S., Matsumoto T., Ishida H., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Ueda M., Hanaoka M., Hirose T. & Numa S. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor (1989) *Nature* 339, 439-445.
- **Takehima** H., Ikemoto T., Nishi M., Nishiyama N., Shimuta M., Sugitani Y., Kuno J., Saito I., Saito H., Endo M., Iino M. & Noda T. Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3 (1996) *J Biol Chem* 271, 19649-19652.
- **Tesmer** J.J.G. & Sprang S.R. The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase (1998) *Curr Opin Struct Biol* 8, 713-719.

- **Tesson F.**, Charron P., Schwartz K. & Komajda M. Génétique des cardiomyopathies dilatées (1999) *M&S* 15, 369-375.
- **Tigyi G.** & Miledi R. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells (1992) *J Biol Chem* 267(30), 21360-21367.
- **Trafford A.W.**, Diaz M.E., O'Neill S.C. & Eisner D.A. Comparison of subsarcolemmal and bulk calcium concentration during spontaneous calcium release in rat ventricular myocytes (1995) *J Physiol (london)* 488, 577-586.
- **Tsien R.W.**, Hess P., McCleskey E.W. & Rosenberg R.L. Calcium channels : mechanisms of selectivity, permeation, and block (1987) *Annu Rev Biophys Chem* 16, 265-290.
- **Van Koppen C.J.**, Heringdorf D.M., Laser K.T., Zhang C. & Jakobs K.H. Activation of a high affinity G_i protein-coupled plasma membrane receptor by sphingosine-1-phosphate (1996) *J Biol Chem* 271(4), 2082-2087.
- **Van Koppen C.J.** & Kaiser B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling (2003) *Pharmacol Ther* 98, 197-220.
- **Van Wagoner D.R.**, Pond A.L., Lamorgese M., Rossie S.S., McCarthy P.M. & Nerbonne J.M. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation (1999) *Circ Res* 85, 428-436.
- **Verde I.**, Vandecasteele G., Lezoualc'h F. & Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes (1999) *Br J Pharmacol* 127, 65-74.
- **Verde I.**, Pahlke G., Salanova M., Zhang G., Wang S., Coletti D., Onuffer J., Jin S.L.C. & Conti M. Myomegalin is a novel protein of the golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase (2001) *J Biol Chem* 275, 41447-41457.
- **Vila-Coro A.J.**, Rodriguez-Frade J.M., Martin De Ana A., Moreno-Ortiz M.C., Martinez A.C. & Mellado M. The chemokine SDF-1 alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway (1999) *FASEB J* 13 (13), 1699-1710.
- **Walker D.** & De Waard M. Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels : role in channel function (1998) *Trends Neurosci* 21, 148-154.
- **Wallukat G.** & Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes (1987) *Biomed Biochim Acta* 46, S634-639.

- **Wallukat** G., Kayser A. & Wollenberger A. The beta 1-adrenoceptor as antigen : functional aspects (1995) *Eur Heart J* 16 Suppl O, 85-88.
- **Wardle** K.A., Bingham S., Ellis E.S., Gaster L.M., Rushant B., Smith M.I. & Sanger G.J. Selective and functional 5-hydroxytryptamine₄ receptor antagonism by SB 207266 (1996) *Br J Pharmacol* 118, 665-670.
- **Weng** G., Jordan J.D. & Chen Y. Structure basis for the function of the heterotrimeric G-protein (1998) *Seminars in Neuroscience* 9, 175-188.
- **Wieland** T. & Chen C.K. Regulators of G-protein signalling : a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G protein (1999) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360, 14-26.
- **Wier** W.G. & Balke C.W. Ca²⁺ release mechanisms, Ca²⁺ sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle (1999) *Circ Res* 85, 770-776.
- **Wijffels** M.C., Kirchhoff C.J., Dorland R., Allessie M.A. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats (1995) *Circulation* 92, 1954-1968.
- **Wilk-Blaszczak** M.A., Singer W.D., Quill T., Miller B., Frost J.A., Sternweis P.C. & Belardetti F. The monomeric G-proteins Rac1 and/or Cdc42 are required for the inhibition of voltage-dependent calcium current by bradykinin (1997) *J Neurosci* 17(11), 4094-4100.
- **Woodcock** E.A., Matkovich S.J. & Binah O. Ins (1, 4, 5) P₃ and cardiac dysfunction (1998) *Cardiovasc Res* 40, 251-256.
- **Workman** A.J. & Rankin A.C. Serotonin, I(f) and human atrial arrhythmia (1998) *Cardiovasc Res* 40, 436-437.
- **Wurch** T. & Pauwels P. Analytical pharmacology of G protein-coupled receptors by stoichiometric expression of the receptor and G_α protein subunits (2001) *J Pharmacol Toxicol* 45, 3-16.
- **Xiao** R.P., Cheng H., Zhou Y.Y., Kuschel M & Lakatta E.G. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction (1999) *Circ Res* 85, 1092-1100.
- **Yatomi** Y., Igarashi Y., Yang L., Hisano N., Qi R., Asazuma N., Satoh K., Ozaki Y. & Kume S. Sphingosine-1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum (1997) *J Biol Chem* 272, 969-973.
- **Yeagle** P.L. & Albert A.D. A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor (2003) *Biochemistry* 42(6), 1365-1368.

- **Yusuf S.**, Al-Saady N. & Camm J. 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation : how significant is this piece in the puzzle? (2003) *J Cardiovasc Electr* 14, 209-214.
- **Zaccolo M.**, Malgalhaes P. & Pozzan T. Compartmentalization of cAMP and Ca²⁺ signals (2002) *Curr Opin Cell Biol* 14, 160-166.
- **Zaccolo M.** & Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes (2002) *Science* 295, 1711-1715.
- **Zaccolo M.** & Pozzan T. cAMP and Ca²⁺ interplay : a matter of oscillation patterns (2003) *Trends Neurosci* 26(2), 53-55.
- **Zahradnikova A.** & Lacinova L. Molecular determinants of the interaction of calcium channels with calcium channel drugs (1998) *Exp Clin Cardiol* 3, 121-127.
- **Zastrow M.** Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway (2003) *Life Sci* 74, 217-224.
- **Zhang L.**, Kelley J., Schmeisser G., Kobayashi Y.M. & Jones L.R. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane (1997) *J Biol Chem* 272, 23389-23397.
- **Zhao X.L.**, Gutierrez L.M., Chang C.F. & Hosey M.M. The α_1 -subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C (1994) *Biochem Biophys Res Commun* 198, 166-173.
- **Zhu C.C.**, Cook L.B. & Hinkle P.M. Dimerization and phosphorylation of thyrotropin-releasing hormone receptors are modulated by agonist stimulation (2002) *J Biol Chem* 277 (31), 28228-28237.
- **Zipes D.P.** Atrial fibrillation : from cell to bedside (1997) *J Cardiovasc Electr* 8, 927-938.
- **Zühlke R.D.**, Pitt G.S., Deisseroth K., Tsien R.W. & Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels (1999) *Nature* 399, 159-162.